



HAL
open science

La plasticité cérébrovasculaire durant la gestation chez la souris

Gabrièle Lienhard

► **To cite this version:**

Gabrièle Lienhard. La plasticité cérébrovasculaire durant la gestation chez la souris. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04659919

HAL Id: dumas-04659919

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04659919v1>

Submitted on 23 Jul 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

LA PLASTICITÉ CÉRÉBROVASCULAIRE DURANT LA GESTATION CHEZ LA SOURIS

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 28 mai 2024

par

Gabrièle, Eva, Suzanne, Elisabeth LIENHARD

sous la direction de

Fanny Pilot-Storck

JURY

Président du jury :	M. Alain Fontbonne	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Fanny Pilot-Storck	Professeur à VetAgroSup
Examineur :	M. Laurent Tiret	Professeur à l'EnvA
Membre invité :	M. Nicolas Renier	Directeur de recherche à l'Institut du Cerveau

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



version Janvier 2024

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

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chelboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Professeur	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoulhes-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, M. Alain Fontbonne, Professeur à l'EnvA,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

À Mme Fanny Pilot-Storck, Professeure à VetAgroSup,
Pour avoir accepté de diriger cette thèse. Pour sa bienveillance et son enthousiasme.

À M. Laurent Tiret, Professeur à l'EnvA,
Pour avoir aimablement accepté d'examiner cette thèse.

À M. Nicolas Renier, Directeur de recherches à l'Institut du Cerveau,
Pour m'avoir encadrée pendant mon stage de M2 et accepté de diriger ma thèse de sciences. Pour sa disponibilité et son optimisme. Mes remerciements les plus sincères.

À Mme Ahlem Assali, Chercheuse Post-doctorante à l'Institut du Cerveau,
Pour avoir participé de façon essentielle à ce projet.

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	7
Introduction	9
Première partie : bibliographie	11
1. Organisation anatomique et fonctionnelle de la vascularisation cérébrale	11
a. Le réseau artériel cérébral	11
b. La microcirculation cérébrale	12
c. Le réseau veineux cérébral	12
d. Différences anatomiques entre l'humain et la souris	12
<i>B. Histologie du réseau vasculaire cérébral</i>	14
a. L'unité neurovasculaire	14
b. La barrière hématoencéphalique	14
2. La gestation chez la souris	15
<i>A. Présentation générale de la gestation chez la souris</i>	15
<i>B. Evolution des niveaux hormonaux pendant la gestation</i>	16
a. Progestérone	16
b. Œstradiol	16
c. Ocytocine	16
d. Prolactine	16
<i>C. Impact de la gestation sur l'encéphale</i>	17
a. Impact de la gestation sur le comportement	17
b. Impact de la gestation sur l'anatomie cérébrale	17
<i>D. Impact de la gestation sur la vascularisation cérébrale et systémique</i>	19
a. Impact de la gestation sur l'hémodynamique	19
b. Impact de la gestation sur la structure des vaisseaux.....	20
3. Plasticité de la vascularisation cérébrale	21
<i>A. Plasticité pendant le développement et le vieillissement</i>	21
<i>B. Plasticité en conditions pathologiques</i>	21
<i>C. Plasticité en conditions physiologiques</i>	22
<i>D. Les mécanismes de remodelage des vaisseaux</i>	23
a. Modifications soustractives	23
b. Modifications additives	23
4. Exemples de méthodes pour étudier le réseau vasculaire cérébral	25
<i>A. Techniques applicables en clinique</i>	26
a. Tomodensitométrie	26
b. Imagerie par résonance magnétique (IRM).....	26
<i>B. Techniques utilisées au laboratoire</i>	27
a. Microscopie multiphotonique intravitale	27
b. Clarification des tissus ex vivo et microscopie à feuille de lumière	27
Deuxième partie : étude expérimentale	29
1. Introduction	29
2. Matériels et méthodes	30
3. Résultats	37
<i>A. Mise en évidence d'une plasticité cérébrovasculaire gestationnelle chez la souris</i>	37
<i>B. Mécanismes cellulaires à l'origine du remodelage vasculaire gestationnel dans l'aire pré-optique médiane</i>	41
<i>C. Conséquences fonctionnelles sur le réseau vasculaire local</i>	43

D. Comportement des astrocytes de l'aire pré-optique médiane pendant la gestation	45
E. La progestérone seule ne semble pas suffisante pour expliquer l'origine de la plasticité vasculaire gestationnelle dans l'aire pré-optique médiale.....	45
4. Discussion.....	48
A. Remaniements vasculaires dans l'encéphale en gestation	48
B. Hypothèses de mécanismes	48
a. Origine des remaniements vasculaires pendant la gestation	49
b. Nature des remaniements vasculaires pendant la gestation	49
c. Mécanismes de remaniements vasculaires pendant la gestation	49
C. Conséquences sur le réseau vasculaire cérébral.....	50
D. Conséquences fonctionnelles	50
E. Applications médicales.....	51
Conclusion.....	53
Liste des références bibliographiques	55

Liste des figures

Figure 1 : Le réseau artériel cérébral.....	13
Figure 2 : Le réseau veineux cérébral	13
Figure 3 : La gestation chez la souris	15
Figure 4 : Impact de la gestation sur l'encéphale de la future mère	18
Figure 5 : Impact de la gestation sur la vascularisation cérébrale.....	20
Figure 6 : Schéma récapitulant les circonstances d'observation d'une plasticité cérébrovasculaire	22
Figure 7 : Les mécanismes de formation ou de rétraction des vaisseaux sanguins.....	24
Figure 8 : Illustration de quatre méthodes d'imagerie cérébrovasculaire	28
Figure 9 : Le protocole iDISCO.....	32
Figure 10 : Le principe du logiciel TubeMap	34
Figure 11 : Densification vasculaire dans l'hypothalamus pendant la gestation	38
Figure 12 : Densification vasculaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation.....	39
Figure 13 : Densification vasculaire dans le noyau arqué pendant la gestation	40
Figure 14 : Remodelage vasculaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation	42
Figure 15 : Prolifération endothéliale dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation	43
Figure 16 : La plasticité vasculaire dans l'aire pré-optique médiane n'entraîne pas d'augmentation de la perméabilité à la biotine.....	44
Figure 17 : Altération du comportement astrocytaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation	46
Figure 18 : La progestérone seule ne semble pas impacter la densité vasculaire dans l'aire pré-optique médiane.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences36

Tableau 2 : Réactifs utilisés pour les tests de perméabilité de la barrière hématoencéphalique37



Liste des abréviations

ARH : noyau arqué de l'hypothalamus

BNST : noyau du lit de la strie terminale

DSC : débit sanguin cérébral

ELISA : *enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (en français : technique d'immunoabsorption par enzyme liée)

GDX : jour de gestation *X*

GFAP : protéine acide fibrillaire gliale

iDISCO : *immunolabeling-enabled three-dimensional imaging of solvent-cleared organs* (en français : imagerie tridimensionnelle basée sur l'immunomarquage d'organes clarifiés par des solvants)

MPO : aire pré-optique médiane

NO : monoxyde d'azote

PBS : *phosphate buffer saline*, tampon utilisé pour la conservation des échantillons biologiques

PFA : paraformaldéhyde, molécule utilisée pour la fixation des tissus

PX : jour de post-partum *X*

SFO : organe subfornical

VEGF : *vascular endothelial growth factor* (en français : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)

Introduction

Un réseau vasculaire complexe irrigue l'encéphale et assure l'apport efficace d'oxygène et de nutriments aux neurones, mais aussi de molécules de signalisation en provenance de la périphérie. La vascularisation cérébrale constitue ainsi une interface cruciale entre les neurones et la périphérie et joue un rôle critique dans l'intégration des paramètres physiologiques et dans la modulation des fonctions cérébrales. Elle est également impliquée, directement ou indirectement, dans la plupart des maladies affectant les fonctions cérébrales.

La gestation est une période de transition physiologique et comportementale majeure. Les niveaux élevés d'hormones sexuelles circulantes entraînent un large éventail de changements adaptatifs dans l'encéphale pendant la gestation : ces changements incluent des modifications fonctionnelles telles qu'une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe, une adaptation de certaines fonctions physiologiques telles que l'équilibre énergétique ou la réponse au stress, ou encore une plasticité de circuits cérébraux pour promouvoir l'expression de comportements maternels (Barrière *et al.*, 2021 ; Hillerer *et al.*, 2014). Toutefois, contrairement à de nombreux organes dont la vascularisation subit des changements importants pendant la grossesse, aucun remodelage de la microvasculature cérébrale n'a été mis en évidence à ce jour, bien qu'une étude suggère un remodelage de certaines artères cérébrales pendant la grossesse (Cipolla *et al.*, 2011).

Ces considérations rejoignent l'idée selon laquelle l'architecture vasculaire demeure stable à l'âge adulte. Les interactions entre neurones et vaisseaux sanguins sont connues pour réguler de façon dynamique le flux sanguin pour perfuser préférentiellement les circuits les plus actifs (Drake et Iadecola, 2007). Mise à part cette adaptation vasomotrice à l'activité neuronale, et bien que l'activité neuronale puisse affecter la densité vasculaire du cortex pendant le développement, l'architecture du réseau vasculaire cérébral est considérée stable chez l'adulte dans des conditions physiologiques (Bogorad *et al.*, 2019 ; Lacoste et Gu, 2015). De la plasticité vasculaire est tout de même documentée au niveau des organes circum-ventriculaires comme l'éminence médiane hypothalamique, où le remodelage actif des capillaires fenestrés est essentiel à la régulation de l'intégration neuronale des signaux hormonaux et métaboliques (Jiang *et al.*, 2020 ; Langlet *et al.*, 2013 ; Prevot *et al.*, 2018). Quelques études suggèrent également une plasticité vasculaire structurelle adulte chez la souris en réponse à l'hypoxie, un exercice physique, un environnement enrichi ou au contraire une déplétion sensorielle (Black *et al.*, 1990), mais elles restent isolées et n'ont pas été nécessairement répliquées (Cudmore *et al.*, 2017).

Le peu d'études portant sur la plasticité cérébrovasculaire chez l'adulte s'explique en partie par les difficultés techniques que cette problématique présente. La mise en évidence de modifications subtiles de l'architecture vasculaire est rendue délicate par la complexité du réseau vasculaire cérébral et le manque d'outils appropriés pour le visualiser en trois dimensions dans sa totalité. Cependant, étant donné la grande plasticité cérébrale pendant la gestation et les indices croissants d'une possible plasticité cérébrovasculaire à l'âge adulte y compris en conditions physiologiques, on peut émettre l'hypothèse que des variations subtiles de l'architecture cérébrovasculaire pourraient voir lieu pendant la gestation et n'auraient pas encore été mise en évidence du fait des difficultés techniques. Identifier et comprendre l'origine de telles variations aurait une importance cruciale, étant donné que la vulnérabilité aux complications cérébrovasculaires pendant la grossesse (Feske

et Singhal, 2014 ; Hong, 2019) pourrait s'expliquer par des modifications structurelles du réseau vasculaire et de sa perméabilité (Cipolla *et al.*, 2011a). Les troubles vasculaires cérébraux représentant une des causes prédominantes de mortalité maternelle (Santé Publique France, 2021), la compréhension précise des mécanismes à l'origine de cette vulnérabilité est un défi majeur de santé publique.

L'objectif de ce travail de thèse était de quantifier l'organisation du réseau vasculaire cérébral à l'échelle des capillaires pendant la gestation, afin de tester l'hypothèse que l'état gestationnel puisse entraîner une plasticité vasculaire et d'en étudier les mécanismes sous-jacents. Le modèle souris a été choisi du fait de la présence de nombreux outils génétiques, d'atlas cérébraux numériques complets, de la courte durée de la gestation, ainsi que de la taille de son encéphale, compatible avec l'imagerie à feuille de lumière.

Pour résoudre les difficultés techniques mentionnées précédemment, l'équipe a développé une méthodologie pour cartographier précisément en trois dimensions l'intégralité de la vasculature cérébrale chez la souris en pratiquant un immunomarquage des vaisseaux sanguins et une clarification de l'encéphale entier avec la méthode iDISCO+ (Renier *et al.*, 2014), suivie d'une imagerie à feuille de lumière et l'utilisation d'un outil informatique d'analyse d'image qui génère des reconstructions quantitatives du réseau vasculaire cérébral (Kirst *et al.*, 2020). Cette méthode permet la détection précise de modifications de la structure vasculaire dans l'encéphale entier. Ainsi, la longueur des vaisseaux, leur tortuosité, la densité des points de branchement, la présence de vaisseaux immatures non connectés peuvent être statistiquement quantifiées. Cette reconstruction en trois dimensions du réseau vasculaire en permet l'exploration non biaisée, avec une précision suffisante pour découvrir des événements de remodelage potentiellement inconnus dans l'encéphale adulte.

Je déclare avoir effectué la recherche bibliographique et participé à la production et l'analyse de tous les résultats présentés dans cette étude, en collaboration avec le Dr Ahlem Assali, chercheuse post-doctorante. Ces travaux ont été réalisés à l'Institut du Cerveau au sein de l'équipe du Dr Nicolas Renier et sous la direction de ce dernier, ainsi qu'au Laboratoire Lille Neurosciences & Cognition du Dr Vincent Prévot. Ils s'inscrivaient dans le cadre du Master 2 effectué sur l'année scolaire 2022/2023 à Sorbonne Université (Master Recherche de Sciences, Technologie, Santé, mention Biologie Intégrative et Physiologie, parcours Neurosciences, spécialité Neuroscience Cellulaires et Intégrative) ainsi que des premiers mois de mon doctorat. Le Dr Nicolas Renier a assuré la formation à la plupart des techniques expérimentales et à leur analyse. Elisa de Launoit, doctorante de l'équipe, a apporté une aide précieuse en particulier pour la microscopie à feuille de lumière et l'analyse d'images, et des idées et conseils ont régulièrement été donnés par tous les membres de l'équipe : Ana Marta Capaz, Etienne Doumazane, Patricia Gaspar, Alba Vieites Prado, Domitille Rajot, Charly Rousseau, et Sophie Skirabine. Enfin, les expériences impliquant les implants de progestérone ont été réalisées grâce à l'aide précieuse du Dr Daniela Fernandois dans le laboratoire de Vincent Prévot.

Première partie : bibliographie

Après un rappel de l'organisation anatomique et fonctionnelle du réseau vasculaire cérébral, cette première partie va résumer les connaissances actuelles sur les problématiques suivantes :

- Que se passe-t-il dans le corps de la femelle gravide pendant la gestation, et quels en sont en particulier les effets sur le système vasculaire d'une part, et sur l'encéphale d'autre part ?
- Dans quel contexte a-t-on démontré un remodelage du réseau vasculaire cérébral adulte ?
- Quels sont les mécanismes qui peuvent sous-tendre un tel remodelage vasculaire ?
- Quelles sont les méthodes disponibles pour étudier la topologie du réseau vasculaire cérébral et ses variations ?

1. Organisation anatomique et fonctionnelle de la vascularisation cérébrale

La perfusion de l'encéphale est assurée par un réseau complexe de vaisseaux sanguins jouant un rôle essentiel au bon fonctionnement cérébral. En plus de ses fonctions nutritives, le réseau vasculaire cérébral assure l'échange de molécules de signalisation, constituant une interface cruciale entre les neurones et la périphérie. Il est également impliqué dans la signalisation immunitaire et les échanges de chaleur, assurant le maintien de l'homéostasie.

La présentation qui suit est basée sur l'ouvrage *The cerebral circulation* (Cipolla, 2009). Cet ouvrage décrit le réseau cérébrovasculaire chez l'humain, mais étant donné la remarquable conservation de son architecture chez les mammifères, ces considérations sont tout à fait applicables au modèle souris.

a. Le réseau artériel cérébral

Le réseau artériel cérébral est constitué de deux systèmes artériels : le système carotidien crânialement, et le système vertébro-basilaire caudalement (Figure 1A et B). Les artères carotides internes traversent le crâne et se divisent en leurs collatérales et branches terminales qui assurent la vascularisation de la majeure partie de l'encéphale. Les artères vertébrales perforent quant à elles la dure-mère pour rejoindre la fosse crânienne postérieure ; elles fusionnent pour donner naissance au tronc basilaire, et les artères issues du système vertébro-basilaire vascularisent la région postérieure des hémisphères, le cervelet et le tronc cérébral.

Ces circulations crâniale et caudale s'anastomosent à la base du cerveau via les artères communicantes pour former un cercle artériel appelé le polygone de Willis. Ce dispositif anastomotique est classiquement considéré comme un moyen de compenser l'insuffisance d'irrigation en cas de sténose ou d'obstruction.

Les branches terminales de ces systèmes artériels, appelées artères cérébrales antérieure, moyenne et postérieure, s'épanouissent à partir du polygone de Willis (Figure 1A et B). Elles présentent chacune un segment basal qui donne des branches profondes destinées aux territoires profonds de l'encéphale, et un segment cortical qui donne des branches superficielles vascularisant les territoires corticaux. Les branches se divisent progressivement en artères et artérioles de plus petit calibre, qui cheminent le long de la surface puis pénètrent dans le tissu cérébral. On peut distinguer trois étages : tout d'abord le réseau bidimensionnel formé par les artères piales, hautement interconnectées, qui longent la surface de l'encéphale sous la pie-mère. Celles-ci se prolongent par des artérioles pénétrantes qui pénètrent de façon radiale dans le tissu cérébral. Puis le réseau se prolonge par des artérioles parenchymateuses une fois dans le parenchyme, jusqu'à former un réseau tridimensionnel de capillaires en profondeur (Figure 1C). Les artérioles pénétrantes représentent la partie du réseau la plus sensible à l'obstruction : l'obstruction d'une seule artériole pénétrante résulte en une mort cellulaire massive dans un cylindre de tissu de 500 μm de diamètre autour de l'artériole (Shih *et al.*, 2015).

b. La microcirculation cérébrale

L'intégralité du flux sanguin pénétrant dans l'encéphale passe nécessairement par le réseau microvasculaire pour en sortir, car il n'existe pas d'anastomose artério-veineuse dans l'encéphale sain (Shih *et al.*, 2015). Les vaisseaux de la microcirculation sont en proximité étroite avec les neurones et les cellules gliales (Figure 1D), chaque neurone se situant à moins de 15 μm d'un capillaire sanguin (Tsai *et al.*, 2009). La structure des capillaires cérébraux est détaillée en *infra*. Globalement, la densité vasculaire est homogène dans le cortex, malgré des variations entre les couches du cortex, puis la densité microvasculaire chute à l'interface entre substance grise et substance blanche (Shih *et al.*, 2015).

c. Le réseau veineux cérébral

Le réseau microvasculaire est drainé par les veinules pénétrantes puis les veines cérébrales profondes et superficielles, des veines dépourvues de valvules qui ramènent le sang à la surface du cortex où il se déverse au niveau de la dure-mère dans un ensemble de sinus veineux intra-crâniens. Les sinus convergent vers les veines jugulaires internes (Figure 2A et B).

d. Différences anatomiques entre l'humain et la souris

La longueur totale du réseau vasculaire est de 300 m environ chez la souris (Kirst *et al.*, 2020), contre 600 km chez l'humain adulte (Begley et Brightman, 2003). Malgré cet écart, la structure du réseau cérébrovasculaire reste hautement conservée entre ces deux espèces, faisant des rongeurs un excellent modèle du réseau vasculaire cérébral humain. Quelques différences peuvent tout de même être mentionnées : ainsi les souris *Mus musculus* peuvent présenter selon leur souche génétique un polygone de Willis incomplet ; l'artère communicante postérieure peut être absente, à l'origine d'une absence de communication entre les carotides internes et l'artère basilaire (Barone *et al.*, 1993).

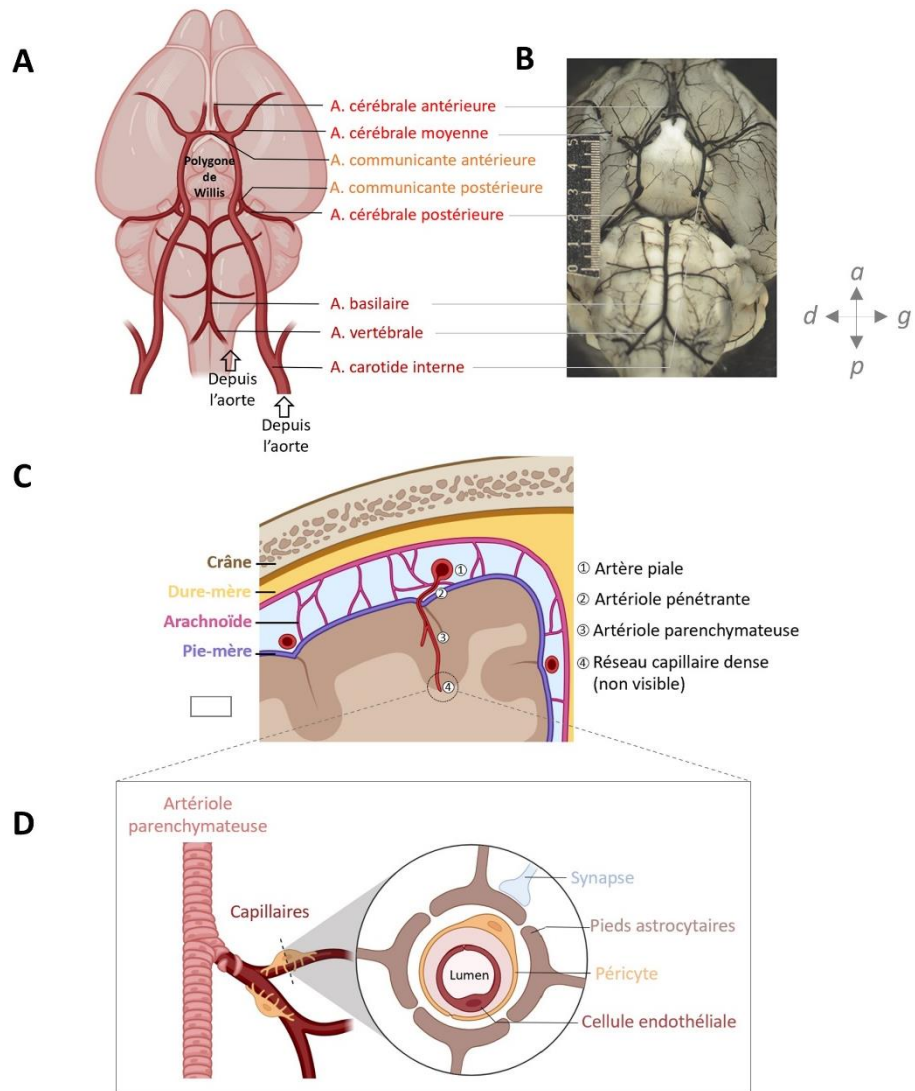


Figure 1 : Le réseau artériel cérébral

A : Schéma des principales artères cérébrales, vue face ventrale. **B** : Photographie de la face ventrale d'un encéphale de souris (Qian *et al.*, 2018). La règle mesure 5 mm. **C** : Schéma du réseau artériel à la surface de l'encéphale. **D** : Schéma de l'organisation du réseau capillaire cérébral.

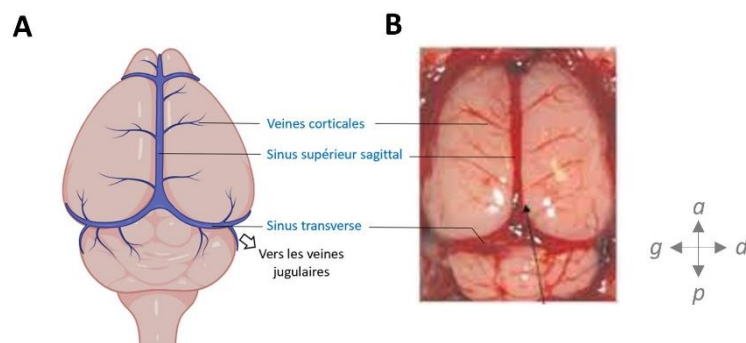


Figure 2 : Le réseau veineux cérébral

A : Schéma des principales veines cérébrales, vue face dorsale. **B** : Photographie de la face dorsale d'un encéphale de souris (Yang *et al.*, 2009).

B. Histologie du réseau vasculaire cérébral

a. L'unité neurovasculaire

Au niveau des capillaires cérébraux, l'espace périvasculaire disparaît et les cellules gliales assurent une couverture continue des capillaires. L'association de ces cellules avec les cellules endothéliales forme une unité fonctionnelle appelée unité neurovasculaire. Ce concept a été introduit au début des années 2000 (Harder *et al.*, 2002) pour désigner l'association développementale, anatomique et fonctionnelle entre la microvasculature, c'est-à-dire les cellules endothéliales, péricytes et cellules musculaires lisses, et les neurones et astrocytes, ainsi que leur réponse coordonnée face aux affections (Figure 1D). Au cours du temps, l'unité a été étendue aux cellules immunitaires (Castellani *et al.*, 2023). Récemment, en plus de ces cellules hautement interconnectées, l'influence de facteurs à distance sur l'unité neurovasculaire a été démontrée : on peut citer l'influence du microbiote (Nelson *et al.*, 2021), ou encore des hormones circulantes (Honarpisheh et McCullough, 2019). Grâce aux études de *single cell*, on commence également à se rendre compte qu'il n'existe pas une unité neurovasculaire, mais une grande diversité, avec des variations régionales et intrarégionales (Mäe *et al.*, 2021).

La fonction la mieux décrite de l'unité vasculaire concerne le couplage neurovasculaire. Le cerveau consomme environ 15 à 20% de l'oxygène et du glucose consommés quotidiennement : ces hauts besoins métaboliques, couplés à sa capacité limitée à stocker de l'énergie, requièrent un lien étroit entre activité neuronale et apport d'oxygène et de nutriments par le réseau vasculaire (Girouard et Iadecola, 2006). Le couplage neurovasculaire permet l'allocation dynamique du flux sanguin vers les aires cérébrales actives, grâce à un couplage entre le flux sanguin et l'activité électrique des neurones. Par ailleurs, l'unité neurovasculaire participe à la barrière hématoencéphalique (cf. *infra*).

b. La barrière hématoencéphalique

Le lit capillaire est le site des échanges entre le sang et le tissu cérébral. Il s'agit d'un réseau dense de vaisseaux interconnectés constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales aux propriétés structurelles et fonctionnelles hautement spécialisées. L'endothélium qui tapisse les capillaires cérébraux différenciés se distingue de celui retrouvé au niveau périphérique par ses propriétés uniques de barrière lui permettant de réguler étroitement le contenu des liquides extracellulaire et cérébrospinal. Cette barrière porte le nom de barrière hémato-encéphalique (ou BBB pour *blood-brain barrier*).

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont liées par des jonctions serrées empêchant toute diffusion paracellulaire de solutés (Rubin et Staddon, 1999). Seules les petites molécules liposolubles peuvent diffuser à travers la barrière, mais la membrane apicale des cellules endothéliales contient une forte concentration de transporteur rejetant dans le sang les molécules liposolubles indésirables, ce qui diminue la perméabilité de la barrière pour ces molécules (Rubin et Staddon, 1999). Les autres molécules doivent franchir l'endothélium par voie transcellulaire grâce à un transporteur spécifique. Cette barrière spécifique assure une protection et stabilisation du microenvironnement neuronal en facilitant l'entrée des substances nécessaires et la sortie des déchets tout en excluant les éléments toxiques. Seules certaines régions appelées organes circum-ventriculaires sont dépourvues de barrière et sont irriguées par des capillaires perméables : on peut citer en exemple l'organe subfornical (SFO).

Dans cette étude, nous nous intéressons à la vascularisation cérébrale dans le contexte bien particulier de la gestation.

2. La gestation chez la souris

A. Présentation générale de la gestation chez la souris

L'ouvrage *Biology of the Laboratory Mouse* (Grüneberg, 1942) offre un bon aperçu de la biologie de la reproduction de la souris *Mus musculus*. La souris femelle atteint sa maturité sexuelle à l'âge de 6 semaines. Il s'agit d'une espèce à polyoestrus : l'ovulation spontanée a lieu toute l'année, plus précisément tous les 4 jours jusqu'à la ménopause. En cas d'insémination, les ovocytes peuvent être fécondés dans l'ampoule jusqu'à 10-12 heures après l'ovulation. Les ovocytes fécondés rejoignent l'utérus 3,5 jours après insémination et l'implantation a lieu 5 jours après insémination. La gestation dure entre 18 et 21 jours, avec 5 à 10 petits par portée en moyenne selon la souche (Figure 3A).

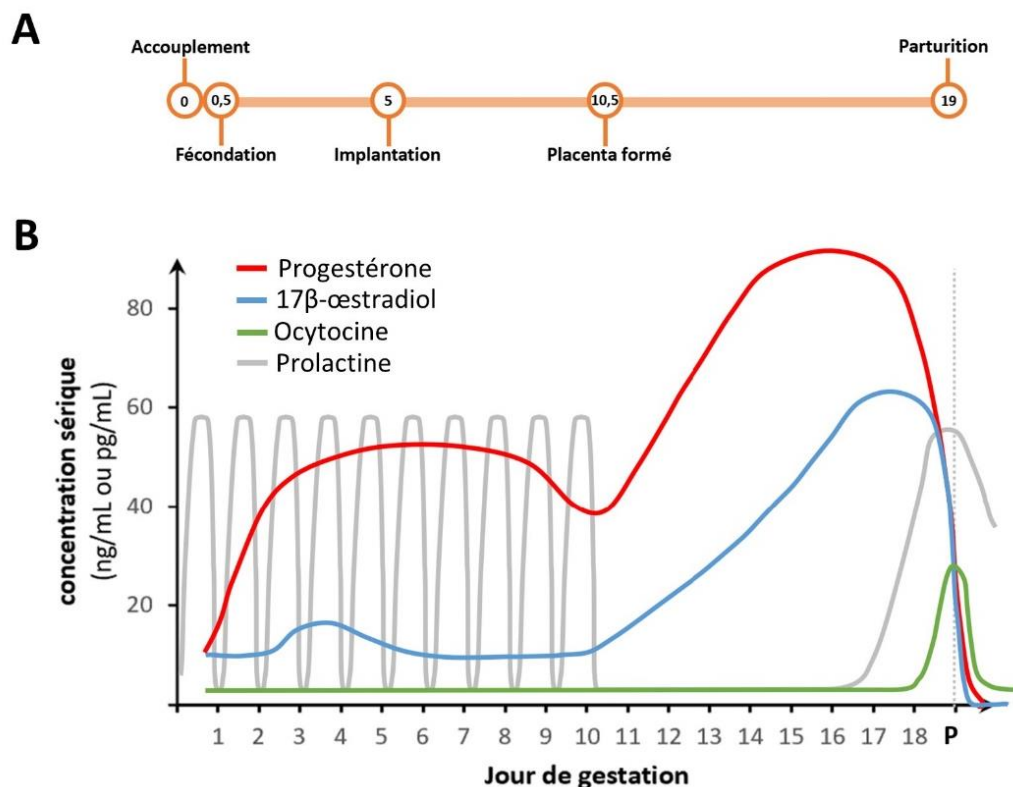


Figure 3 : La gestation chez la souris

A : Représentation du cours de la gestation chez la souris avec ses principales étapes.
B : Représentation schématique de l'évolution des niveaux hormonaux pendant la gestation. Les valeurs sont exprimées en ng/mL pour la progesterone et en pg/mL pour l'oestradiol, l'ocytocine et la prolactine, d'après Barkley *et al.*, 1979 et Kohl et Dulac, 2018.

B. Evolution des niveaux hormonaux pendant la gestation

Chez les mammifères, la gestation se caractérise par un bouleversement hormonal (Figure 3B).

a. Progestérone

La progestérone est une hormone stéroïdienne jouant un rôle majeur dans la fécondation, l'implantation et la gestation. Libérée en petites quantités par l'ovaire au cours du cycle œstral, elle amplifie la mobilité des spermatozoïdes et favorise leur cheminement jusqu'à l'ovocyte. Si un accouplement ou une stimulation cervicale mécanique ont lieu, une libération de prolactine va entraîner la lutéinisation, c'est-à-dire la formation de corps jaunes dont la durée de vie est prolongée. Ces corps jaunes deviennent matures au troisième jour de gestation et se mettent à produire de la progestérone en grande quantité jusqu'à la fin de la gestation vers 18 jours embryonnaires (Forbes et Hooker, 1957). La progestérone est responsable d'une inhibition des contractions myométriales tout au long de la gestation.

b. Œstradiol

L'œstradiol est une hormone stéroïdienne de la famille des œstrogènes sécrétée par l'ovaire. Une augmentation transitoire de ses niveaux autour du quatrième jour de gestation participe à l'implantation de l'embryon (Das *et al.*, 2021). Une fois l'embryon implanté, la synthèse ovarienne d'œstradiol diminue, avant de réaugmenter en fin de gestation avec pour effet de stimuler la mammogénèse et la lactogénèse et de faciliter les contractions utérines pendant la parturition. Après la naissance, les niveaux d'œstradiol chutent rapidement.

c. Ocytocine

L'ocytocine est un neuropeptide sécrété par des neurones hypothalamiques qui projettent sur la neurohypophyse où leurs terminaisons sécrètent l'ocytocine dans la circulation générale. Sécrétée de façon phasique avec des pulses espacés de quelques minutes pendant la parturition et la tétée, elle stimule les contractions utérines pendant la parturition, et stimule l'éjection de lait pendant l'allaitement. D'autres neurones à ocytocine projettent quant à eux vers des structures centrales et sont impliqués dans le déclenchement rapide du comportement maternel à la mise-bas (Brunton et Russell, 2008).

d. Prolactine

La prolactine est un neuropeptide sécrété par l'adénohypophyse. En début de gestation, sa sécrétion rythmique sous forme de pics biquotidiens assure un rôle lutéotrope en permettant la formation des corps jaunes fonctionnels. Sa sécrétion retourne à des niveaux basaux à mi-gestation, avant d'augmenter progressivement proche du terme pour préparer les alvéoles mammaires à la production de lait. Après la parturition, la levée d'inhibition de la prolactine, jusqu'à présent inhibée par les grande quantités de progestérone, lui permet de remplir son rôle lactogène essentiel (Brunton et Russell, 2008).

En plus de leurs effets systémiques, les hormones de la gestation activent des récepteurs spécifiques dans un certain nombre de centres cérébraux. Leurs effets pléiotropes sur les circuits neuronaux entraînent un large éventail de changements adaptatifs pour préparer l'encéphale à la gestation et la maternité.

C. Impact de la gestation sur l'encéphale

La gestation s'accompagne de modifications spécifiques dans le corps de la future mère. L'encéphale n'échappe pas à ces adaptations. Plus encore, son adaptation serait le facteur principal à l'origine des adaptations physiologiques du corps entier. Alors que l'adaptation de l'encéphale maternel après la naissance est surtout due à des stimuli externes en provenance de la progéniture, la plupart des modifications de l'encéphale pendant la gestation sont dues aux hormones de la gestation. Ces dernières entraînent des changements dans les systèmes neuroendocrines, à l'origine de l'adaptation de l'encéphale à la gestation. Ces changements dans la physiologie, la plasticité cérébrale et le comportement maternel seraient essentiels non seulement au développement fœtal et néonatal mais aussi à la santé physiologique et mentale de la mère (Hillner *et al.*, 2014).

a. Impact de la gestation sur le comportement

La neuroplasticité au cours de la gestation implique des modifications des circuits et de l'activité neuronale afin d'adapter la physiologie cérébrale et périphérique à la gestation et au post-partum. On peut citer en exemple l'adaptation de la réponse au stress ou encore le contrôle du métabolisme énergétique (Brunton et Russell, 2008).

Parmi les changements comportementaux qui accompagnent la progression de la gestation, on peut citer l'instauration du comportement maternel. Ce dernier regroupe un ensemble de comportements orientés vers la survie de la progéniture tels que la construction d'un nid, l'attirance vers les petits, les soins apportés aux petits ainsi que leur protection par agression des intrus. Les souris de laboratoire font preuve d'un comportement maternel spontané face à des petits, même lorsqu'elles sont nullipares. Toutefois, ce comportement est renforcé chez une mère avec une réponse plus marquée et plus sélective envers des signaux en provenance de petits. L'instauration de ce comportement maternel débute avant même la fin de la gestation grâce à la plasticité de certains circuits neuronaux (Ammari *et al.*, 2023) : par exemple, une souris gestante à qui on présente des petits aura plus tendance à se coucher sur ceux-ci qu'une souris nullipare (Figure 4A). Ces changements comportementaux peuvent être induits en mimant l'augmentation massive d'œstradiol et de progestérone due à la gestation, suggérant un rôle des hormones dans la mise en place préparatoire d'un comportement maternel pendant la gestation (Ammari *et al.*, 2023). Parmi les régions présentant une plasticité importante au cours de la gestation, on trouve l'aire pré-optique médiane (MPO), un noyau hypothalamique bordant le troisième ventricule. La MPO est une cible connue des hormones sexuelles : des neurones co-exprimant *Esr1* et PR, récepteurs respectivement à l'œstradiol E2 et la progestérone P4, jouent un rôle critique dans le comportement maternel (Wu *et al.*, 2014). Pendant la gestation, l'action des hormones sexuelles sur ces neurones de la MPO modifie l'excitabilité de ces neurones et entraîne une plasticité synaptique, à l'origine du changement comportemental préparatoire (Ammari *et al.*, 2023). A titre d'illustration, l'ablation de *Esr1* ou de PR dans les neurones de la MPO abolit l'augmentation du comportement maternel précédemment observée en fin de gestation (Figure 4A).

b. Impact de la gestation sur l'anatomie cérébrale

La neuro-imagerie structurelle révèle une réduction transitoire de la taille globale de l'encéphale chez les rongeurs femelles en début de post-partum (Hillner *et al.*, 2014), associée à une augmentation régionale de la concentration de matière grise chez les souris gestantes (Barrière et

al., 2021): ainsi en fin de gestation, on observe un accroissement de la concentration en matière grise dans des régions du circuit maternel telles que la MPO ou encore le noyau du lit de la strie terminale (BNST) (Figure 4B). Cette hypertrophie reflète probablement les changements induits par les hormones de la gestation, la MPO et la BNST exprimant toutes deux un grand nombre de récepteurs aux hormones stéroïdes et aux neuropeptides. De plus, une corrélation a été observée entre le niveau d'expression du comportement maternel et l'hypertrophie dans les structures impliquées dans le traitement des informations olfactives (comme le bulbe olfactif) et somatosensorielles (comme le cortex somatosensoriel). Toutefois, la nature de cette hypertrophie reste à déterminer. Il n'est pas exclu qu'elle ait une origine vasculaire.

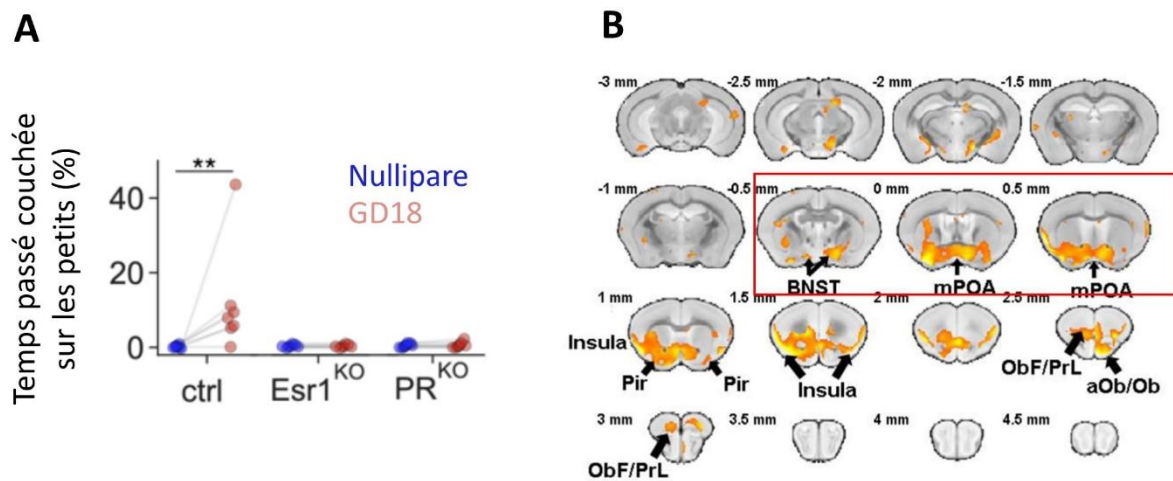


Figure 4 : Impact de la gestation sur l'encéphale de la future mère

A : Exemple d'impact de la gestation sur le comportement d'après Ammari *et al.*, 2023. Dans cette étude était relevé le temps que la femelle passait couchée sur au moins un des petits qu'on lui présentait pendant 15 minutes d'observation, chez des souris nullipares ou au 18^e jour de gestation (GD18). On remarque que chez des souris contrôle, les femelles gestantes passent significativement plus de temps couché sur les petits. En revanche, en cas d'ablation du récepteur Esr1 à l'œstradiol (Esr1^{KO}) ou du récepteur PR à la progestérone (PR^{KO}) dans les neurones de la MPO, les souris gestantes ne diffèrent plus du groupe contrôle pour ce comportement. n=7,8 et 9 souris, les statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA. **p<0,01.

B : Exemple d'impact de la gestation sur l'anatomie cérébrale d'après Barrière *et al.*, 2021. Coupes coronales illustrant les différences de concentration en matière grise, une mesure représentative du volume cérébral, entre des souris contrôle et des souris en fin de gestation. Un voxel apparaît coloré quand p<0,01. On note une augmentation de volume au niveau de l'aire pré-optique médiane ou MPO (mPOA) et du noyau du lit de la strie terminale (BNST), mais aussi d'autres régions : Pir = cortex piriforme, ObF = cortex orbitofrontal, PrL = aire prélimbique, aOB = noyau olfactif accessoire.

Ainsi, la gestation s'accompagne d'une plasticité majeure dans l'encéphale de la future mère. Qu'en est-il de la vascularisation cérébrale ? Tandis que la gestation est connue pour avoir des effets majeurs sur le système vasculaire systémique, que ce soit au niveau du flux sanguin ou au niveau de la structure des vaisseaux, le devenir de la vasculature cérébrale demeure encore mal connu.

D. Impact de la gestation sur la vascularisation cérébrale et systémique

a. Impact de la gestation sur l'hémodynamique

- *Au niveau systémique*

La gestation s'accompagne de profondes modifications hémodynamiques systémiques, décrites chez l'humain (Clapp et Capeless, 1997) : le volume sanguin augmente considérablement, et gagne jusqu'à 50% de sa valeur initiale. La masse érythrocytaire augmentant proportionnellement moins que le volume plasmatique, cette augmentation du volume sanguin s'accompagne d'une chute de l'hématocrite. Le débit cardiaque s'élève en parallèle via l'augmentation du volume d'éjection systolique, mais aussi dans une moindre mesure via une augmentation de la fréquence cardiaque. Enfin sous l'action de facteurs vasomoteurs, la résistance vasculaire chute au point d'entraîner une diminution de la pression artérielle à la mi-gestation, qui réaugmente jusqu'à atteindre des niveaux normaux près du terme. L'augmentation du débit cardiaque entraîne une augmentation du débit sanguin en périphérie, mais ce dernier est distribué de façon inégale entre les organes : il irrigue de façon préférentielle les reins et l'utérus.

- *Au niveau cérébral*

A l'état non gestant, le débit sanguin cérébral (DSC) est finement régulé afin d'assurer un apport suffisant d'oxygène et de nutriments tout en évitant une augmentation du volume sanguin dans l'encéphale, ce qui risquerait d'augmenter la pression intracrânienne ou de créer des lésions du système vasculaire. Il reste ainsi relativement constant malgré les changements de pression artérielle systémique, tant que celle-ci reste dans l'intervalle de 60 à 160 mmHg (Figure 5A) : cette capacité intrinsèque à maintenir le débit sanguin constant malgré des changements de pression artérielle est appelée autorégulation (Harper, 1966). L'autorégulation repose sur le rôle essentiel du monoxyde d'azote (NO), une molécule aux propriétés vasodilatatrices (Furchgott et Zawadzki, 1980). Le NO est en effet également produit dans l'encéphale, grâce à l'expression constitutive d'une NO synthase par certains neurones (Bredt et Snyder, 1989).

Pendant la gestation, le DSC demeure insensible aux changements hémodynamiques globaux qui affectent les organes périphériques. L'autorégulation du DSC est élargie en-deçà de 50 mmHg et au-delà de 160 mmHg (Figure 5A), protégeant l'encéphale maternel contre des variations extrêmes de la pression artérielle (Johnson et Cipolla, 2015). Parmi les mécanismes assurant la protection de l'encéphale en gestation, une adaptation de la réponse vasomotrice a été décrite au niveau de l'endothélium cérébral, modifiant la sensibilité de ce dernier aux facteurs vasomoteurs circulants sécrétés pendant la gestation. Il a été démontré expérimentalement que l'exposition d'artères cérébrales de ratte non gestantes à du plasma de femelle gestante entraîne une vasoconstriction, tandis que l'effet vasoconstricteur est absent quand on expose des artères cérébrales de rattes gestante (Amburgey *et al.*, 2010). Cette observation, spécifique de la vasculature cérébrale, suggère une adaptation de la circulation cérébrale pour combattre les facteurs vasoconstricteurs présents en fin de gestation.

Certains troubles gestationnels dépassent toutefois les capacités d'autorégulation du DSC. Ainsi en cas de prééclampsie, le DSC n'est plus capable de s'auto-régler en réponse à une pression artérielle accrue. Chez l'humain, les résultats parfois contradictoires s'accordent pour observer une augmentation de la vitesse du flux sanguin cérébral, à l'origine de perturbation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et d'œdèmes cérébraux (Johnson et Cipolla, 2015).

b. Impact de la gestation sur la structure des vaisseaux

- *Au niveau systémique*

Comme décrit précédemment, une grande proportion du débit cardiaque est orientée pendant la gestation vers l'utérus et le placenta, ce qui est permis par une chute de la résistance vasculaire dans ces territoires. Cette chute de résistance est liée à un remodelage de la circulation utérine (Osol et Mandala, 2009). Les artères utérines subissent une croissance transversale : l'hypertrophie des cellules musculaires lisses de la media entraîne une hypertrophie excentrique à la fois de l'artère utérine et des vaisseaux de plus petit calibre. Elles subissent également une croissance axiale par allongement des vaisseaux. Enfin, un processus d'angiogenèse forme de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire utérin préexistant (Osol et Mandala, 2009). Le remodelage vasculaire dépend de plusieurs processus cellulaires, eux-mêmes soumis à de multiples régulations. Le remodelage vasculaire pendant la gestation semble dépendre à la fois de facteurs locaux associés à l'implantation, la placentation ou la croissance fœtale, et de changements systémiques dans les niveaux hormonaux, particulièrement les œstrogènes et la progestérone.

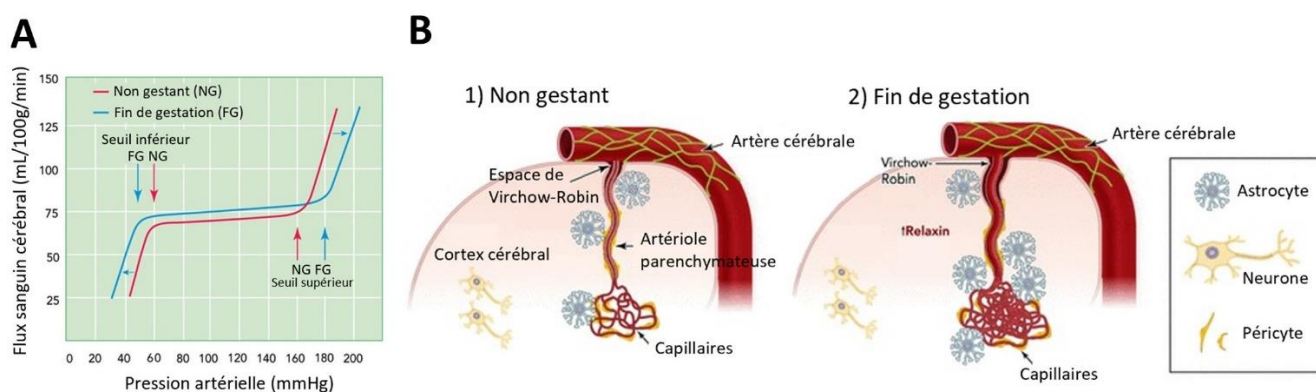


Figure 5 : Impact de la gestation sur la vascularisation cérébrale

A : Courbe d'autorégulation du flux sanguin cérébral à l'état non gestant et en fin de gestation, d'après Johnson et Cipolla, 2015. Tant que la pression artérielle demeure dans l'intervalle 60-120 mmHg, le flux sanguin cérébral demeure constant. La gestation étend les seuils inférieur et supérieur de la courbe d'autorégulation. **B** : Schéma illustrant les changements structuraux du réseau vasculaire cérébral pendant la gestation, d'après Johnson et Cipolla, 2015 : les artérioles parenchymateuses subissent un remodelage hypotrophique excentrique tandis que la densité capillaire corticale est augmentée.

- *Au niveau cérébral*

Une étude suggère des changements structuraux du réseau vasculaire cérébral pendant la gestation chez le rat (Cipolla *et al.*, 2011). Elle décrit à partir d'observations *in vitro* un remodelage hypotrophique excentrique des artérioles parenchymateuses, c'est-à-dire une augmentation du diamètre de la lumière vasculaire et un affinement de la paroi des vaisseaux (Figure 5B). Ce remodelage serait induit par la relaxine, une hormone circulante qui traverse la BBB et active une enzyme astrocytaire agissant de façon paracrine sur les artérioles parenchymateuses. Par ailleurs, les auteurs ont remarqué une augmentation de la densité capillaire dans le cortex cérébral postérieur pendant la gestation chez la souris (Figure 5B), mais la méthode utilisée, un immunomarquage sur coupe, est assez imprécise pour étudier la densité capillaire. Cette étude est la seule à ce jour à témoigner d'un potentiel remodelage cérébrovasculaire pendant la gestation.

Pourtant, un remodelage du réseau vasculaire à l'âge adulte a déjà été démontré à multiples reprises, y compris en conditions physiologiques.

3. Plasticité de la vascularisation cérébrale

Une augmentation transitoire de l'activité neuronale s'accompagne d'une dilatation ou d'une constriction locale des artérioles, permises par les cellules musculaires lisses de leur paroi, pour accroître le débit sanguin et s'adapter aux besoins métaboliques : c'est le couplage neurovasculaire, ou hyperhémie fonctionnelle. L'architecture cérébrovasculaire elle-même est quant à elle considérée comme stable chez l'adulte, avec un renouvellement négligeable des cellules endothéliales. Toutefois, des changements à long terme du microenvironnement cérébral peuvent entraîner un remodelage persistant de l'architecture cérébrovasculaire. Ainsi, outre les changements associés au développement et au vieillissement, des altérations du microenvironnement cérébral en conditions pathologiques ou dans certaines conditions physiologiques peuvent entraîner une modification de l'architecture cérébrovasculaire.

A. Plasticité pendant le développement et le vieillissement

La plasticité est élevée durant le développement. L'augmentation du volume cérébral s'accompagne d'une augmentation de la densité neuronale et capillaire (Figure 6). Des études basées sur de la microscopie deux-photons ont révélé une augmentation de la longueur des capillaires et du nombre de points de branchements jusqu'à 25 jours après la naissance chez la souris (Bogorad *et al.*, 2019). À l'inverse pendant le vieillissement, on observe des diminutions hétérogènes de la densité microvasculaire (Figure 6). Des études suggèrent que la plasticité cérébrovasculaire est affectée par le vieillissement, à l'origine d'une hypoperfusion cérébrale chronique qui peut accélérer les troubles cognitifs liés à l'âge (Bogorad *et al.*, 2019).

B. Plasticité en conditions pathologiques

- *Lésion neurovasculaire*

Des lésions du tissu cérébral s'accompagnent de façon assez évidente d'un remodelage du réseau vasculaire au niveau du site de lésion. Ainsi un accident vasculaire cérébral ischémique ou une lésion cérébrale traumatique entraînent une perte immédiate de l'architecture cérébrovasculaire suivie d'une réparation qui dure plusieurs semaines à plusieurs mois. La sévérité de l'accident vasculaire cérébral dépend fortement de la localisation de l'obstruction, et en particulier de la présence d'une circulation collatérale (Bogorad *et al.*, 2019).

- *Obésité*

Le réseau vasculaire peut également se remodeler de façon plus subtile et inattendue. Ainsi des travaux récents démontrent une augmentation de la densité vasculaire dans le noyau arqué suite à une exposition chronique à un régime riche en graisses et en sucres chez la souris (Gruber *et al.*, 2021). Cette densification sous le contrôle de la leptine participerait à la régulation de la pression artérielle périphérique dans ce contexte pathologique, suggérant un lien direct entre la plasticité structurelle vasculaire et les fonctions cérébrales dans des conditions pathologiques.

C. Plasticité en conditions physiologiques

En conditions homéostatiques, des variations de l'architecture et la fonction cérébrovasculaire semblent moins évidentes. Toutefois, des études ont révélé des modifications réversibles de la densité capillaire en réponse à des changements environnementaux.

- *Enrichissement ou privation sensorielle*

Les interactions neurovasculaires sont bien connues pour leur impact sur l'hémodynamique, avec une activité neuronale accrue entraînant un flux sanguin accru. Mais l'activité neuronale semble aussi avoir un impact sur l'architecture du réseau vasculaire. Ce concept a été introduit pour la première fois chez le rat : des rats juvéniles hébergés dans des environnements complexes présentent une densité accrue de points de branchement et une augmentation de l'aire de la surface capillaire comparés à des rats hébergés seuls dans des cages simples (Black *et al.*, 1990). De même, un apprentissage de tâches complexes chez le rat adulte est associé à une augmentation du nombre de synapses ainsi qu'à une augmentation de la densité microvasculaire (Black *et al.*, 1990). Puis le concept a été enrichi chez la souris juvénile : une réduction des entrées sensorielles au niveau du cortex à partir de la naissance est associée à une diminution de la densité vasculaire et du nombre de points de branchement. A l'inverse, une activité neuronale accrue induite par une stimulation des vibrisses pendant une semaine chez des souris juvéniles est associée à une augmentation de la densité vasculaire et du nombre de points de branchement (Lacoste et Gu, 2015). Ainsi, ces études suggèrent que l'activité neuronale pourrait être à l'origine d'un remodelage de l'architecture cérébrovasculaire (Figure 6).

- *Activité physique*

L'activité physique est associée à une plasticité neuronale accrue à l'origine d'une amélioration des fonctions cérébrales et en particulier cognitives, mais aussi à une plasticité cérébrovasculaire. Ainsi, des souris hébergées avec une roue leur permettant un exercice régulier présentent une angiogenèse et une densité microvasculaire accrue dans l'hippocampe et le striatum (Clark *et al.*, 2009 ; Van Der Borght *et al.*, 2009), (Figure 6). En revanche, une étude par microscopie intra-vitale chez des souris hébergées avec une roue n'a pas révélé de différence de la structure vasculaire au niveau du cortex moteur et somatosensoriel (Cudmore *et al.*, 2017).

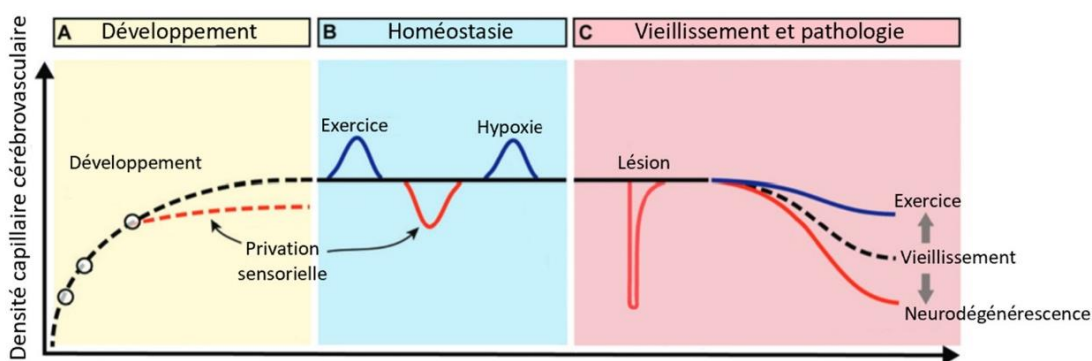


Figure 6 : Schéma récapitulant les circonstances d'observation d'une plasticité cérébrovasculaire d'après Bogorad *et al.*, 2019.

Le réseau vasculaire cérébral est donc bel et bien capable de se remodeler à l'âge adulte. On peut s'interroger sur les mécanismes cellulaires à l'origine de ce remodelage.

D. Les mécanismes de remodelage des vaisseaux

Les mécanismes de remodelage vasculaire connus à l'heure actuelle sont mis en œuvre pendant le développement et à l'âge adulte dans l'ensemble du réseau vasculaire du corps. Ils regroupent des modifications additives et soustractives.

a. Modifications soustractives

Des modifications soustractives ont lieu pendant le développement pour éliminer les vaisseaux surnuméraires, mais aussi pendant la vie adulte notamment lors de modifications cycliques de la vasculature telles que le cycle menstruel. Le signal à l'origine de cette régression vasculaire demeure mal connu : il pourrait résulter de voies de signalisation actives ou associées au retrait des facteurs de survie. Deux mécanismes participent à la régression vasculaire : l'apoptose et la migration cellulaire (Korn et Augustin, 2015).

Lors de la disparition complète d'un réseau vasculaire, par exemple lors de l'involution du tissu mammaire après la lactation, le retrait de facteurs de survie tels que le VEGF entraîne une apoptose massive des cellules endothéliales. En revanche, lors de l'élimination sélective de certains segments vasculaires, l'apoptose ne serait pas la source primaire de la régression mais un effet secondaire. La branche vasculaire devant être éliminée subit d'abord une constriction conduisant à une occlusion complète interrompant le flux sanguin (Figure 7C). Les cellules endothéliales migrent alors à distance du segment en régression grâce à une dissociation de la lame basale, et subissent alors une apoptose ou sont réintégrées dans le reste du réseau cellulaire (Franco *et al.*, 2015).

b. Modifications additives

Pendant le développement, les plexus vasculaires initiaux se forment par vasculogénèse, c'est-à-dire la formation de nouvelles structures vasculaires à partir de la prolifération de précurseurs. Puis cette croissance se poursuit pendant le développement des organes par une angiogénèse, c'est-à-dire la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Chez l'adulte, les cellules endothéliales restent en majorité quiescentes. Cependant, elles peuvent former de nouveaux vaisseaux par angiogénèse dans des conditions pathologiques mais aussi physiologiques nécessitant un apport accru de sang telles que la gestation, l'exercice physique, l'hypoxie, la croissance tumorale, *etc.* (Logsdon *et al.*, 2014).

On distingue l'angiogénèse par bourgeonnement (en anglais *sprouting angiogenesis*) et l'angiogénèse par intussusception. Lors d'une angiogénèse par bourgeonnement (Figure 7 : Les mécanismes de formation ou de rétraction des vaisseaux sanguins.), des cellules endothéliales bourgeonnent et migrent, densifiant le réseau localement ou à distance. Plus précisément, il s'agit d'un processus séquentiel impliquant l'activation des cellules endothéliales jusqu'alors quiescentes par un stimulus angiogénique, la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire, le bourgeonnement mené par une cellule de front (ou *tip cell* en anglais), l'élongation et la ramification par prolifération et migration des cellules de soutien, la formation d'un tube par ouverture d'une lumière, et l'anastomose avec les vaisseaux préexistants du réseau. Puis les capillaires nouvellement formés subissent une maturation pendant laquelle ils développent des jonctions serrées, et recrutent des péricytes et des pieds astrocytaires afin de demeurer stables et d'échapper à une régression. Enfin, les artérioles recrutent une couche de cellules musculaires lisses qui

permettent le contrôle du tonus vasculaire. Lors d'une angiogenèse par intussusception (Figure 7 : Les mécanismes de formation ou de rétraction des vaisseaux sanguins.), un même vaisseau unique se sépare en deux segments vasculaires, densifiant le réseau localement. Plus précisément, les étapes sont une vasodilatation du segment concerné, la formation des piliers dans la lumière, suivie de la séparation des vaisseaux.

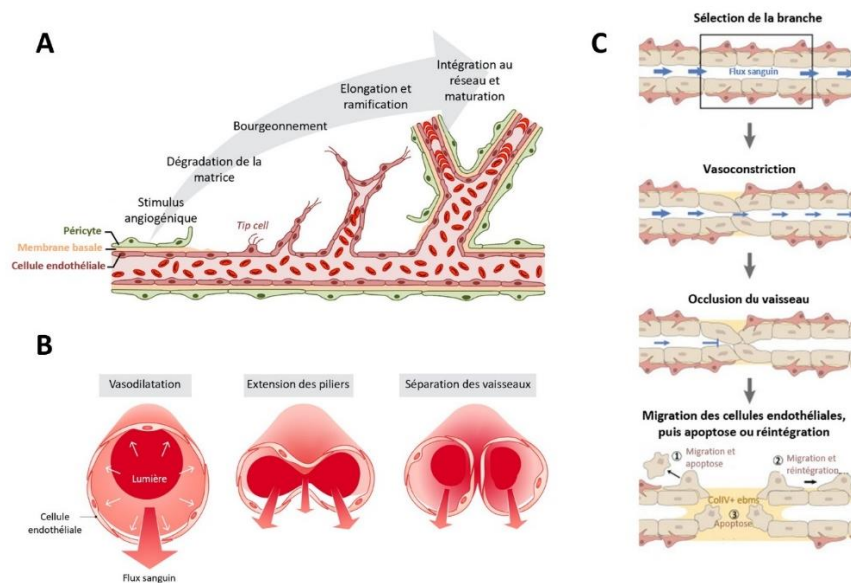


Figure 7 : Les mécanismes de formation ou de rétraction des vaisseaux sanguins.

De nouveaux vaisseaux peuvent se former par angiogenèse par bourgeonnement (A) ou par intussusception (B). Le panneau C illustre quant à lui le mécanisme de rétraction d'un vaisseau sanguin, d'après Laschke *et al.*, 2022, D'Amico *et al.*, 2020, et Korn et Augustin, 2015.

Ainsi, l'angiogenèse est assurée par les cellules endothéliales locales et ne requiert pas la mobilisation de cellules progénitrices endothéliales. Toutefois, en cas de lésions ou d'hypoxie plus importantes, des cellules progénitrices endothéliales sont mobilisées depuis la moelle osseuse pour participer à la régénération des cellules endothéliales et à la néovascularisation des tissus.

La famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFs pour *vascular endothelial growth factors*) et leurs récepteurs sont des régulateurs clé de l'angiogenèse. Sécrétés par les cellules parenchymateuses, les VEGFs constituent une famille de cytokines pro-angiogéniques qui augmentent la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il s'agit d'une famille vaste à la signalisation complexe : 5 gènes codent pour ces protéines (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF), avec chacun leurs variants d'épissage. Les protéines qui en résultent se lient à des combinaisons homo- ou hétéro-dimériques de récepteurs (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3). La régulation transcriptionnelle du VEGF répond à divers stimuli : de multiples situations peuvent ainsi être à l'origine d'une angiogenèse via des signaux variés. Par exemple en cas d'hypoxie, la diminution de la pression partielle en dioxygène entraîne une stabilisation des protéines HIFs qui agissent comme des facteurs de transcription pour le VEGF-A et ses récepteurs. Certaines hormones sont également connues pour leur effet sur le remodelage vasculaire. Ainsi pendant la gestation, la progestérone provoque l'expression de VEGF-A par les cellules stromales, à l'origine de la néovascularisation et du remodelage vasculaire de l'endomètre (Kim *et al.*, 2013). Au niveau cérébral, une augmentation de la leptine en cas d'alimentation à forte teneur en matières grasses et

en sucres entraîne une expression de VEGF dans les astrocytes de l'hypothalamus, à l'origine d'une expansion de la microarchitecture hypothalamique (Gruber et al., 2021).

Nous avons vu que la gestation s'accompagnait d'une profonde plasticité anatomique, physiologique et comportementale dans l'encéphale de la femelle gestante. Par ailleurs, une plasticité de la vasculature cérébrale est possible sous certaines conditions physiologiques à l'âge adulte. La question majeure de cette étude est la suivante : y a-t-il une plasticité vasculaire dans l'encéphale de la femelle gestante ?

Si peu d'études se sont penchées sur la plasticité cérébrovasculaire chez l'adulte, c'est sans doute en raison des difficultés techniques que cette problématique présente. Peu de technologies permettaient jusqu'à présent de visualiser le réseau vasculaire cérébrale de façon suffisamment fine, mais ces dernières années ont connu un développement de méthodes permettant la mise en évidence de modifications subtiles de l'architecture vasculaire.

4. Exemples de méthodes pour étudier le réseau vasculaire cérébral

La structure vasculaire cérébrale est particulièrement complexe à imager du fait de ses multiples échelles, des plus petits capillaires micrométriques jusqu'aux vaisseaux de gros calibre dont le diamètre dépasse le millimètre. De plus, les vaisseaux sanguins s'étendent dans de nombreuses directions au sein du tissu, créant un réseau complexe qui limite fortement l'usage de l'imagerie traditionnelle couplée au sectionnement des tissus. Chaque section, qui dépasse rarement la centaine de micromètres, présente en effet une image très limitée du réseau et contient des fractions de segment vasculaires déconnectés, limitant les conclusions au strict qualitatif. Ainsi les techniques d'immunohistochimie ou de microscopie électronique donnent certes des résultats cruciaux, notamment sur la structure de l'unité neurovasculaire, mais restent limitées à des régions cérébrales données sans pouvoir être facilement applicables à l'encéphale entier. De nombreuses études ont permis d'obtenir des résultats majeurs en se focalisant sur la rétine, dont le réseau vasculaire est plus accessible et simple d'étude, mais cette solution n'est pas satisfaisante pour une étude sur l'encéphale entier. Pour appréhender le réseau vasculaire cérébral dans toute sa complexité, il faut pouvoir imager des volumes plus conséquents. Un des enjeux de l'imagerie cérébrovasculaire est ainsi de trouver un équilibre entre volume d'échantillon et résolution spatiale : pour étudier le réseau vasculaire cérébral dans sa totalité, il faut imager un encéphale entier d'environ 2 cm³, tout en conservant une résolution suffisante pour discriminer les capillaires dont la taille descend jusqu'à quelques micromètres de diamètre. Ce paragraphe présente quelques-unes des techniques d'imagerie les plus courantes permettant une étude structurelle du réseau vasculaire cérébral sur l'encéphale entier, applicables en clinique ou restreintes au laboratoire, qui répondent de façon plus ou moins satisfaisante à ces problématiques.

A. Techniques applicables en clinique

Plusieurs techniques de neuroimagerie utilisées en médecine humaine et vétérinaire offrent un accès non invasif à l'architecture cérébrovasculaire et au flux sanguin cérébral. Elles permettent une étude de la dynamique des vaisseaux sanguins *in vivo* pendant le développement et à l'âge adulte, avec la possibilité de suivre une évolution chez un même individu.

a. Tomodensitométrie

La tomodensitométrie, plus communément appelée scanner ou CT-scan pour *Computed Tomography* en anglais, repose sur la mesure de l'absorption des rayons X par les tissus pour reconstruire une image bi- ou tridimensionnelle des structures anatomiques. En clinique, un examen sans produit de contraste permet d'observer rapidement le sang dans l'encéphale, dont la densité se démarque des tissus environnants, et de détecter en particulier des saignements cérébraux. Il est également possible de faire ressortir le contraste au cours d'un examen d'angiographie par tomodensitométrie en injectant par voie intraveineuse un produit de contraste qui rend hyperdenses les vaisseaux sanguins : cet examen est rapide, l'acquisition durant environ 5 minutes, et permet de détecter des anomalies structurelles artérielles telles que des anévrismes. La résolution spatiale du scanner, de l'ordre de 1 mm en moyenne, est toutefois trop élevée pour visualiser la microcirculation, et comme pour toute radiographie l'exposition répétée aux rayons X peut être nocive pour l'organisme. Le microCT (pour *Micro-scale computed tomography* en anglais) est une variante du scanner procurant un champ réduit mais une bien meilleure résolution. Utilisée en laboratoire chez les petits animaux, cette technique est complexe à mettre en œuvre et requiert des temps d'acquisitions élevés nécessitant des agents de contrastes de longue durée. Malgré ces difficultés, elle permet l'étude tridimensionnelle précise des structures vasculaires cérébrales. La résolution de 50 μm en moyenne permet de visualiser de petits vaisseaux, mais pas la microvasculature (Figure 8A).

b. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM repose sur la capacité des atomes d'hydrogène à résonner quand ils sont placés dans un champ magnétique puissant. L'IRM anatomique permet par exemple de détecter des gonflements associés aux AVC ischémiques. L'angiographie par résonance magnétique est un type d'IRM qui s'intéresse spécifiquement aux vaisseaux sanguins cérébraux, et qui présente l'avantage de ne pas utiliser de radiations ionisantes contrairement à l'angiographie par tomodensitométrie. Non invasive, elle est particulièrement utile pour détecter les anévrismes, mais sa résolution spatiale de l'ordre du millimètre ne permet pas de discriminer au-delà des principales branches artérielles du cercle de Willis. Le développement progressif des IRM à haut champ permet une résolution de plus en plus fine, qui peut descendre jusqu'à quelques centaines de micromètres pour les plus puissants d'entre eux, mais ces derniers ne sont accessibles qu'aux plus grands instituts.

Il est également possible d'effectuer des examens IRM *in vivo* chez les rongeurs de laboratoire, ce qui permet une analyse à la fois de la structure et du flux sanguin, mais la résolution reste limitée à une centaine de micromètres (Figure 8C).

B. Techniques utilisées au laboratoire

Plus invasives, les techniques de laboratoire offrent une meilleure résolution. Certaines peuvent être pratiquées *in vivo* bien qu'invasives, tandis que d'autres sont destructives et nécessitent le prélèvement de l'encéphale ce qui peut altérer sa structure et endommager les méninges.

a. Microscopie multiphotonique intravitale

La microscopie biphotonique intravitale présente une excellente résolution de quelques micromètres à peine. Après une craniotomie suivie de la pose d'une fenêtre crâniale, le réseau vasculaire peut être marqué grâce à l'injection de dextran conjugué à une molécule fluorescente dans la veine caudale. L'acquisition par microscopie biphotonique permet alors d'imager la fluorescence en profondeur et d'en extraire une cartographie précise de l'angioarchitecture, comme réalisé par Schaffer et collègues dans le cortex pariétal du rat (Schaffer *et al.*, 2006) (Figure 8D). Ce principe peut également être adapté pour étudier la dynamique du flux sanguin *in vivo* (Figure 8D), ou encore la pression partielle en oxygène du sang (Roche *et al.*, 2019). Cette technique nécessite certes une chirurgie délicate, mais présente l'avantage d'être utilisable *in vivo* pour suivre une évolution chez un même individu avec une excellente précision. Elle est toutefois limitée aux vaisseaux superficiels de l'encéphale du fait de la profondeur de pénétration limitée, et ne donne pas accès à de grands volumes. Il est donc difficile d'en extraire des informations sur l'organisation vasculaire à l'échelle de l'encéphale entier.

b. Clarification des tissus *ex vivo* et microscopie à feuille de lumière

Cette technique *ex vivo* repose sur l'imagerie en trois dimensions du tissu permise grâce à sa clarification, après un marquage spécifique des vaisseaux sanguins.

L'objectif de la clarification est de réduire l'hétérogénéité de l'indice de réfraction au sein de l'échantillon en retirant les composants dont l'indice dévie tels que l'eau, l'hydroxyapatite osseuse et les lipides : l'indice de réfraction des composants restants est homogénéisé, et la lumière peut alors se propager dans l'échantillon sans être dispersée. En parallèle, les pigments sont blanchis afin de limiter l'absorption de la lumière par le tissu. Finalement, le tissu est devenu transparent. Plusieurs protocoles de clarification existent (Vieites-Prado et Renier, 2021) dont iDISCO (Renier *et al.*, 2014), à base de solvants organiques. Celui-ci présente l'avantage d'être facile à implémenter et relativement peu coûteux.

Dans l'échantillon clarifié, on peut observer la fluorescence préalablement associée aux structures d'intérêt, c'est-à-dire les vaisseaux sanguins. Plusieurs protocoles ont été développés pour marquer les vaisseaux. Une molécule fluorescente perfusée en intracardiaque peut assurer un remplissage vasculaire, mais cette solution présente des problèmes de reproductibilité du fait de la perfusion, et ne permet pas de discriminer la nature des vaisseaux reconstitués. De même, des lignées génétiques aux parois vasculaires marquées peuvent être utilisées, mais les marquages résultants sont faibles et discontinus, ce qui pose problème pour le traitement des images à grande échelle. Dans leur protocole iDISCO, Renier et collègues proposent un immunomarquage. Ce dernier a pour avantage de ne pas reposer sur une perfusion intracardiaque et de permettre l'utilisation de marqueurs spécifiques à certains types de vaisseaux.

Grâce à la transparence de l'échantillon, la détection de la fluorescence peut se faire bien plus en profondeur que sur un encéphale *in vivo* avec une fenêtre crâniale : l'intégralité du volume d'un encéphale de souris peut ainsi être scanné. Plusieurs types de microscope peuvent être utilisés. La

microscopie à feuille de lumière (en anglais *lightsheet microscopy*) est un bon candidat pour les échantillons de grand volume. Elle présente les avantages de réduire le blanchissement de l'échantillon, d'avoir une grande vitesse d'acquisition, et d'autoriser de grands champs de vue. Sa résolution est certes plus limitée, mais elle demeure la meilleure option pour imager en série des échantillons de grande taille. C'est avec cet outil que l'équipe Renier reconstruit le réseau vasculaire cérébral entier chez la souris avec une précision inédite (Kirst *et al.*, 2020), (Figure 8C). Bien qu'un suivi chez un même individu soit impossible, une comparaison extrêmement fine peut être effectuée entre plusieurs groupes expérimentaux pour détecter des variations de l'architecture vasculaire entre différentes conditions.

Cette technique étant celle retenue pour cette étude, nous y reviendrons plus en détail au moment de la présentation des matériels et méthodes.

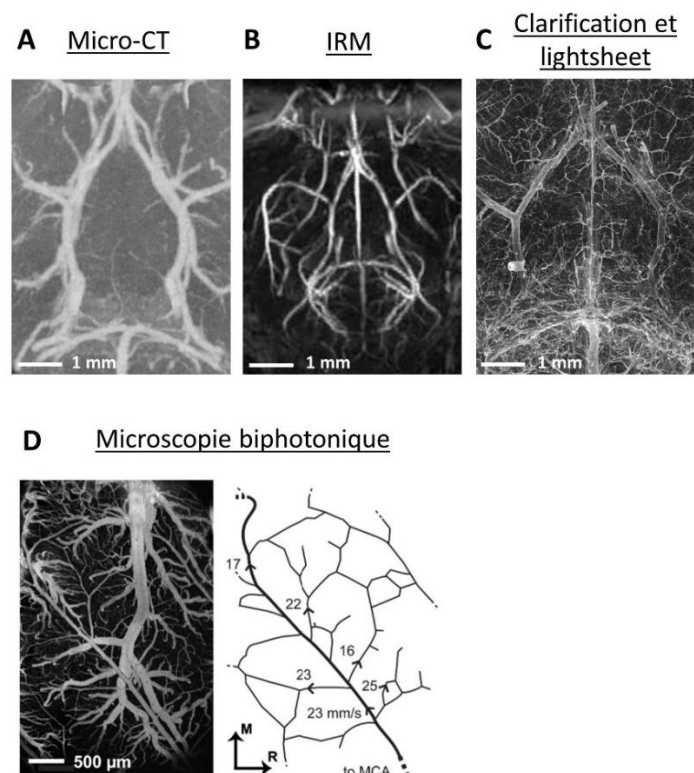


Figure 8 : Illustration de quatre méthodes d'imagerie cérébrovasculaire

Cette figure présente à titre de comparaison trois cercles de Willis imagés chez la souris respectivement par micro-CT (A : Illustration de l'utilisation de cette technique par Starosolski *et al.*, 2015. L'acquisition a duré environ 50 minutes), par IRM (B : Illustration de l'utilisation de cette technique avec un IRM 9.4 T par Langhauser *et al.*, 2012) et par microscopie à feuille de lumière après transparensation et immunomarquage par la technique iDISCO (C). D : Imagerie biphotonique au niveau du cortex chez la souris (Schaffer *et al.*, 2006). Le panneau de droite présente une cartographie effectuée à partir de l'image de gauche avec une estimation des flux sanguins dans les différents segments vasculaires. On notera l'excellente résolution spatiale mais la petite taille de champ.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

La gestation s'accompagne d'un remodelage vasculaire périphérique intense dans certains territoires tels que l'utérus. Une plasticité neuronale est également bien documentée dans l'encéphale de la future mère. Or des indices croissants convergent vers l'existence possible d'une plasticité vasculaire cérébrale sous certaines conditions chez l'adulte. L'objectif de cette étude était de mettre à profit les nouvelles techniques de reconstruction cérébrovasculaire pour révéler une éventuelle plasticité vasculaire induite par la gestation dans l'encéphale de la souris adulte, et le cas échéant de commencer à en étudier les mécanismes sous-jacents.

Nous avons vu que la plasticité vasculaire cérébrale pouvait répondre à des signaux variés tels que l'hypoxie, l'activité neuronale ou encore des signaux hormonaux, convergeant souvent vers la voie de signalisation du VEGF, et pouvait reposer sur plusieurs mécanismes cellulaires parmi lesquels une angiogenèse. Les recherches se sont donc articulées autour des questions suivantes :

- Peut-on mettre en évidence une plasticité cérébrovasculaire induite par la gestation chez la souris ?
- Si oui, peut-on préciser sa nature : est-elle due uniquement à un remodelage de vaisseaux préexistants, ou une angiogenèse est-elle impliquée ?
- Le VEGF est-il impliqué, et si oui par quelles cellules est-il produit ?
- Les hormones de la gestation sont-elles impliquées ?

2. Matériels et méthodes

- *Animaux et réglementation éthique*

Ce projet reposait sur l'utilisation de souris *Mus musculus musculus* de la souche C57BL6/JRj. Toutes les souris utilisées dans ce projet ont été obtenues auprès des laboratoires Janvier (France) et étaient des femelles âgées de 12 semaines. Les gestantes étaient toujours des primipares. A leur arrivée au laboratoire, elles étaient hébergées dans un secteur d'acclimatation pendant une semaine avant d'être déplacées dans la salle d'hébergement générale, à l'exception des femelles gestantes dont le stade de gestation nécessitait une perfusion avant la fin de la semaine d'acclimatation, ainsi que pour leurs contrôles. Les souris étaient hébergées dans l'animalerie de l'Institut du Cerveau de Paris, dotée d'une température et d'une humidité contrôlées (respectivement 21 ± 1 C et 40-70%), d'un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau, et d'un cycle jour/nuit de 12h:12h (les lumières étant allumées à 8h). Elles étaient hébergées par groupes de 3 à 6 pendant les expériences, à l'exception des femelles gestantes et de leurs contrôles nullipares qui étaient hébergées par paires. Pour les expériences concernant les implants de progestérone, les souris étaient hébergées au Laboratoire Lille Neurosciences & Cognition.

Toutes les procédures ont été déclarées conformes à la législation européenne en matière d'expérimentation animale (directive 2010/63/EU), et les manipulations ont été approuvées par les comités d'éthique institutionnels locaux et autorisées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

- *Perfusion*

Tous les protocoles présentés dans ce rapport nécessitent de prélever l'encéphale et de fixer le tissu. La technique de perfusion utilise la circulation sanguine pour favoriser la diffusion d'une solution fixatrice, le paraformaldéhyde (PFA), dans le tissu cérébral. Chaque souris a été anesthésiée avec 100 μ L d'EUTHASOL VET. SOLUTION INJECTABLE® (pentobarbital). L'absence de réflexe a été vérifiée en pinçant la patte. En l'absence de réflexe, la souris a été placée en décubitus dorsal, et le cœur a été exposé par une thoracotomie et la réclinaison de la paroi thoracique. Une aiguille reliée à une pompe via une tubulure a été insérée dans le ventricule gauche, et l'oreillette droite a été sectionnée. Une solution de PFA 4% à température ambiante a été injectée à un débit de 7 mL/minute pendant 4 minutes. Puis la tête de l'animal a été sectionnée, et le crâne délicatement ouvert pour extraire l'encéphale dans sa totalité. Chaque échantillon a ensuite été postfixé dans la PFA afin de parfaire la fixation du tissu. Cette post-fixation a duré deux heures pour les échantillons destinés au protocole iDISCO, toute la nuit dans tous les autres cas.

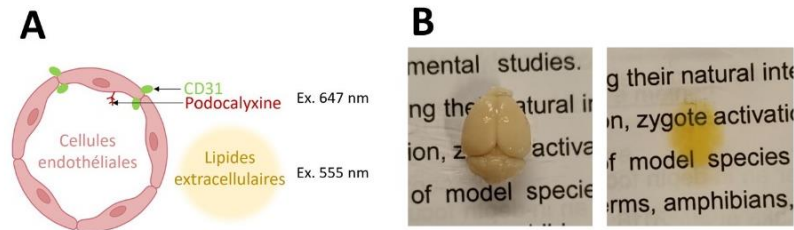
A cette étape, si nécessaire, la gestation des souris a été confirmée par une laparotomie pour visualiser la présence de foetus. En effet, les stades précoces de gestation peuvent être difficiles à confirmer avec certitude par une simple observation

- *Protocole iDISCO+*

La méthode retenue pour l'observation *ex vivo* du réseau vasculaire cérébral a été développée par l'équipe du Dr Nicolas Renier. Comme décrit précédemment, elle reposait sur un prétraitement du tissu au méthanol, un immunomarquage des vaisseaux sanguins (Figure 9A), puis une clarification de l'encéphale à l'aide de solvants organiques (Figure 9B), préparant à l'observation avec un microscope à feuille de lumière.

Les encéphales perfusés et disséqués ont ainsi subi le protocole iDISCO+ (Renier et al., 2014). Plus précisément, les encéphales ont été déshydratés dans une série croissante de dilutions de méthanol (Sigma-Aldrich) dans de l'eau (lavages de 1 heure dans du méthanol 20%, 40%, 60%, 80% et 100%). Le méthanol est un solvant organique permettant d'obtenir une solution parfaitement anhydre, compatible avec la suite du protocole. Un lavage supplémentaire de 2 heures dans du méthanol 100 % a été effectué pour éliminer l'eau résiduelle. Une fois déshydratés, les échantillons ont été incubés pendant une nuit dans une solution contenant 66% de dichlorométhane (Sigma-Aldrich) dans du méthanol, puis lavés deux fois dans du méthanol 100% (4 heures pour chaque lavage). Le dichlorométhane est un détergeant permettant d'éliminer les lipides d'un échantillon. Les échantillons ont ensuite été blanchis pendant une nuit à 4°C dans du méthanol contenant 5% de peroxyde d'hydrogène (Sigma-Aldrich). Cette étape permettait de blanchir les pigments contenus dans le tissu. Une réhydratation a été effectuée en incubant les échantillons dans du méthanol à 60 %, 40 % et 20 % (1 heure par lavage). Après ce prétraitement au méthanol, les échantillons ont été lavés dans du PBS deux fois 15 minutes et 1 heure dans du PBS contenant 0,2% de Triton X-100 (PBS-T, Sigma-Aldrich) et perméabilisés par une incubation de 24 heures à 37°C dans une solution de perméabilisation composée de 20% de sulfoxyde de diméthyle (Sigma-Aldrich), 2,3% de Glycine (Sigma-Aldrich, USA) dans du PBS-T. Afin de commencer l'immunomarquage, les échantillons ont d'abord été bloqués avec 0,2% de gélatine (Sigma-Aldrich) dans du PBS-T pendant 24 heures à 37°C. Le même tampon de blocage a été utilisé pour préparer les solutions d'anticorps. Les anticorps conjugués (anti-CD31, R&D systems AF3628, 1:330 et anti-Podocalyxine, R&D systems MAB1556, 1:1000) ont été incubés pendant 14 jours à 37°C avec une légère agitation. Ces deux anticorps permettent un marquage des vaisseaux sanguins (Figure 9A). Après l'immunomarquage, les échantillons ont été lavés dans du PBS-T (quatre fois 1 heure puis une nuit), déshydratés à nouveau dans une série de concentrations croissantes de méthanol/eau (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 100 % une heure chacune puis méthanol 100 % sur la nuit), suivie d'un lavage dans 66 % de dichlorométhane - 33 % de méthanol pendant 3 heures. Cette étape permettait d'éliminer l'eau et les lipides résiduels, ce qui achevait de rendre l'échantillon transparent (Figure 9B). Le méthanol a été éliminé par deux lavages finaux dans du dichlorométhane à 100 % (15 minutes chacun). Enfin, les échantillons ont été nettoyés et conservés dans de l'éther dibenzyle (Sigma-Aldrich) jusqu'à leur utilisation.

Immunomarquage et clarification (iDISCO+) :



Microscopie à feuille de lumière :

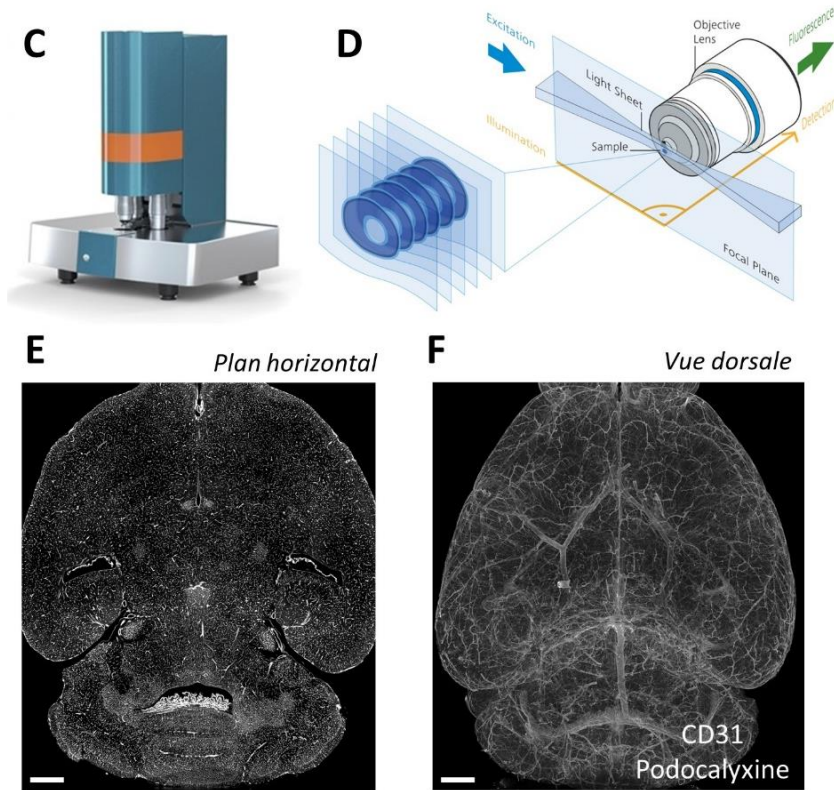


Figure 9 : Le protocole iDISCO

A : Illustration des anticorps utilisés pour l'immunomarquage : CD31 et la podocalyxine marquent la paroi des vaisseaux sanguins. **B** : Photographie d'un encéphale de souris avant (gauche) et après (droite) la transparençation du protocole iDISCO. **C** : Photographie d'un UltraMicroscope Blaze de LaVision (source : LaVision). **D** : Illustration du principe de la microscope à feuille de lumière (source : Zeiss Group). **E** : exemple de résultat après l'imagerie à feuille de lumière. **F** : Projection en Z de l'image précédente et des images adjacentes. La barre d'échelle représente 500 μm .

- *Microscopie de fluorescence à feuille de lumière*

Pour imager les réseaux vasculaires cérébraux entiers, nous avons choisi la microscopie à feuille de lumière, qui présente une excellente résolution spatiale et permet d'imager rapidement des plans entiers (Figure 9C et D). Les encéphales immunomarqués et clarifiés ont été imagés à l'aide d'un microscope à feuille de lumière (LaVision UltraMicroscope II ou LaVision UltraMicroscope Blaze, dont une photographie est représentée Figure 9C). Les acquisitions principales ont été réalisées avec le laser 639 nm - 70 mW et le filtre d'émission 680/30 nm pour Alexa Fluor-647, avec les objectifs LVMI-Fluor 4X/O.3 WD6 LaVision Biotec pour l'UM II et MI PLAN 4X/0.35 pour le Blaze, tous deux protégés par un capuchon d'immersion spécial pour les solvants organiques. Les images ont été acquises avec une caméra Andor CMOS sNEO pour l'UM II et une caméra sCMOS de 4,2 Mpx pour le Blaze. L'échantillon était situé dans une cuvette remplie d'éther de dibenzyle (Sigma-Aldrich). Les trois feuilles de lumière de droite et les trois feuilles de lumière de gauche ont été utilisées pour imager les encéphales entiers avec le Blaze, tandis que seules les trois feuilles de lumière de gauche ont été utilisées pour imager les héli-encéphales avec l'UMII. En effet, l'épaisseur de tissu à traverser étant moindre, la traversée du tissu par les seules feuilles de gauche était suffisamment satisfaisante pour se passer de celles de droite, évitant ainsi les problèmes d'alignement des feuilles entre les deux côtés. Dans les deux cas, le centre des feuilles de lumière a été soigneusement calibré au centre du champ et l'ouverture numérique des feuilles de lumière a été réglée à 0,03. La largeur du faisceau a été réglée au maximum et la puissance du laser a été réglée à 100 %. L'intervalle de profondeur entre les différents plans acquis a été fixé à 4 mm. Pour un plan donné, un seul champ n'était pas suffisant pour contenir tout l'échantillon : plusieurs champs de vue ont donc été acquis. Le recouvrement latéral entre ces différents champs a été fixé respectivement à 4% avec l'UMII et 1% avec le Blaze. L'acquisition complète a pris environ 2 heures pour un héli-encéphale et 6 heures pour un encéphale entier. À la fin de l'acquisition principale, l'objectif a été remplacé par un PLAN MI 1,1X/0,1 avec le module laser 488nm - 85 mW et le filtre d'émission 525/50 nm pour imager l'autofluorescence des tissus. Pour cette acquisition, le champ de vision a été recadré à la taille de l'encéphale, l'intervalle de profondeur entre les plans a été fixé à 6 mm et l'ouverture numérique de la feuille de lumière à 0,03. Les images ont été acquises avec le logiciel de traitement d'images ImSpector sous Microsoft Windows. Un exemple d'image obtenue (après assemblage des champs de vue pour le plan en question) est représenté Figure 9E (plan unique) et Figure 9F (projection en profondeur).

- *TubeMap*

L'imagerie de grands volumes génère des jeux de données conséquents, dont l'exploitation peut être un véritable défi. A titre d'exemple, la taille des images générées pour cette étude était d'environ 160 Go par échantillon. L'équipe a développé TubeMap (Kirst et al, 2020), un logiciel permettant l'exploitation de ces images pour générer un graphe modélisant le réseau vasculaire complet, avec annotation de la nature de chaque segment vasculaire et de sa localisation dans les régions cérébrales. Il permet ainsi la détection et la caractérisation de variations dans la topologie vasculaire à l'échelle de l'encéphale entier, avec une comparaison possible région par région. Pour cela, les mosaïques issues de la microscopie à feuille de lumière ont été stockées sur un serveur Lustre et traitées sur des stations de travail locales fonctionnant sous Linux Ubuntu 20.04LTS. TubeMap a été utilisé dans l'environnement Anaconda Python 3.7, la dernière version du code étant disponible à l'adresse <https://github.com/ChristophKirst/ClearMap2>. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3924619>. De façon simplifiée, les mosaïques ont été assemblées (Figure 10A) et l'image tridimensionnelle résultante a été binarisée (Figure 10B). Un squelette vasculaire a été extrait de l'image (Figure 10C) et transformé en graphe modélisant le réseau vasculaire (Figure 10D), annoté selon l'atlas de l'Allen

Brain Institute (Allen Brain Institute, 2017) grâce à l'image d'auto-fluorescence (Figure 10E). Chaque arête du graphe correspond à un segment vasculaire, et chaque nœud à un point de branchement. L'annotation des graphes sur l'anatomie cérébrale a permis de générer des cartes de densité des vaisseaux (Figure 10F), comparées entre les différentes conditions. La significativité des différences a été évaluée avec un test de Mann-Whitney, implémenté dans SciPy, et représentée par des cartes de p-values.

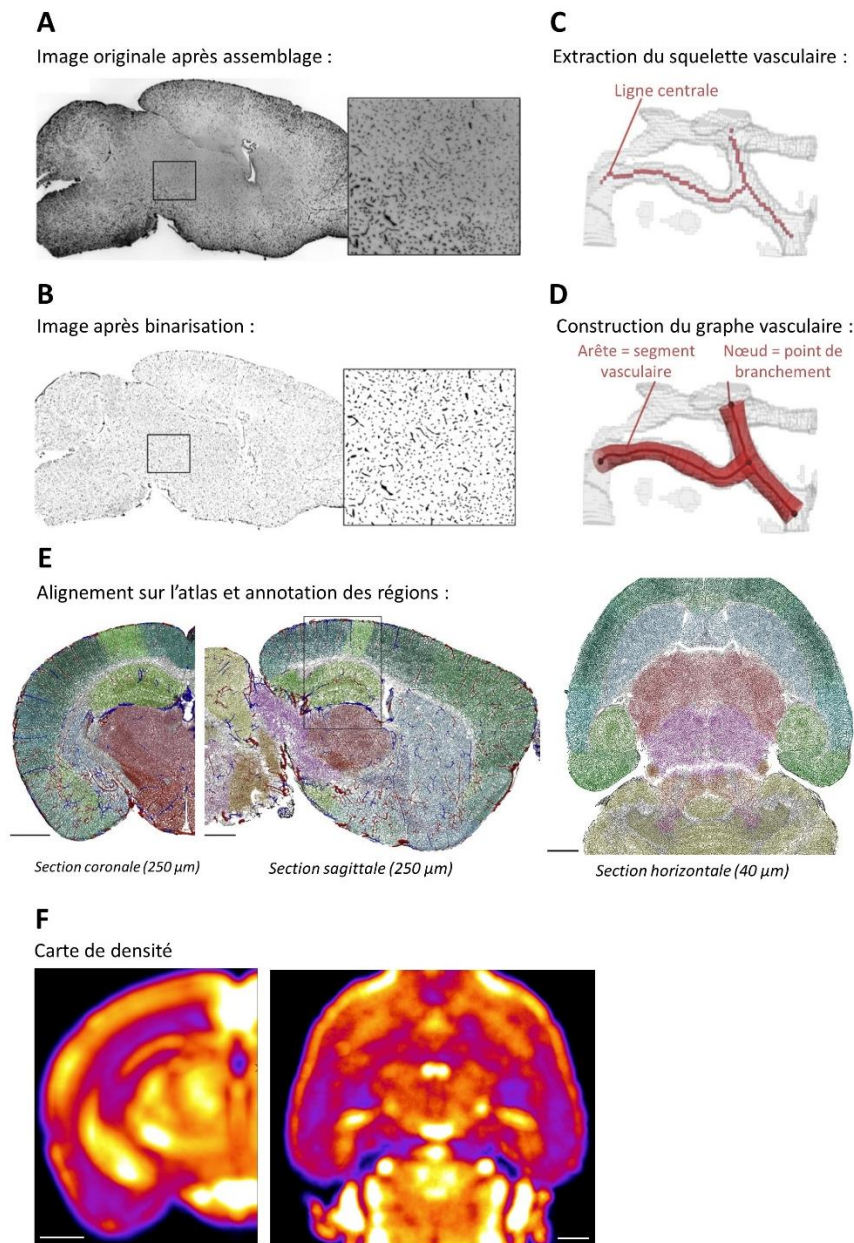


Figure 10 : Le principe du logiciel TubeMap

A : Exemple d'image après assemblage des différents champs de vue obtenus par microscopie à feuille de lumière. Cette image a ensuite été binarisée (**B**), puis le squelette vasculaire a été extrait (**C**) afin de construire un graphe modélisant le réseau vasculaire (**D**). Le graphe a ensuite été aligné sur un atlas afin d'annoter les différentes régions de l'encéphale (**E**). La barre d'échelle représente 200 μm . Enfin une carte de la densité vasculaire voxelisée a été générée (**F**). Ce sont ces cartes de densité qui ont été comparées entre les groupes expérimentaux afin d'identifier des variations de densité entre les groupes. Les images A à E sont issues de Kirst et al., 2020.

- *Implants de progestérone*

La progestérone voit ses niveaux plasmatiques augmenter de façon importante et prolongée pendant la gestation. Il s'agit notamment d'un signal à l'origine de l'angiogenèse utérine pendant la gestation et elle apparaît comme un candidat potentiel à l'origine de la plasticité vasculaire cérébrale. Les implants de progestérone et les implants contrôle ont été confectionnés par nos soins. 100 mg de progestérone (Sigma) a été mélangée à 300 mg de mastic contenant du diméthyl siloxane (Dowsil 732TM) et à de l'éthanol pur à l'aide d'embouts en plastique pendant 3 minutes jusqu'à évaporation complète de l'éthanol. Les implants contrôle étaient constitués de Dowsil seul mélangé à de l'éthanol. Le mélange a été introduit dans un tube SILASTIC™ à l'aide d'une seringue et laissé une nuit à température ambiante avant d'être conservé à 4°C. Le jour de l'implantation, 48 heures plus tard, le tube SILASTIC a été coupé en morceaux de 80 mg chacun (cette masse correspondant à la somme des masses du tube, du Dowsil et de la progestérone). Lors de la procédure d'implantation, les souris ont été anesthésiées sous isoflurane (4% pour l'induction ; 1,5%-2,5 pour l'entretien), et du Métacam (100 µl) a été administré par voie intrapéritonéale pour prévenir la douleur. Les souris ont été placées sur un coussin chauffant à 37°C et une incision cutanée de 3 mm a été faite avec des ciseaux dorsalement sur le cou préalablement épilé. 3 implants de 80 mg chacun, correspondant à une dose totale de 15 mg de progestérone, ont été placés en sous-cutané. La plaie a été refermée par la pose d'une agrafe chirurgicale.

- *Dosage de la progestérone par Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*

Un suivi de la progestéronémie a été effectué pour vérifier d'une part l'efficacité des implants et leur reproductibilité, et d'autre part comparer la progestéronémie avec les valeurs physiologiques. 30 µL de sang ont été prélevés au niveau de la joue de chaque individu avant l'implantation, 3 jours après l'implantation et 12 jours après l'implantation, centrifugés 15 minutes à 11 000 RPM, puis analysés tous ensemble avec un kit ELISA spécifique de la progestérone en suivant les instructions du fabricant (Demeditec Progesterone rat/mouse ELISA DEV9988). La cohérence du dosage a été vérifiée grâce à une gamme témoin.

- *Immunofluorescence*

Plusieurs analyses histologiques ont été effectuées par immunofluorescence sur des coupes flottantes.

Après la perfusion, les encéphales ont été postfixés sur la nuit dans la PFA 4%, puis rincés dans du PBS. 48 heures avant la coupe, les encéphales ont été transférés dans une solution de saccharose concentré à 30% dans du PBS à 4°C. Puis les échantillons ont été congelés à -20°C et coupés à l'état congelé à une épaisseur de 35 µm avec un microtome à congélation. Les sections flottantes, initialement collectées dans du PBS, ont été incubées dans du PBS + 0,2% Triton + 0,2% Gélatine (solution de blocage) pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation, puis incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans la même solution. Les coupes ont ensuite été lavées 3 fois pendant 5 minutes à température ambiante dans du PBS + 0,2% Tween 20 et incubées pendant une heure dans l'anticorps secondaire et le Hoechst dilués au millième dans la solution de blocage. Après incubation, les sections ont été lavées 3 fois pendant 5 minutes à température ambiante avec du PBS + 0,2% Tween 20 et montées sur des lames avec du Mowiol. Les anticorps sont décrits dans le tableau 1.

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences

Anticorps	Espèce hôte	Fournisseur	Concentration utilisée
Anti-CD31 = Anti-Pecam1	Chèvre	R&D Systems (ref AF3628)	1:330
Anti-GFAP	Poulet	Aves (ref GFAP)	1:1000
Anti-Ki67	Poulet	Invitrogen (PA5143573)	1:2000
Anti-Erg	Lapin	Abcam (ref ab92513)	1:1000

- *Imagerie*

Pour les immunomarquages dirigés contre CD31 dans l'ARH : les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8X (objectif 40X, résolution 1024x1024 pixels, z-stack de 22,5 µm avec un pas de 1,5 µm). La projection z maximale a été calculée, et les cellules de front quantifiées manuellement. 2 coupes ont été quantifiées pour chacune des 3 souris de chaque groupe. Pour les immunomarquages dirigés contre CD31 dans la MPO : les images ont été acquises à l'aide d'un microscope spinning disk confocal 3i Zeiss (objectif 20X, résolution 1024x1024 pixels, z-stack de 6 µm avec un pas de 1,5 µm). La projection z maximale a été calculée, et les cellules de front quantifiées manuellement. 3 coupes ont été quantifiées pour chacune des 6 souris de chaque groupe.

Pour les immunomarquages dirigés contre GFAP : les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal Leica SP8X (objectif 40X, résolution 1024x1024 pixels, z-stack de 22,5 µm avec un pas de 1,5 µm). La projection z maximale a été calculée et les images ont été analysées à l'aide de Fiji. Un rectangle de 60 x 40 µm² a été découpé soit dans la MPO, soit autour du ventricule, et le même seuil a été appliqué à toutes les images pour définir un masque correspondant au signal GFAP, ce qui a permis de mesurer la zone de couverture de la GFAP.

Pour les immunomarquages dirigés contre Ki67 et Erg : les images ont été acquises à l'aide d'un microscope spinning disk confocal 3i Zeiss (objectif 20X, résolution 1024x1024 pixels, z-stack de 6 µm avec un pas de 1,5 µm). La projection z maximale a été calculée, et les cellules KI67+ et/ou Erg+ ont été quantifiées manuellement. 3 coupes ont été quantifiées pour chacune des souris.

- *Etudes de perméabilité vasculaire avec la biotine*

La biotine a été choisie comme marqueur de perméabilité vasculaire : le principe général de cette étude était d'injecter la biotine dans la circulation générale, avant d'évaluer sa diffusion dans le parenchyme cérébral en la révélant à l'aide d'une streptavidine conjuguée à un marqueur fluorescent. Une barrière hématoencéphalique intacte ne devrait pas laisser diffuser la biotine du compartiment sanguin vers le tissu cérébral. Par conséquent, la mise en évidence d'une diffusion de biotine témoignerait d'une perméabilité vasculaire anormalement accrue. Pour cela, 10 ml d'une solution de biotine (0,5 mg/ml, dilution dans du PBS) a été injectée par voie intracardiaque, suivie immédiatement d'une perfusion de 4 minutes avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 1% selon le protocole décrit précédemment. Les encéphales ont été disséqués et post-fixés 3 jours dans du PFA 1% à 4°C, puis des sections de 100 µm ont été coupées à l'aide d'un vibratome sans inclusion préalable dans de la paraffine. Les coupes flottantes ont été collectées dans du PBS puis incubées 30 minutes dans une solution de streptavidine (streptavidine 1:100 dans PBS + 0,5% Triton + 0,1 mM CaCl₂) à température ambiante à l'abri de la lumière, rincées deux fois avec du PBS + 0,1% Tween, une fois avec du PBS, et montées sur lame avec du Mowiol. Les lames ont été imagées avec un microscope confocal Leica SP8X (objectif 20X, résolution 1024x1024 pixels, z-stack de 60 µm avec un pas de 1,5 µm). Les réactifs sont décrits dans le Tableau 2 : Réactifs utilisés pour les tests de perméabilité de barrière hématoencéphalique.

Tableau 2 : Réactifs utilisés pour les tests de perméabilité de barrière hématoencéphalique

Réactif	Fournisseur	Concentration
Biotine : EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermofisher (réf 21335)	5 mg/souris
Streptavidine conjuguée à l'Alexa Fluor™ 647	Thermofisher (réf S21374)	1:100

- *Analyse single cell*

L'analyse *single cell* a été réalisée avec Seurat v4 (Hao *et al.*, 2021) sur la base du jeu de données HypoMap (Steuernagel *et al.*, 2022).

- *Statistiques*

La moyenne et l'erreur standard de chaque groupe ont été calculées, et un test t non apparié effectué.

- *Schémas*

Les schémas ont été effectués avec BioRender et PowerPoint.

3. Résultats

A. Mise en évidence d'une plasticité cérébrovasculaire gestationnelle chez la souris

Le premier objectif de cette étude était de révéler des modifications de la densité vasculaire au cours de la gestation. Pour cela des souris contrôle, toutes nullipares, ont été comparées à trois groupes de souris réparties selon leur stade de gestation : en fin de premier tiers de gestation (GD6), proches du terme (GD15), ou quelques jours après la mise-bas (P3) (Figure 11A).

Les encéphales des souris ont été fixés, transparisés et immunomarqués selon la technique iDISCO+ (Renier *et al.*, 2014), puis imagés avec un microscope à feuille de lumière afin de reconstituer et comparer leur réseau vasculaire complet grâce à l'algorithme TubeMap (Kirst *et al.*, 2020). TubeMap permet de détecter des fourches vasculaires, correspondant à la réunion de trois segments vasculaires. Nous les appellerons par la suite points de branchement vasculaires (Figure 11B). La densité de points de branchement est proportionnelle à la densité de longueur des vaisseaux : il s'agit donc d'une métrique intéressante pour quantifier la densité vasculaire d'un territoire. TubeMap permet également la détection de vaisseaux interrompus (Figure 11B) : très présentes pendant le développement et normalement absentes d'un réseau vasculaire mature où tous les capillaires sont connectés, ces structures témoignent d'un remodelage du réseau via l'extension ou la rétraction de segments vasculaires.

La comparaison entre les femelles nullipares et les gestantes à GD6, GD15 et allaitantes P3 a révélé une augmentation de la densité de points de branchement dans plusieurs territoires cérébraux chez les femelles gestantes par rapport au groupe contrôle, en particulier au niveau de l'hypothalamus. Ainsi la densité vasculaire semblait par exemple accrue au niveau de l'aire pré-optique médiane (MPO), comme on peut le deviner sur les cartes de densité vasculaire ou sur les graphes modélisant le réseau vasculaire (Figure 11C). Ces impressions ont été confirmées par la comparaison statistique. Deux régions sont illustrées Figure 12 et Figure 13 : la MPO et le noyau arqué de l'hypothalamus (ARH), deux régions majeures pour la signalisation hormonale et impliquées dans le comportement maternel, la thermorégulation et la prise alimentaire (Ammari *et al.*, 2023).

A GD6, on n'observait pas de densification vasculaire dans la MPO, bien que l'aire pré-optique latérale (LPO) voisine soit significativement densifiée (Figure 12A). En revanche, une densification significative des points de branchement était visible dans la MPO à GD15, associée à une augmentation significative de la densité de vaisseaux interrompus (Figure 12B). A P3, le réseau vasculaire semblait encore densifié au niveau de la MPO, mais les vaisseaux interrompus ne semblaient pas significativement plus nombreux que chez le groupe contrôle. Au niveau de l'ARH, la présence de vaisseaux interrompus augmentait significativement à GD15 (Figure 13A), mais la densité vasculaire elle-même n'était augmentée qu'à P3 (Figure 13B).

On peut ainsi supposer qu'un processus actif de remodelage était en cours à GD15 au niveau de la MPO et de l'ARH. Ses effets sur l'augmentation de la densité du réseau vasculaire étaient déjà visibles à GD15 dans la MPO, et se prolongeaient après la mise-bas, bien que le processus ne semblait plus actif à cette date. Dans l'ARH, ils étaient absents à GD15 mais se retrouvaient à P3.

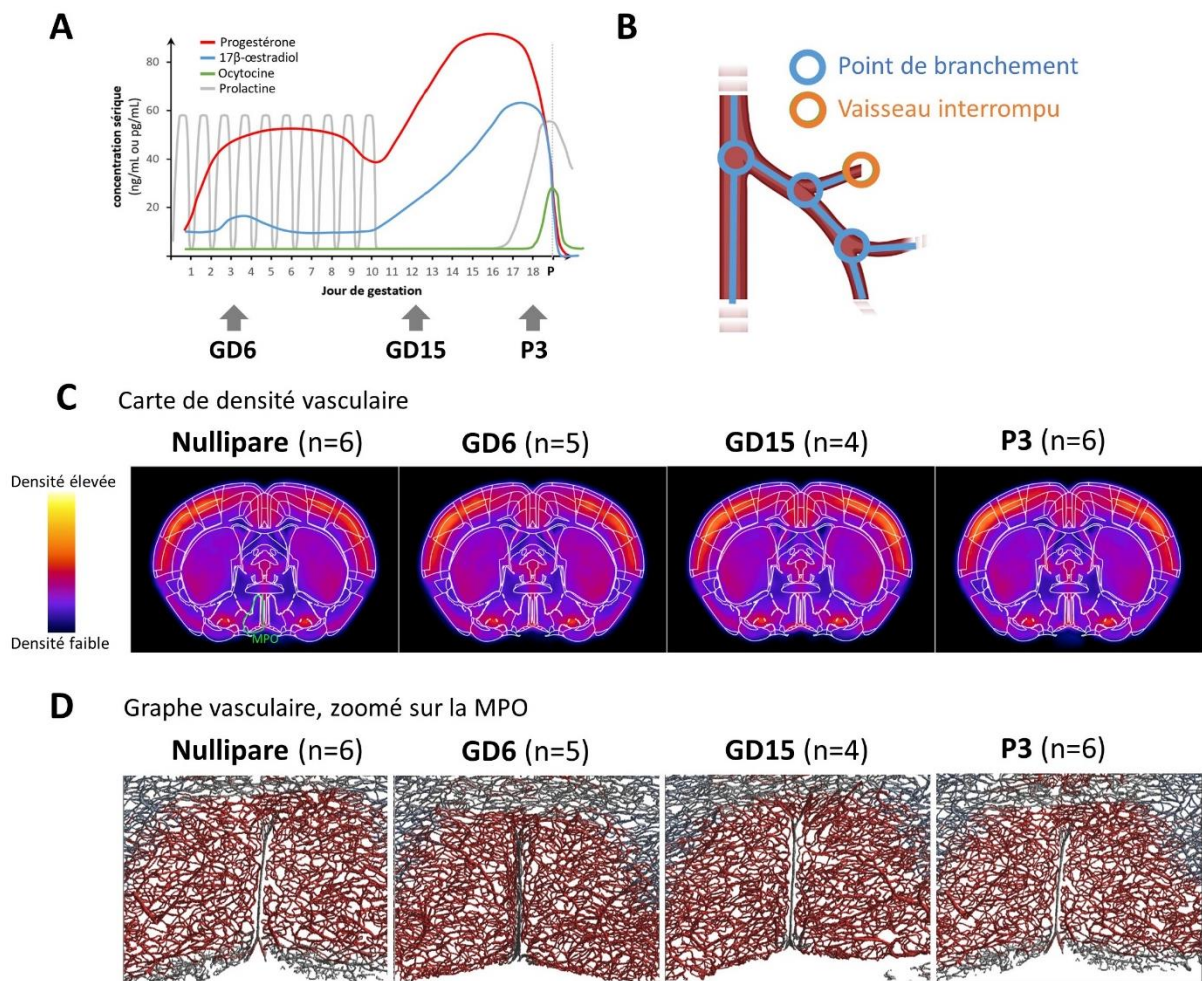
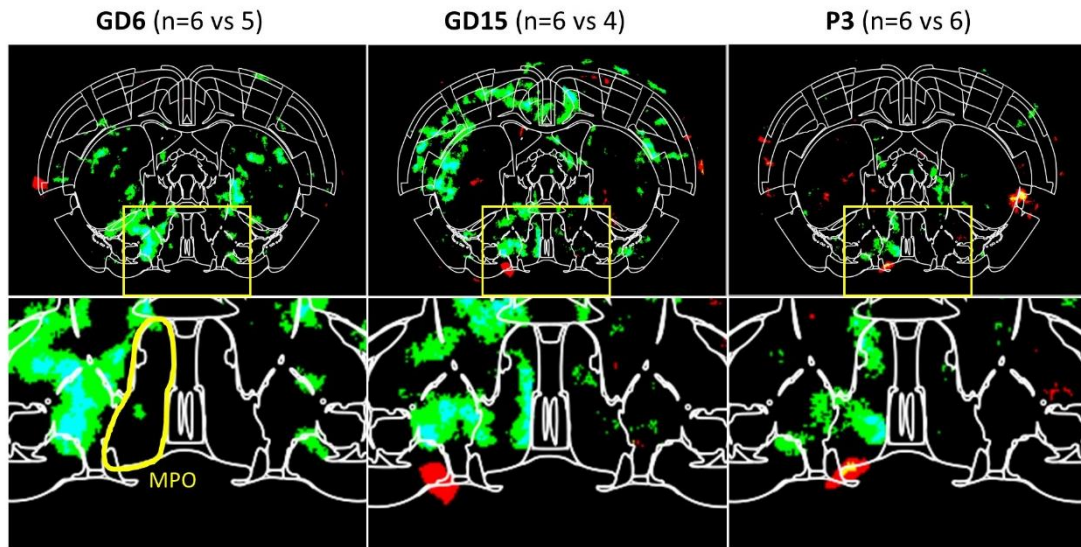


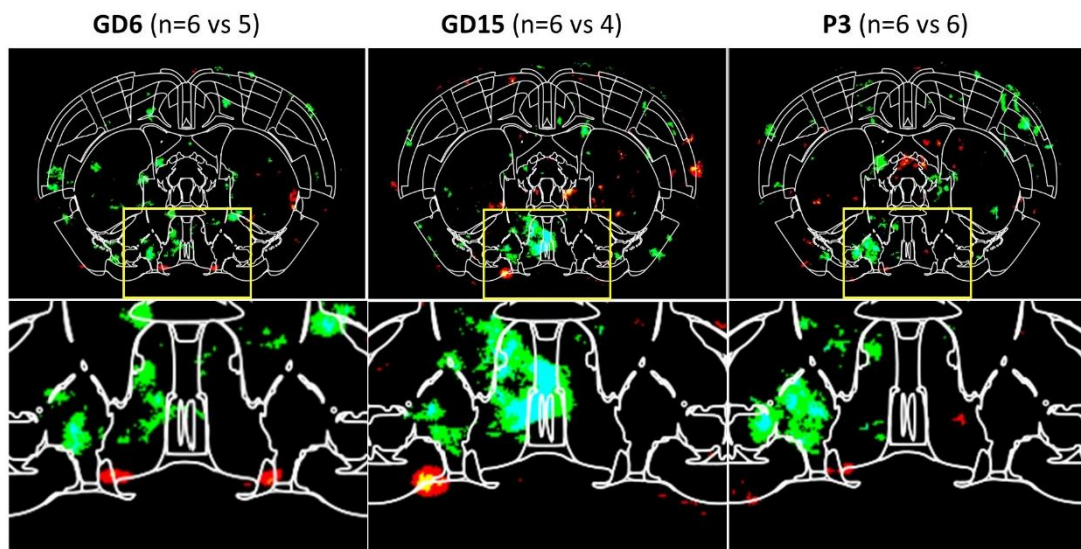
Figure 11 : Densification vasculaire dans l'hypothalamus pendant la gestation

A : Idem figure 3B, avec illustration des stades gestationnels choisis pour l'étude : jour de gestation 6 (GD6), 15 (GD15) et jour post-partum 3 (P3). **B** : Schéma illustrant la notion de point de branchement (fourche reliant plusieurs segments vasculaires) et de vaisseau interrompu (cul-de-sac vasculaire). **C** : Cartes de densité vasculaire issues de l'algorithme TubeMap : coupe coronale passant par l'aire pré-optique médiane (MPO, surlignée en vert) ; plus la couleur est chaude, plus la vasculature est dense au niveau du voxel considéré. **D** : Agrandissement du graphe modélisant le réseau vasculaire cérébral au niveau de la MPO (projection de 100 μm d'épaisseur).

A Carte de p-value des **points de branchement**



B Carte de p-value des **vaisseaux interrompus**

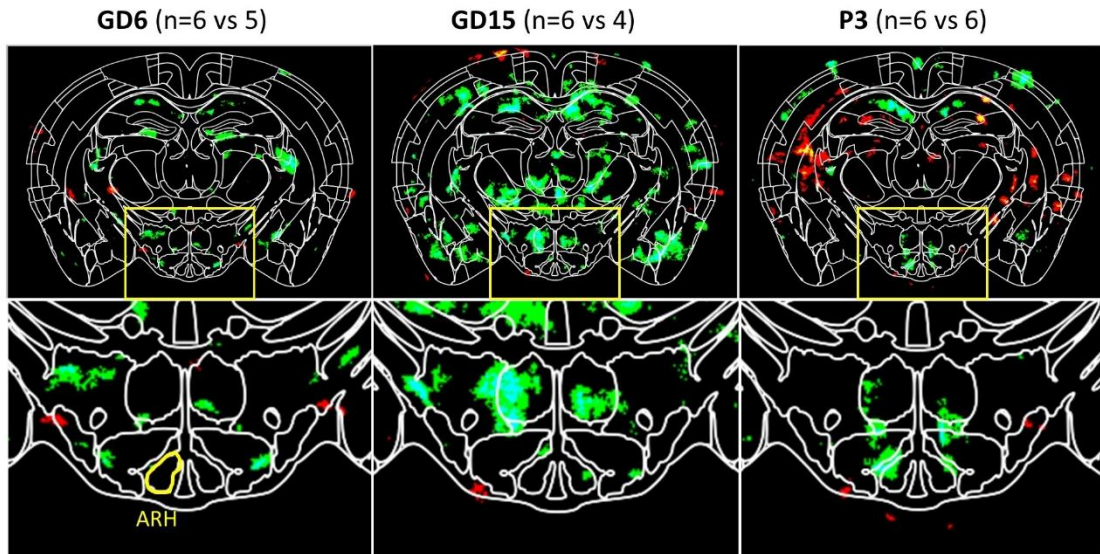


Densité accrue chez les gestantes : $p < 0.05$, $p < 0.01$
Densité diminuée chez les gestantes : $p < 0.05$, $p < 0.01$

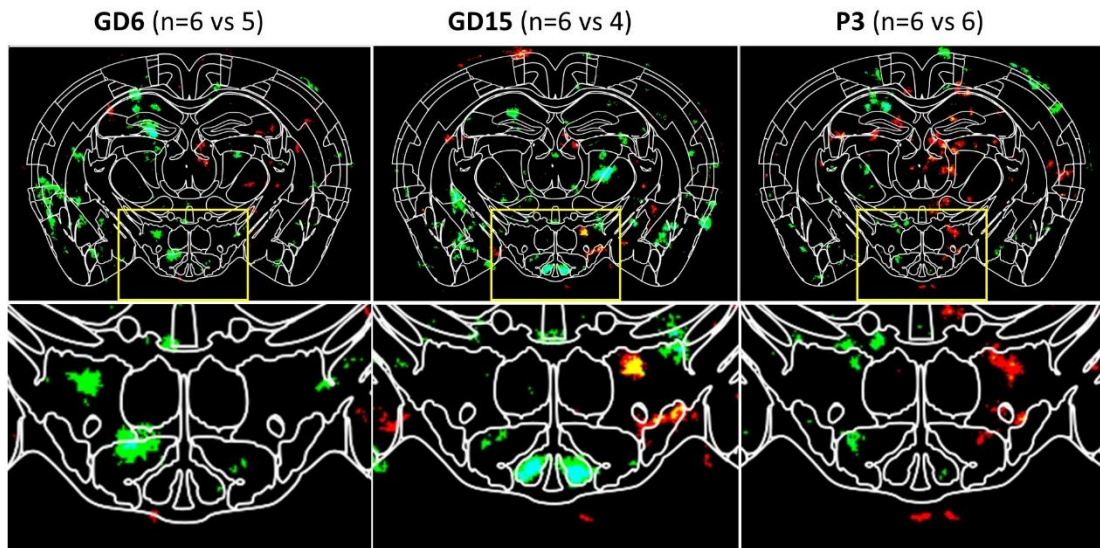
Figure 12 : Densification vasculaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation

A : Coupe coronale au niveau de la MPO de la carte des p-values résultant de la comparaison statistique de la densité de points de branchement entre les souris nullipares et gestantes (test U de Mann-Whitney). Le panneau du haut représente la carte de l'encéphale entier, tandis que le panneau du bas représente un agrandissement au niveau de la MPO (aire pré-optique médiane, surlignée en jaune). Les couleurs froides représentent une augmentation de la densité vasculaire chez les gestantes (vert : p -value $< 0,05$, bleu : p -value $< 0,01$), tandis que les couleurs chaudes représentent une diminution de la densité vasculaire chez les gestantes (rouge : p -value $< 0,05$, jaune : p -value $< 0,01$). **B** : Idem pour les vaisseaux interrompus. Dans les deux cas, $n=6$ femelles nullipares, 5 GD6, 4 GD15 et 6 P3.

A Carte de p-value des **points de branchement**



B Carte de p-value des **vaisseaux interrompus**



Densité accrue chez les gestantes : $p < 0.05$, $p < 0.01$
Densité diminuée chez les gestantes : $p < 0.05$, $p < 0.01$

Figure 13 : Densification vasculaire dans le noyau arqué pendant la gestation

A : Coupe coronale de la carte des p-values résultant de la comparaison statistique de la densité de points de branchement entre les souris nullipares et gestantes (test U de Mann-Whitney) au niveau de l'ARH (noyau arqué de l'hypothalamus). Le panneau du haut représente la carte de l'encéphale entier, tandis que le panneau du bas représente un agrandissement au niveau de l'ARH (surligné en jaune). Les couleurs froides représentent une augmentation de la densité vasculaire chez les gestantes (vert : p -value $< 0,05$, bleu : p -value $< 0,01$), tandis que les couleurs chaudes représentent une diminution de la densité vasculaire chez les gestantes (rouge : p -value $< 0,05$, jaune : p -value $< 0,01$). **B** : Idem pour les vaisseaux interrompus. Dans les deux cas, $n=6$ femelles nullipares, 5 GD6, 4 GD15 et 6 P3.

Cette preuve de plasticité vasculaire adulte à l'échelle de l'encéphale remet en question l'idée selon laquelle le réseau vasculaire cérébral est statique dans des conditions physiologiques et soulève de nombreuses questions : quelle est la nature de cette plasticité vasculaire ? Quels sont ses mécanismes ? Cette étude se concentre sur la MPO, une région essentielle dans l'instauration des comportements maternels pendant la gestation (Ammari *et al.*, 2023).

B. Mécanismes cellulaires à l'origine du remodelage vasculaire gestationnel dans l'aire pré-optique médiane

L'augmentation de la densité vasculaire dans la MPO et l'ARH est-elle due à un pur remodelage du réseau vasculaire préexistant sans addition de nouvelles cellules, ou à une prolifération des cellules endothéliales ?

Pour répondre à cette question, une comparaison histologique a été menée entre des souris nullipares et gestantes à l'aide d'un immunomarquage dirigé tout d'abord contre les cellules endothéliales. Cette comparaison a révélé la présence de cellules endothéliales à la morphologie particulière chez les souris gestantes à GD15, au niveau de l'ARH (Figure 14A à C) et de la MPO (Figure 14D à F) : la présence de prolongements semblables à des filopodes (Figure 14C et F) évoquait des cellules de front (ou *tip cells* en anglais), des cellules motiles présentes à la tête des segments vasculaires lors du bourgeonnement ou de la rétraction des segments en question. Ces cellules étaient presque complètement absentes des coupes examinées issues de souris contrôle au niveau de la MPO (Figure 14E), tandis qu'elles étaient présentes mais en nombre significativement plus faible au niveau de l'ARH des souris contrôle (Figure 14B).

L'apparition ou l'augmentation du nombre de cellules de front chez les souris gestante suggère des événements actifs de remodelage. Elle vient confirmer visuellement l'observation des vaisseaux interrompus avec TubeMap. Il y a donc bien un remodelage vasculaire dans la MPO et l'ARH des souris en fin de gestation. S'agit-il pour autant d'événements de prolifération ?

Un autre immunomarquage a été effectué, dirigé cette fois-ci contre Ki67, marqueur témoin de la prolifération cellulaire, et Erg, une protéine présente spécifiquement dans le noyau des cellules endothéliales. Chez les gestantes comme le groupe contrôle, on observait des cellules positives pour Ki67 mais pas pour Erg (un exemple est illustré Figure 15A) correspondant à des cellules non endothéliales en prolifération. Quelques cellules positives à la fois pour le marquage Erg et le marquage Ki67 (un exemple est illustré Figure 15B), que l'on peut interpréter comme des cellules endothéliales en prolifération, ont été observées chez les souris gestantes, alors qu'elles n'ont jamais été observées chez le groupe contrôle (Figure 15C). Ces très faibles occurrences sont difficilement interprétables, mais suggèrent quand même des événements de prolifération endothéliale dans la MPO des souris gestantes.

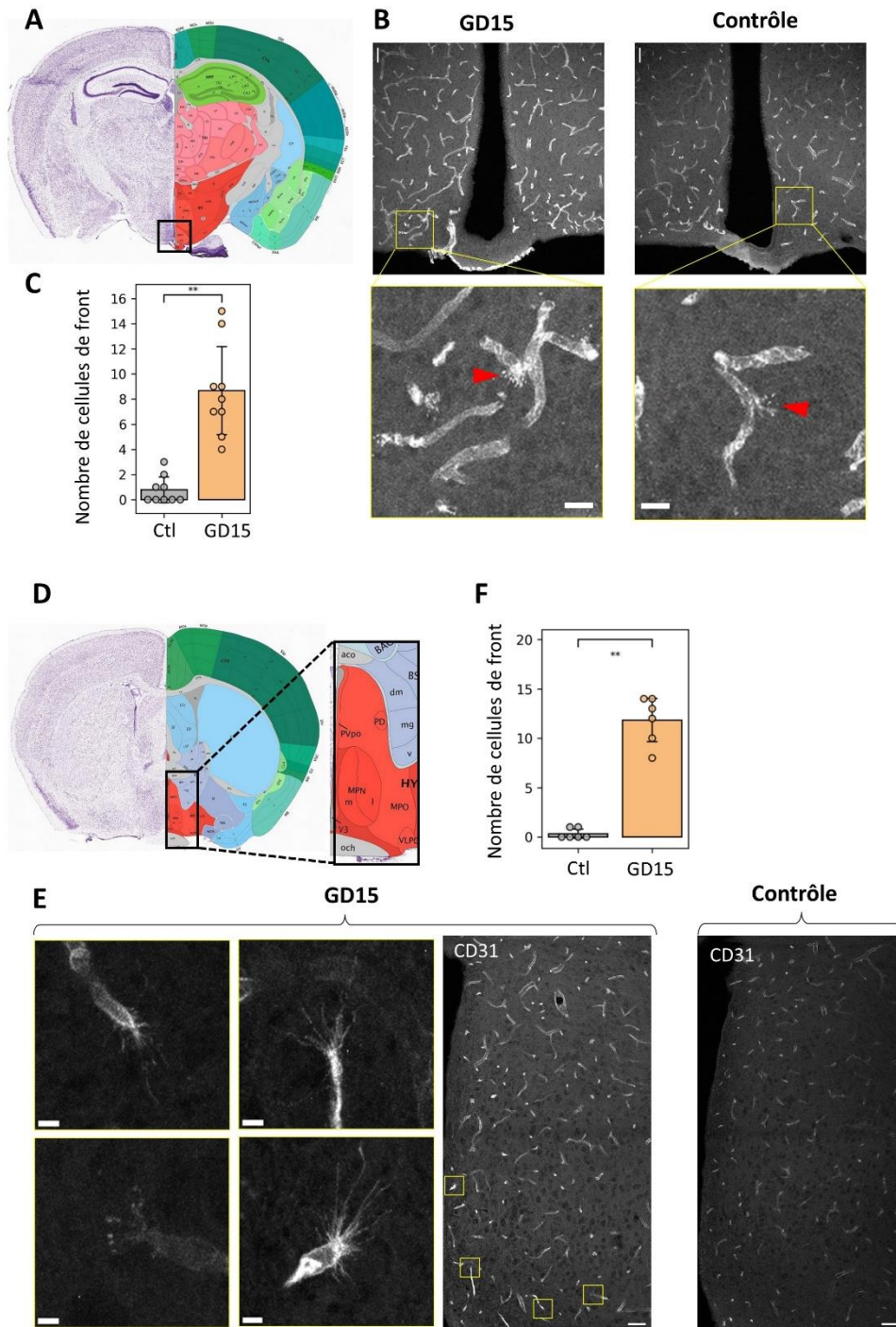


Figure 14 : Remodelage vasculaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation

A : Position de l'ARH (encadré) dans l'Allen Brain Atlas. **B** : Coupes représentatives chez des souris nullipares et au 15^e jour de gestation (GD15). Les échantillons ont été marqués avec un anticorps dirigé contre CD31. Les têtes de flèche pointent chacune un exemple de cellule de front. Barres d'échelle : 20 μ m. **C** : Quantification du nombre de cellules de front dans l'ARH chez des souris nullipares et à GD15. n=3 souris, 2 coupes par souris. Le graphe présente la moyenne et l'erreur standard, * = p-value<0,05 pour le test t non apparié. **D** : Position de la MPO (encadrée) dans l'Allen Brain Atlas. **E** : Coupes représentatives chez des souris nullipares et à GD15. Les échantillons ont été immunomarqués avec un anticorps dirigé contre CD31. Barres d'échelle : 10 μ m et 100 μ m respectivement. **F** : Quantification du nombre de cellules de front dans la MPO chez des souris nullipares et à GD15. N=6 souris, 3 coupes par souris. Le graphe présente la moyenne et l'erreur standard, ** = p-value<0,01 pour le test t non apparié.

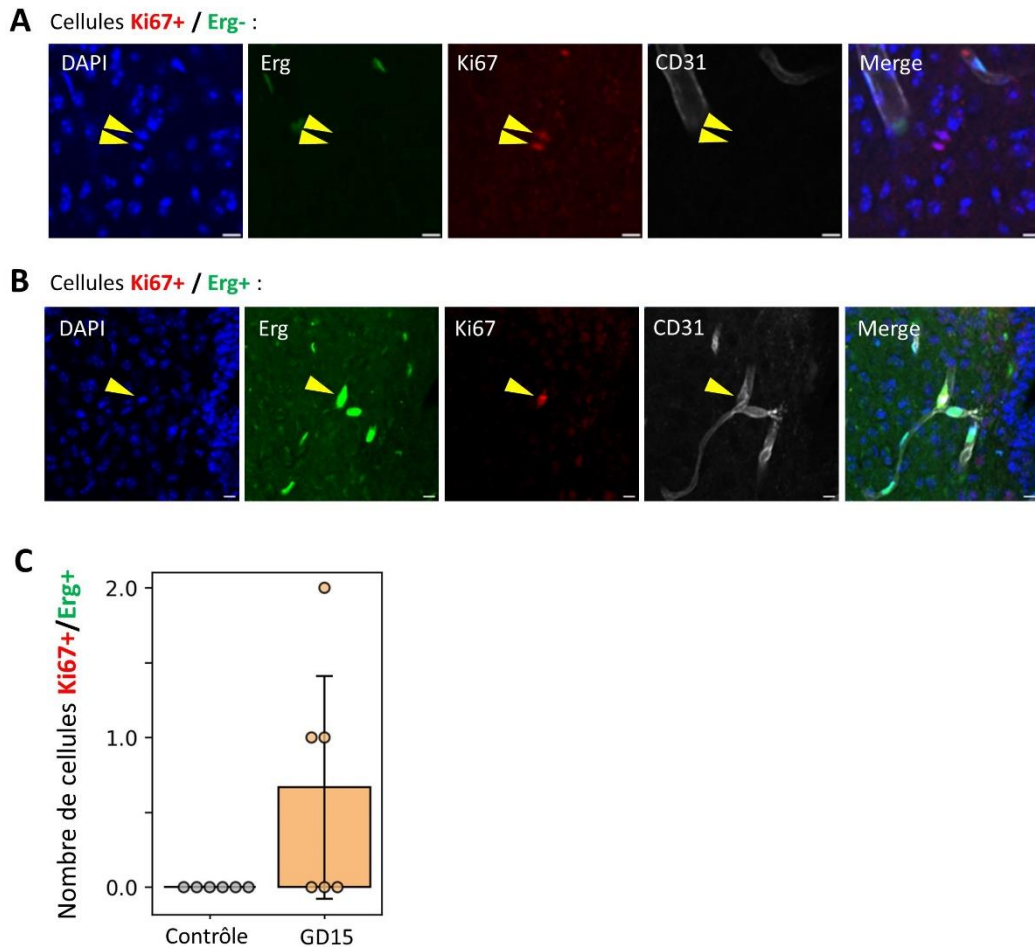


Figure 15 : Prolifération endothéliale dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation

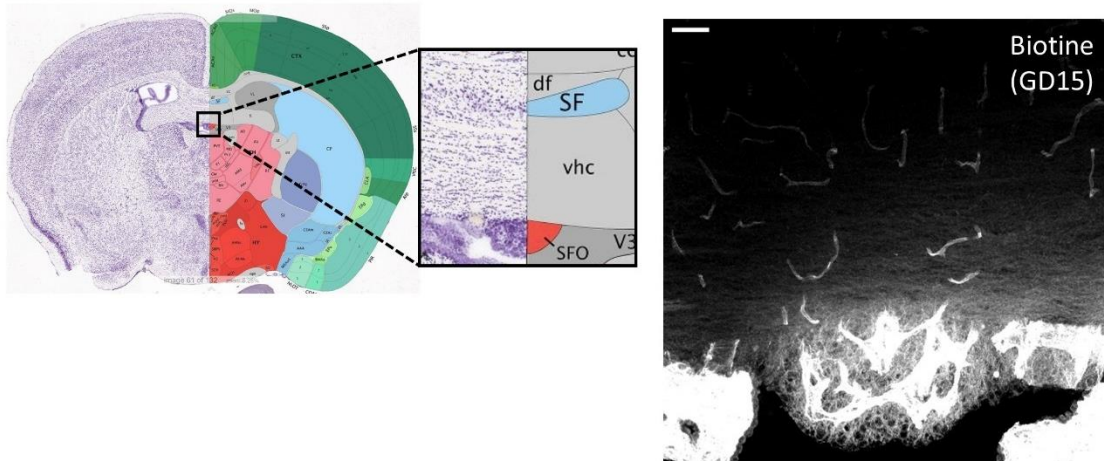
A : Illustration de cellules positives pour le signal Ki67 mais pas pour le signal Erg. **B** : Illustration d'une cellule positive pour le signal Ki67 et pour le signal Erg. **C** : Quantification du nombre de cellules positives pour les signaux Ki67 et Erg dans la MPO. N=6 souris, somme de 3 coupes par souris. Moyenne et erreur standard.

C. Conséquences fonctionnelles sur le réseau vasculaire local

On peut s'interroger sur les conséquences de cette plasticité sur la fonctionnalité des vaisseaux sanguins de la MPO. En particulier, les vaisseaux cérébraux sont normalement imperméables dans les conditions physiologiques de l'encéphale adulte, grâce à la formation de la barrière hémato-encéphalique au cours de leur maturation. Le remodelage vasculaire observé en fin de gestation dans la MPO affecterait-il la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique dans cette région ?

De la biotine a été utilisée comme marqueur de perméabilité vasculaire. Cette molécule a été perfusée par voie intracardiaque chez des souris nullipares et gestantes à GD15, puis a été révélée sur les coupes grâce à de la streptavidine fluorescente. Comme prévu, une fuite de biotine était observable dans les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires tels que l'organe subfornical (Figure 16A) chez les deux groupes expérimentaux, ce qui est cohérent avec la perméabilité naturelle de ces régions circumventriculaires. Cependant, il ne semblait pas y avoir d'augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau de la MPO chez les souris gestantes (Figure 16B).

A Organe subfornical (SFO)



B Aire préoptique médiane (MPO)

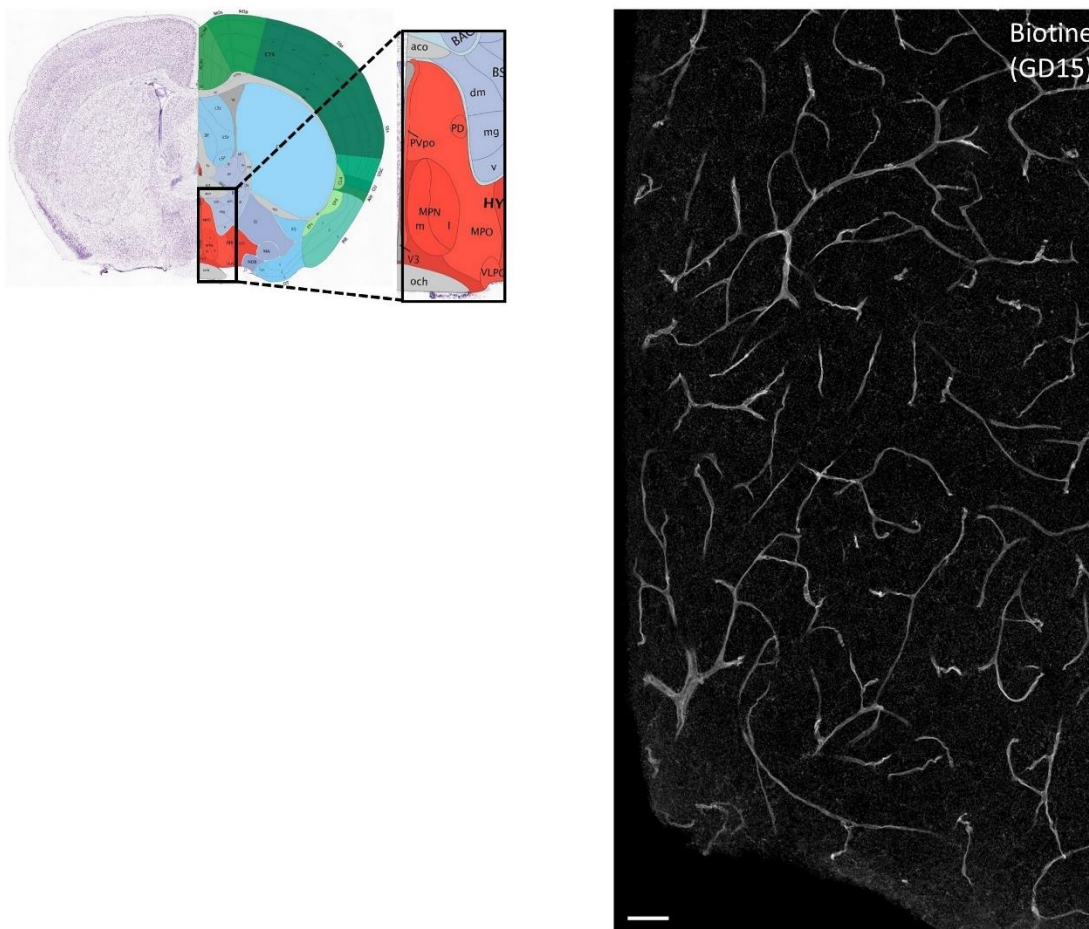


Figure 16 : La plasticité vasculaire dans l'aire pré-optique médiane n'entraîne pas d'augmentation de la perméabilité à la biotine

A : Localisation de l'organe subfornical (SFO) dans l'Allen Brain Atlas. A droite, illustration de la SFO d'une souris gestante : la présence d'un halo autour des vaisseaux et d'un bruit de fond plus marqué suggère une sortie de biotine hors des vaisseaux. **B** : Localisation de l'aire préoptique médiane (MPO) dans l'Allen Brain Atlas. A droite, illustration de la MPO d'une souris gestante : la biotine reste cantonnée aux vaisseaux sanguins dont elle ne semble pas sortir. Les coupes sont marquées avec de la streptavidine fluorescente. Les barres d'échelle sont de 100 μ m. Les images sont des projections en z.

D. Comportement des astrocytes de l'aire pré-optique médiane pendant la gestation

La voie de signalisation conduisant à la probable angiogenèse ne nous est pas encore connue. Toutefois, un facteur de prolifération classiquement impliqué dans l'angiogenèse est le VEGF, et plus particulièrement du VEGF-A. Ce dernier joue un rôle clé dans le remodelage normal et pathologique des vaisseaux (Takahashi et al., 2005). Pour étudier le comportement du VEGF-A pendant la gestation, il conviendrait tout d'abord d'identifier un acteur cellulaire pouvant être à l'origine d'une production de VEGF-A dans la MPO. Nous avons choisi d'utiliser à cette fin HypoMap, un atlas d'expression en cellule unique rassemblant des données issues de 17 études dédiées à l'hypothalamus murin (Steuernagel et al., 2022). Cet atlas représentait un outil précieux pour une première approche du profil d'expression des cellules hypothalamiques. Les 384 925 cellules qu'il contient pouvaient être divisées en première approximation en 7 types cellulaires (Figure 17A). Au niveau de l'hypothalamus, les deux principaux récepteurs au VEGF (Flt1 et Kdr) étaient principalement exprimés par le groupe des cellules endothéliales, tandis que le VEGF-A semblait principalement exprimé par le groupe des astrocytes et par certains groupes de neurones (Figure 17B). Nous nous sommes donc penchés sur le comportement des astrocytes pendant la gestation. Un immunomarquage a été effectué contre GFAP, une protéine de filament intermédiaire astrocytaire. GFAP permet de visualiser la présence d'astrocytes, mais il s'agit également un marqueur d'activation astrocytaire, son expression augmentant en cas d'activation des astrocytes. L'immunomarquage a révélé une augmentation significative de l'expression de cette protéine dans la MPO des femelles gestantes comparées au groupe contrôle (Figure 17C et Figure 17D). Cela pourrait traduire une augmentation de la couverture astrocytaire, mais aussi une activité accrue des astrocytes. Le comportement des astrocytes pendant la gestation semble donc affecté au niveau de la MPO, mais des études supplémentaires sont requises pour mieux caractériser ce phénomène.

E. La progestérone seule ne semble pas suffisante pour expliquer l'origine de la plasticité vasculaire gestationnelle dans l'aire pré-optique médiale

La régulation transcriptionnelle du VEGF répond à divers stimuli, comme l'hypoxie ou les hormones sexuelles telles que le 17β estradiol et la progestérone (Pages et al., 2005). Chez la souris, la progestérone est un signal important de la gestation (Figure 18A). L'expression du VEGF induite par la progestérone joue un rôle dans la néo-vascularisation et le remodelage vasculaire de l'endomètre pendant la gestation (Kim et al., 2013). Compte tenu des effets périphériques connus de la progestérone sur l'angiogenèse, on peut émettre l'hypothèse que le même signal pourrait également être impliqué dans l'hypothalamus pendant la gestation. Nous avons cherché à modéliser l'augmentation prolongée des niveaux de progestérone grâce à des implants sous-cutanés de progestérone, et à en évaluer les effets sur la densité vasculaire cérébrale. Le taux de progestérone libéré par les implants a été évalué juste avant l'implantation comme niveau de référence, 3 jours après l'implantation et 12 jours après l'implantation (Figure 18B). Les niveaux obtenus se sont révélés satisfaisants (Figure 18C et D) bien que supérieurs aux niveaux physiologiques : pendant la gestation, la concentration circulante de progestérone atteint un pic d'environ 50 ng/mL à P3-P4, diminue légèrement et remonte pour rester autour de 80-100 ng/mL jusqu'à la mise-bas (Figure 18A). Le nombre de points de branchement comptés dans un volume similaire de MPO ne différait pas significativement entre le groupe contrôle et le groupe expérimental 12 jours après l'implantation (Figure 18E), suggérant une densité vasculaire comparable entre les deux groupes dans la MPO.

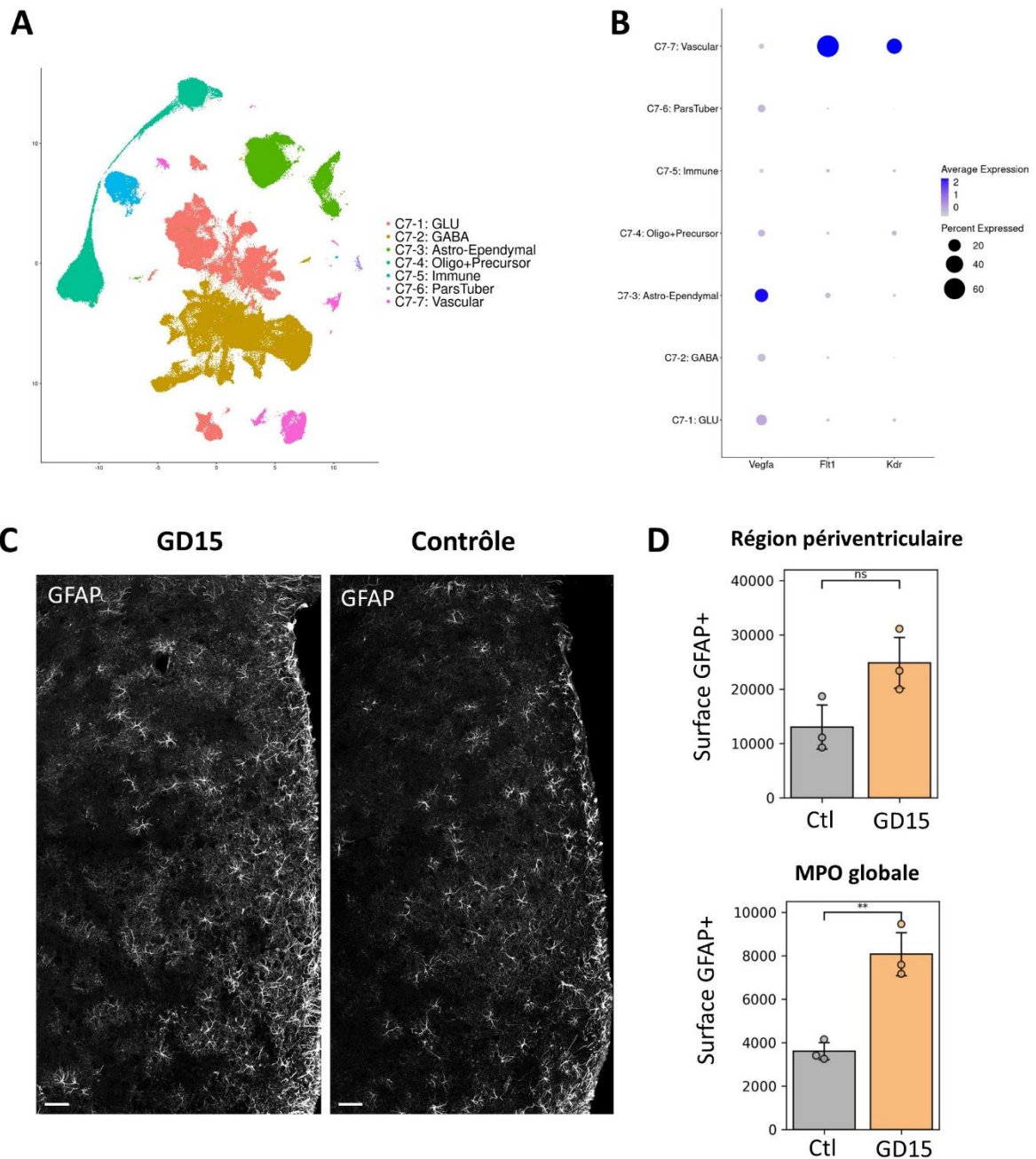


Figure 17 : Altération du comportement astrocytaire dans l'aire pré-optique médiane pendant la gestation

A : Visualisation de HypoMap par UMAP (pour *Uniform Manifold Approximation and Projection*, une technique de réduction des dimensions à visée de visualisation), colorée par principaux types cellulaires. **B** : Diagramme représentant l'expression de VEGF-A et de VEGFR1 (Flt1) et VEGFR2 (Kdr) dans différents groupes de cellules de HypoMap. La couleur des points correspond à la moyenne des niveaux d'expression normalisés de chaque gène dans le cluster, et la taille des points au pourcentage de cellules du cluster exprimant le gène. **C** : Coupes représentatives au niveau de la MPO de souris nullipares et gestantes. Les cellules sont immunomarquées contre GFAP. Les barres d'échelle sont de 50 μ m. Les images sont des projections en z. **D** : Quantification de la couverture du signal GFAP. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne et erreur standard, et un test t non apparié a été effectué. ns = p-value > 0,05, ** = p-value < 0,01.

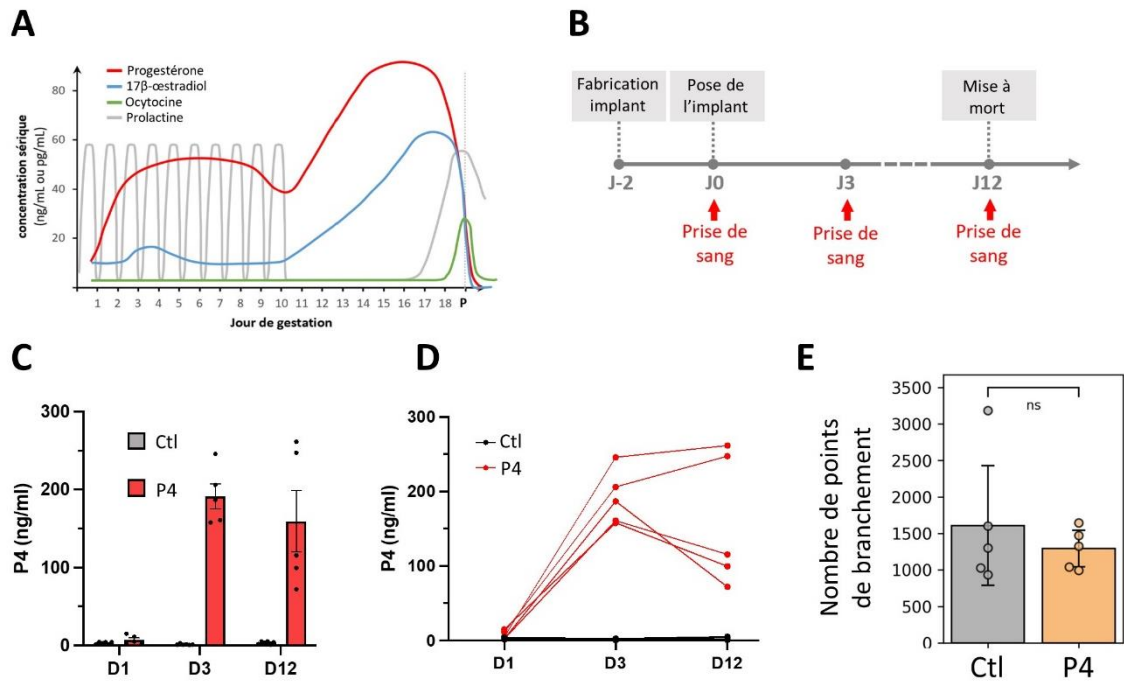


Figure 18 : La progestérone seule ne semble pas impacter la densité vasculaire dans l'aire pré-optique médiane

A : Idem figure 3B. **B** : Résumé du protocole expérimental. 2 jours après leur fabrication, les implants de progestérone ont été disposés en sous-cutané dans la région nuchale. Des prises de sang ont été effectuées juste avant la mise en place de l'implant et 3 et 12 jours après sa mise en place pour suivre les niveaux sériques de progestérone. 12 jours après l'implantation, les souris ont été mises à mort et leur encéphale collecté. **C** : Concentration sérique en progestérone (P4 = progestérone 4, D1 = jour de l'implantation 1, D3 = 3^e jour après l'implantation, D12 = 12^e jour après l'implantation). Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne et erreur standard. Chaque point représente une souris individuelle. **D** : Concentration sérique en progestérone (P4 = progestérone 4, D1 = jour de l'implantation 1, D3 = 3^e jour après l'implantation, D12 = 12^e jour après l'implantation). La trajectoire individuelle de chaque souris est représentée. **E** : Nombre de points de branchement détectés dans un volume égal de MPO à GD12. Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne et erreur standard. Chaque point représente une souris individuelle. p-value > 0,05 (test t non apparié). Pour toutes les figures, Ctl désigne le groupe avec l'implant contrôle et P4 désigne le groupe avec l'implant de progestérone. n=6 souris pour l'implant contrôle, et 5 souris pour l'implant de progestérone.

4. Discussion

A. Remaniements vasculaires dans l'encéphale en gestation

Grâce aux développements technologiques de l'équipe permettant d'obtenir une cartographie tridimensionnelle complète de la vascularisation cérébrale à l'échelle micrométrique, nous avons pu mettre en évidence des remaniements vasculaires dans l'encéphale en gestation. En particulier, nous avons pu montrer une augmentation de la densité vasculaire au niveau de l'aire pré-optique médiane (MPO) et du noyau arqué (ARH) de l'hypothalamus pendant la gestation.

La technologie utilisée permet de détecter des variations de densité vasculaire très fines, mais on peut remarquer que le phénomène ne semble pas parfaitement symétrique sur les cartes de p-values, l'aire significativement plus dense semblant plus étendue dans l'hémisphère gauche que l'hémisphère droit. Nous interprétons cette asymétrie comme un biais lié à l'acquisition de l'image, l'origine de la feuille de lumière pouvant contribuer à rendre le phénomène moins visible d'un côté que de l'autre. Malgré cette limitation, les résultats demeurent suffisamment exploitables.

Malgré le faible nombre de stades gestationnels étudiés, une temporalité semble se dessiner : la densification commencerait par exemple plus tôt pour la MPO que pour l'ARH. En effet la densité de vaisseaux interrompus, témoin d'un remodelage vasculaire actif, est déjà significativement augmentée à GD6 au niveau de la MPO, tandis qu'il faut attendre GD15 pour l'ARH. Il serait intéressant de disposer de plus de stades gestationnels afin d'avoir une description temporelle plus fine du phénomène : dans cette optique, nous sommes actuellement en train de répéter l'expérience avec des souris à GD10. Il est intéressant de noter que la densification vasculaire mise en évidence à GD15 dans la MPO pourrait être une des explications à l'augmentation du volume de cette région observée en fin de gestation par (Barrière *et al.*, 2021) en IRM.

Dans la MPO, la densification semble perdurer après la mise-bas, la densité de points de branchement étant encore significativement augmentée trois jours après la mise-bas par rapport au contrôle. Toutefois l'aire de la zone concernée semble réduite par rapport à la fin de la gestation, suggérant peut-être une réversibilité du phénomène. Nous sommes actuellement en train de répéter l'expérience après le sevrage des petits, afin d'étudier si ces mères connaissent un retour à un état pré-gestationnel. Il serait également intéressant d'étudier des femelles multipares, afin d'étudier si la densification vasculaire au niveau de la MPO serait plus rapide ou plus intense chez des femelles ayant déjà connu une première gestation, suggérant un effet mémoire.

B. Hypothèses de mécanismes

Face à cette mise en évidence d'un remaniement vasculaire dans l'hypothalamus des femelles gestantes, nous nous sommes intéressés à l'origine, la nature et les mécanismes de ces changements à l'échelle cellulaire. Nous n'avons que partiellement atteint nos objectifs, et ces derniers font encore l'objet d'une recherche active dans le cadre de ma thèse universitaire.

a. Origine des remaniements vasculaires pendant la gestation

Concernant l'origine des remaniements vasculaires, nous avons soupçonné la progestérone. Toutefois, une augmentation des niveaux de progestérone pendant 12 jours à l'aide d'un implant hormonal n'a pas suffi à reproduire une densification vasculaire au niveau de la MPO.

Le signal à l'origine du phénomène n'est peut-être pas la progestérone. Toutefois plusieurs points de notre protocole sont critiquables. Les niveaux de progestérone obtenus avec les implants pourraient dépasser les niveaux physiologiques de la gestation. Il serait préférable d'optimiser les doses afin de mieux reproduire les niveaux gestationnels. De plus, peut-être la progestérone est-elle bien impliquée, mais pas suffisante seule pour provoquer le phénomène : elle pourrait agir en synergie avec d'autres facteurs. Nous avons pensé à une synergie avec l'œstradiol, dont les niveaux sont également augmentés de façon durable pendant la gestation. Nous avons ainsi planifié de répéter l'expérience avec d'autres implants : des implants d'œstradiol seuls et des implants d'œstradiol et de progestérone.

Pour étudier si les remaniements vasculaires sont liés uniquement aux modifications hormonales de la gestation, et pas à d'autres facteurs tels que des facteurs en provenance des foetus, nous sommes également en train de reproduire l'expérience chez des souris pseudo-gestantes : celles-ci ont été accouplées avec des mâles vasectomisés. Elles ont ainsi subi une stimulation cervicale entraînant un bouleversement hormonal semblable à celui d'un début de gestation pendant 6 jours, tout en étant non gestantes. Cela nous permettra de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une origine hormonale du phénomène, de façon moins sélective qu'avec des implants, mais plus physiologique.

b. Nature des remaniements vasculaires pendant la gestation

Concernant la nature des remaniements vasculaires, nous avons réussi à rassembler des indices convergeant vers l'hypothèse d'une angiogenèse par bourgeonnement. Nous avons tout d'abord mis en évidence de cellules de front, structures typiques d'un remodelage vasculaire, dans la MPO des femelles en fin de gestation. Dans cette dernière, nous avons également identifié des cellules endothéliales positives pour le marqueur Ki67, parfois à proximité des cellules de front : cela confirme une prolifération endothéliale. L'association d'indices de remodelage vasculaire et de prolifération endothéliale oriente vers une angiogenèse par bourgeonnement.

Toutefois, bien que présentes chez les gestantes uniquement, les cellules endothéliales positives pour Ki67 observées sont très peu nombreuses. Etant donné que la MPO représente un faible volume et que la densification vasculaire que nous avons mise en évidence est un phénomène subtil, il est peut-être normal d'observer si peu de cellules endothéliales en prolifération. Plus probablement, peut-être n'avons-nous pas réussi à mettre toutes ces cellules en évidence ce qui pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses, dont notre système de comptage : 3 coupes de MPO par souris est peut-être trop faible pour identifier un phénomène sans doute très dispersé dans la région. Par ailleurs, le stade de gestation choisi, 15 jours post-fécondation, est peut-être trop tardif pour identifier la prolifération qui aurait pu avoir lieu plus précocement pendant la gestation.

c. Mécanismes de remaniements vasculaires pendant la gestation

Enfin, concernant les mécanismes des remaniements vasculaires, nous disposons de quelques pistes intéressantes. L'augmentation de l'expression de GFAP par les astrocytes dans la MPO suggérerait une augmentation de la couverture astrocytaire ou une augmentation de l'activité des

astrocytes. Or les astrocytes sont connus pour interagir étroitement avec les vaisseaux sanguins (Muio *et al.*, 2014).

En particulier, les astrocytes sont une source de VEGF, qui pourrait être le signal moléculaire à l'origine du remodelage vasculaire. L'expression du VEGF est connue pour être contrôlée au niveau de la transcription, de la stabilité de l'ARNm et de la traduction (Pages et Pouyssegur, 2005). Pour révéler une éventuelle régulation transcriptionnelle du VEGF au cours de la gestation, nous avons prévu de réaliser une hybridation *in situ* dans un encéphale clarifié pour comparer l'expression du VEGF-A à l'échelle de l'encéphale entier chez des souris contrôle et gestantes.

Puis, pour étudier si le VEGF est nécessaire à l'hypermétabolisation de la MPO, notre principale perspective est d'effectuer un ciblage viral de l'expression du VEGF, et de tester si une extinction de son expression dans la MPO peut bloquer l'hypermétabolisation gestationnelle. Le ciblage de l'expression du VEGF d'une manière spécifique aux cellules pourrait également permettre d'identifier les types de cellules à l'origine de cet effet.

C. Conséquences sur le réseau vasculaire cérébral

Dans le cadre d'un remaniement vasculaire, la présence de vaisseaux immatures pourrait impacter les propriétés du réseau vasculaire cérébral, telles que sa perméabilité. Pour tester cette hypothèse, nous avons choisi comme marqueur de perméabilité vasculaire la biotine, mais les vaisseaux de la MPO ne se sont pas révélés plus perméables à la biotine en fin de gestation. Peut-être le stade gestationnel choisi était-il trop tardif, les vaisseaux de la MPO ayant eu le temps de devenir suffisamment matures : une étude plus précoce en milieu de gestation donnerait peut-être des résultats différents. Un seul marqueur de perméabilité ne suffisant pas pour conclure, nous avons également prévu de répéter l'expérience avec d'autres marqueurs tels la cadavérine et le dextran : la différence de poids moléculaire (environ 500 Da, 900 Da et 40 000 Da respectivement pour la sulfo-NHS-biotine, la cadavérine et le dextran) peut influencer la perméabilité et permettre de préciser les limites d'une fuite potentielle. C'est d'ailleurs avec le dextran que Gruber *et al.* (2021) ont pu révéler une hyperperméabilité des vaisseaux du noyau arqué dans le cadre de la densification vasculaire associée à l'obésité.

Enfin, nous avons planifié une quantification de la couverture péricytaire des vaisseaux de la MPO à différents stades gestationnels, afin de révéler une éventuelle unité-neurovasculaire encore incomplète au niveau de certains vaisseaux.

D. Conséquences fonctionnelles

Les conséquences fonctionnelles d'un remodelage du réseau vasculaire cérébral pendant la gestation sont particulièrement intéressantes. Des changements même subtils dans la densité ou la perméabilité des vaisseaux sanguins pourraient influencer les circuits neuronaux de plusieurs façons : en augmentant le soutien métabolique des neurones ce qui permettrait une activité neuronale accrue, en augmentant la concentration de molécules de signalisation telles que les hormones autour de groupes spécifiques de neurones, ou encore en facilitant la libération d'hormones dans la circulation générale.

Nous cherchons actuellement à explorer ces perspectives en bloquant la plasticité vasculaire dans la MPO pendant la gestation grâce au ciblage viral du VEGF, puis en étudiant l'impact sur le comportement maternel grâce à divers tests comportementaux. En effet, la MPO fait partie du circuit

neuronal maternel, responsable de l'établissement du comportement maternel : la densification vasculaire que nous avons mise en évidence pourrait être étroitement liée à la plasticité neuronale connue dans la région pendant la gestation (Ammari *et al.*, 2023). L'adaptation de la vasculature pourrait ainsi préparer à la parentalité en modulant l'apport d'hormones et de nutriments aux neurones du circuit maternel.

Cette idée est conceptuellement novatrice car suggère un rôle alternatif pour les vaisseaux sanguins de l'encéphale : au-delà de leurs fonctions traditionnelles de support métabolique, ils auraient ainsi une fonction pleinement informative et pourraient être impliqués dans la modulation des fonctions cérébrales.

E. Applications médicales

Cette étude apporte de nouvelles pistes pour l'étude des altérations de la communication entre neurones et vaisseaux sanguins, souvent au cœur des maladies psychiatriques. Une altération de la densification vasculaire pendant la gestation pourrait par exemple freiner la plasticité du circuit maternel, à l'origine de troubles comportementaux. Une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique pourrait également entraîner un risque accru d'infections, ainsi qu'un accès facilité aux molécules thérapeutiques pouvant présenter une toxicité nerveuse vers les tissus cérébraux.

Conclusion

La gestation s'accompagne d'un remodelage vasculaire intense dans certains territoires périphériques tels que l'utérus. Au niveau de l'encéphale de la future mère, elle s'accompagne d'une plasticité neuronale importante, mais le comportement du réseau vasculaire plus spécifiquement est mal connu. De manière générale, l'architecture du réseau vasculaire cérébral est considérée comme stable chez l'adulte en conditions physiologiques. Toutefois des indices croissants convergent vers l'existence possible d'une plasticité vasculaire cérébrale adulte sous certaines conditions. L'objectif de ce travail de thèse était de mettre à profit les nouvelles techniques de reconstruction cérébrovasculaire pour révéler une éventuelle plasticité vasculaire induite par la gestation dans l'encéphale de la souris adulte, et le cas échéant d'en étudier les mécanismes sous-jacents.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de remaniements vasculaires dans l'encéphale en gestation, notamment dans l'aire pré-optique médiane, une région contrôlant les comportements maternels. Cette densification du réseau vasculaire était associée à l'observation de cellules de front, une structure typique d'un remodelage vasculaire, et de quelques cellules endothéliales en prolifération. Ces résultats réunis suggèrent un processus d'angiogenèse par bourgeonnement. Malgré cette plasticité, la perméabilité des vaisseaux sanguins de la MPO à la biotine ne semblait pas affectée ; il n'y aurait donc pas de rupture de l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique. L'origine de ces changements reste encore à déterminer. La progestérone seule ne semblait pas être un signal suffisant pour reproduire les effets de la gestation sur le réseau vasculaire de la MPO. Quant aux voies de signalisation concernées, elles impliquent probablement les astrocytes, dont l'expression de GFAP était accrue pendant la gestation dans la MPO.

Cette étude représente une avancée importante dans la conception du réseau vasculaire cérébral. Loin d'être statique en conditions physiologique, ce réseau pourrait subir un remodelage sous certaines conditions. Par ailleurs, notre étude suggère un rôle alternatif pour les vaisseaux sanguins de l'encéphale, allant au-delà de leurs fonctions de support et pouvant potentiellement être impliqués dans la modulation de fonctions cérébrales.

Liste des références bibliographiques

ALLEN INSTITUTE FOR BRAIN SCIENCE (2017) Allen Reference Atlas. [<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>] (consulté le 01/12/2023)

AMBURGEY, Ö.A., REEVES, S.A., BERNSTEIN, I.M., *et al.* (2010) Resistance Artery Adaptation to Pregnancy Counteracts the Vasoconstricting Influence of Plasma From Normal Pregnant Women. *Reproductive Sciences* vol. 17, n° 1, p. 29-39. [<https://doi.org/10.1177/1933719109345288>]

AMMARI, R., MONACA, F., CAO, M., *et al.* (2023) Hormone-mediated neural remodeling orchestrates parenting onset during pregnancy. *Science* vol. 382, n° 6666, p. 76-81. [<https://doi.org/10.1126/science.adi0576>]

BARKLEY, M.S., GESCHWIND, I.I., BRADFORD, G.E. (1979) The Gestational Pattern of Estradiol, Testosterone and Progesterone Secretion in Selected Strains of Mice. *Biology of Reproduction* vol. 20, n° 4, p. 733-738. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod20.4.733>]

BARONE, F.C., KNUDSEN, D.J., NELSON, A.H., *et al.* (1993) Mouse Strain Differences in Susceptibility to Cerebral Ischemia are Related to Cerebral Vascular Anatomy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* vol. 13, n° 4, p. 683-692. [<https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.87>]

BARRIÈRE, D.A., ELLA, A., SZEREMETA, F., *et al.* (2021) Brain orchestration of pregnancy and maternal behavior in mice: A longitudinal morphometric study. *NeuroImage* vol. 230, p. 117776. [<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.117776>]

BEGLEY, D.J., BRIGHTMAN, M.W. (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. In Prokai, L., Prokai-Tatrai, K. (Éd.), *Peptide Transport and Delivery into the Central Nervous System*. Basel, Birkhäuser Verlag, p. 39-78. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8049-7_2]

BLACK, J.E., ISAACS, K.R., ANDERSON, B.J., *et al.* (1990) Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 87, n° 14, p. 5568-5572. [<https://doi.org/10.1073/pnas.87.14.5568>]

BOGORAD, M.I., DESTEFANO, J.G., LINVILLE, R.M., *et al.* (2019) Cerebrovascular plasticity: Processes that lead to changes in the architecture of brain microvessels. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* vol. 39, n° 8, p. 1413-1432. [<https://doi.org/10.1177/0271678X19855875>]

BRETT, D.S., SNYDER, S.H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 86, n° 22, p. 9030-9033. [<https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.9030>]

BRUNTON, P.J., RUSSELL, J.A. (2008) The expectant brain: adapting for motherhood. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9, n° 1, p. 11-25. [<https://doi.org/10.1038/nrn2280>]

CASTELLANI, G., CROESE, T., PERALTA RAMOS, J.M., *et al.* (2023) Transforming the understanding of brain immunity. *Science* vol. 380, n° 6640, p. eabo7649. [<https://doi.org/10.1126/science.abo7649>]

- CIPOLLA, M.J. (2009) *The Cerebral Circulation, Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. San Rafael (CA), Morgan & Claypool Life Sciences.
- CIPOLLA, M.J., SWEET, J.G., CHAN, S.-L. (2011a) Cerebral vascular adaptation to pregnancy and its role in the neurological complications of eclampsia. *Journal of Applied Physiology* vol. 110, n° 2, p. 329-339. [<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01159.2010>]
- CLAPP, J.F., CAPELESS, E. (1997) Cardiovascular Function Before, During, and After the First and Subsequent Pregnancies. *The American Journal of Cardiology* vol. 80, n° 11, p. 1469-1473. [[https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00738-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00738-8)]
- CLARK, P.J., BRZEZINSKA, W.J., PUCHALSKI, E.K., *et al.* (2009) Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive gain. *Hippocampus* vol. 19, n° 10, p. 937-950. [<https://doi.org/10.1002/hipo.20543>]
- CUDMORE, R.H., DOUGHERTY, S.E., LINDEN, D.J. (2017) Cerebral vascular structure in the motor cortex of adult mice is stable and is not altered by voluntary exercise. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* vol. 37, n° 12, p. 3725-3743. [<https://doi.org/10.1177/0271678X16682508>]
- D'AMICO, G., MUÑOZ-FÉLIX, J.M., PEDROSA, A.R., *et al.* (2020) "Splitting the matrix": intussusceptive angiogenesis meets MT 1- MMP. *EMBO Molecular Medicine* vol. 12, n° 2, p. e11663. [<https://doi.org/10.15252/emmm.201911663>]
- DAS, S., RAI, A., MERCHANT, M.L., *et al.* (2021) A Comprehensive Survey of Statistical Approaches for Differential Expression Analysis in Single-Cell RNA Sequencing Studies. *Genes* vol. 12, n° 12, p. 1947. [<https://doi.org/10.3390/genes12121947>]
- DRAKE, C., IADECOLA, C. (2007) The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain and Language* vol. 102, n° 2, p. 141-152. [<https://doi.org/10.1016/j.bandl.2006.08.002>]
- FESKE, S.K., SINGHAL, A.B. (2014) Cerebrovascular Disorders Complicating Pregnancy. *Continuum (Minneapolis, Minn)* vol. 20, n° 1, p. 80-99. [<https://doi.org/10.1212/01.CON.0000443838.95260.4b>]
- FORBES, T.R., HOOKER, C.W. (1957) Plasma Levels of Progesterin During Pregnancy in the Mouse. *Endocrinology* vol. 61, n° 3, p. 281-286. [<https://doi.org/10.1210/endo-61-3-281>]
- FRANCO, C.A., JONES, M.L., BERNABEU, M.O., *et al.* (2015) Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression. *PLoS Biology* vol. 13, n° 4, p. e1002125. [<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002125>]
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* vol. 288, n° 5789, p. 373-376. [<https://doi.org/10.1038/288373a0>]
- GIROUARD, H., IADECOLA, C. (2006) Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology* vol. 100, n° 1, p. 328-335. [<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00966.2005>]
- GRUBER, T., PAN, C., CONTRERAS, R.E., *et al.* (2021) Obesity-associated hyperleptinemia alters the gliovascular interface of the hypothalamus to promote hypertension. *Cell Metabolism* vol. 33, n° 6, p. 1155- 1170.e10. [<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.04.007>]

- GRÜNEBERG, H. (1942) Biology of the Laboratory Mouse. *Nature* vol. 150, n° 3795, p. 101-102. [<https://doi.org/10.1038/150101a0>]
- HAO, Y., HAO, S., ANDERSEN-NISSEN, E., *et al.* (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* vol. 184, n° 13, p. 3573- 3587.e29. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>]
- HARDER, D.R., ZHANG, C., GEBREMEDHIN, D. (2002) Astrocytes Function in Matching Blood Flow to Metabolic Activity. *Physiology* vol. 17, n° 1, p. 27-31. [<https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.27>]
- HARPER, A.M. (1966) Autoregulation of cerebral blood flow: influence of the arterial blood pressure on the blood flow through the cerebral cortex. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* vol. 29, n° 5, p. 398-403. [<https://doi.org/10.1136/jnnp.29.5.398>]
- HILLERER, K.M., JACOBS, V.R., FISCHER, T., *et al.* (2014) The Maternal Brain: An Organ with Peripartal Plasticity. *Neural Plasticity* vol. 2014, p. 1-20. [<https://doi.org/10.1155/2014/574159>]
- HONARPISHEH, P., MCCULLOUGH, L.D. (2019) Sex as a biological variable in the pathology and pharmacology of neurodegenerative and neurovascular diseases. *British Journal of Pharmacology* vol. 176, n° 21, p. 4173-4192. [<https://doi.org/10.1111/bph.14675>]
- HONG, J.-H. (2019) Cerebrovascular complications during pregnancy and postpartum. *Journal of Neurocritical Care* vol. 12, n° 1, p. 20-29. [<https://doi.org/10.18700/jnc.190087>]
- JIANG, H., GALLET, S., KLEMM, P., *et al.* (2020) MCH Neurons Regulate Permeability of the Median Eminence Barrier. *Neuron* vol. 107, n° 2, p. 306- 319.e9. [<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.04.020>]
- JOHNSON, A.C., CIPOLLA, M.J. (2015) The Cerebral Circulation During Pregnancy: Adapting to Preserve Normalcy. *Physiology* vol. 30, n° 2, p. 139-147. [<https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2014>]
- KIRST, C., SKRIABINE, S., VIEITES-PRADO, A., *et al.* (2020) Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell* vol. 180, n° 4, p. 780- 795.e25. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.028>]
- KOHL, J., DULAC, C. (2018) Neural control of parental behaviors. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 49, p. 116-122. [<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.002>]
- KORN, C., AUGUSTIN, H.G. (2015) Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Developmental Cell* vol. 34, n° 1, p. 5-17. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.004>]
- LACOSTE, B., GU, C. (2015) Control of cerebrovascular patterning by neural activity during postnatal development. *Mechanisms of Development* vol. 138, p. 43-49. [<https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.06.003>]
- LANGHAUSER, F.L., HEILER, P.M., GRUDZENSKI, S., *et al.* (2012) Thromboembolic stroke in C57BL/6 mice monitored by 9.4 T MRI using a 1H cryo probe. *Experimental & Translational Stroke Medicine* vol. 4, n° 1, p. 18. [<https://doi.org/10.1186/2040-7378-4-18>]
- LANGLET, F., LEVIN, B.E., LUQUET, S., *et al.* (2013) Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in

- Response to Fasting. *Cell Metabolism* vol. 17, n° 4, p. 607-617. [https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.004]
- LASCHKE, M.W., GU, Y., MENGER, M.D. (2022) Replacement in angiogenesis research: Studying mechanisms of blood vessel development by animal-free in vitro, in vivo and in silico approaches. *Frontiers in Physiology* vol. 13, p. 981161. [https://doi.org/10.3389/fphys.2022.981161]
- LOGSDON, E.A., FINLEY, S.D., POPEL, A.S., *et al.* (2014) A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 18, n° 8, p. 1491-1508. [https://doi.org/10.1111/jcmm.12164]
- MÄE, M.A., HE, L., NORDLING, S., *et al.* (2021) Single-Cell Analysis of Blood-Brain Barrier Response to Pericyte Loss. *Circulation Research* vol. 128, n° 4. [https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.317473]
- MUOIO, V., PERSSON, P.B., SENDESKI, M.M. (2014) The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica* vol. 210, n° 4, p. 790-798. [https://doi.org/10.1111/apha.12250]
- NELSON, J.W., PHILLIPS, S.C., GANESH, B.P., *et al.* (2021) The gut microbiome contributes to blood-brain barrier disruption in spontaneously hypertensive stroke prone rats. *The FASEB Journal* vol. 35, n° 2. [https://doi.org/10.1096/fj.202001117R]
- OSOL, G., MANDALA, M. (2009) Maternal Uterine Vascular Remodeling During Pregnancy. *Physiology* vol. 24, n° 1, p. 58-71. [https://doi.org/10.1152/physiol.00033.2008]
- PAGES, G., POUYSSEGUR, J. (2005) Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene? a concert of activating factors. *Cardiovascular Research* vol. 65, n° 3, p. 564-573. [https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.032]
- PREVOT, V., DEHOUCK, B., SHARIF, A., *et al.* (2018) The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocrine Reviews* vol. 39, n° 3, p. 333-368. [https://doi.org/10.1210/er.2017-00235]
- QIAN, B., RUDY, R.F., CAI, T., *et al.* (2018) Cerebral Artery Diameter in Inbred Mice Varies as a Function of Strain. *Frontiers in Neuroanatomy* vol. 12, p. 10. [https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00010]
- RENIER, N., WU, Z., SIMON, D.J., *et al.* (2014) iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* vol. 159, n° 4, p. 896-910. [https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010]
- ROCHE, M., CHAIGNEAU, E., RUNGTA, R.L., *et al.* (2019) In vivo imaging with a water immersion objective affects brain temperature, blood flow and oxygenation. *eLife* vol. 8, p. e47324. [https://doi.org/10.7554/eLife.47324]
- RUBIN, L.L., STADDON, J.M. (1999) The Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Neuroscience* vol. 22, n° 1, p. 11-28. [https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11]
- SANTÉ PUBLIQUE FRANCE (2021) Les morts maternelles en France : mieux comprendre pour mieux prévenir. 6e rapport de l'Enquête nationale confidentielle sur les morts maternelles (ENCMM) 2013-2015. [https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-cardiovasculaires-et-accident-vasculaire-cerebral/maladies-vasculaires-de-la-

grossesse/documents/enquetes-etudes/les-morts-maternelles-en-france-mieux-comprendre-pour-mieux-prevenir.-6e-rapport-de-l-enquete-nationale-confidentielle-sur-les-morts-maternelles] (consulté le 01/12/2023)

SCHAFFER, C.B., FRIEDMAN, B., NISHIMURA, N., *et al.* (2006) Two-Photon Imaging of Cortical Surface Microvessels Reveals a Robust Redistribution in Blood Flow after Vascular Occlusion. *PLoS Biology* vol. 4, n° 2, p. e22. [<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040022>]

SHIH, A.Y., RÜHLMANN, C., BLINDER, P., *et al.* (2015) Robust and Fragile Aspects of Cortical Blood Flow in Relation to the Underlying Angioarchitecture. *Microcirculation* vol. 22, n° 3, p. 204-218. [<https://doi.org/10.1111/micc.12195>]

STAROSOLSKI, Z., VILLAMIZAR, C.A., RENDON, D., *et al.* (2015) Ultra High-Resolution In vivo Computed Tomography Imaging of Mouse Cerebrovasculature Using a Long Circulating Blood Pool Contrast Agent. *Scientific Reports* vol. 5, n° 1, p. 10178. [<https://doi.org/10.1038/srep10178>]

STEUERNAGEL, L., LAM, B.Y.H., KLEMM, P., *et al.* (2022) HypoMap—a unified single-cell gene expression atlas of the murine hypothalamus. *Nature Metabolism* vol. 4, n° 10, p. 1402-1419. [<https://doi.org/10.1038/s42255-022-00657-y>]

TSAI, P.S., KAUFHOLD, J.P., BLINDER, P., *et al.* (2009) Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels. *The Journal of Neuroscience* vol. 29, n° 46, p. 14553-14570. [<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009>]

VAN DER BORGHT, K., KÓBOR-NYAKAS, D.É., KLAUKE, K., *et al.* (2009) Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: Temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis. *Hippocampus* vol. 19, n° 10, p. 928-936. [<https://doi.org/10.1002/hipo.20545>]

VIEITES-PRADO, A., RENIER, N. (2021) Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development* vol. 148, n° 18, p. dev199369. [<https://doi.org/10.1242/dev.199369>]

WU, Z., AUTRY, A.E., BERGAN, J.F., *et al.* (2014) Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature* vol. 509, n° 7500, p. 325-330. [<https://doi.org/10.1038/nature13307>]

YANG, X., MAURUDIS, A., GAMELIN, J., *et al.* (2009) Photoacoustic tomography of small animal brain with a curved array transducer. *Journal of Biomedical Optics* vol. 14, n° 5, p. 054007. [<https://doi.org/10.1117/1.3227035>]

LA PLASTICITÉ CÉRÉBROVASCULAIRE DURANT LA GESTATION CHEZ LA SOURIS

AUTEUR : Gabrièle LIENHARD

RÉSUMÉ :

La gestation s'accompagne d'un remodelage vasculaire intense dans certains territoires périphériques tels que l'utérus. Au niveau de l'encéphale de la future mère, elle s'accompagne d'une plasticité neuronale importante, mais le comportement du réseau vasculaire plus spécifiquement est mal connu. De manière générale, l'architecture du réseau vasculaire cérébral est considérée comme stable chez l'adulte en conditions physiologiques. Toutefois des indices croissants convergent vers l'existence possible d'une plasticité vasculaire cérébrale adulte sous certaines conditions. L'objectif de ce travail de thèse était de mettre à profit les nouvelles techniques de reconstruction cérébrovasculaire pour révéler une éventuelle plasticité vasculaire induite par la gestation dans l'encéphale de la souris adulte, et le cas échéant d'en étudier les mécanismes sous-jacents.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de remaniements vasculaires dans l'encéphale en gestation chez la souris, notamment dans l'aire pré-optique médiane (MPO), une région hypothalamique participant au contrôle des comportements maternels. La densification du réseau vasculaire y était associée à la présence de cellules de front, une structure d'exploration typique d'un remodelage vasculaire, et de cellules endothéliales en prolifération. Ces résultats réunis ont suggéré un processus d'angiogenèse par bourgeonnement dans la MPO pendant la gestation. Malgré cette plasticité, aucune rupture de l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique n'a pu être mise en évidence. La progestérone seule ne semblait pas être un signal suffisant pour reproduire les effets de la gestation sur le réseau vasculaire de la MPO. Quant aux voies de signalisation concernées, elles impliquent probablement les astrocytes, connus pour libérer des facteurs de croissance vasculaire.

Cette étude représente une avancée conceptuelle majeure, dans la mesure où elle révèle une plasticité inattendue du réseau vasculaire cérébral en conditions physiologiques. Le réseau vasculaire cérébral n'est pas aussi statique qu'on le considérait jusqu'à présent, et il est essentiel de poursuivre l'étude de sa plasticité, qui pourrait avoir une implication insoupçonnée dans la modulation des fonctions cérébrales, mais aussi dans certaines affections.

MOTS CLÉS :

PLASTICITÉ CÉRÉBROVASCULAIRE, GESTATION, MODÈLE ANIMAL, SOURIS, HISTOLOGIE

JURY :

Président : Pr Alain Fontbonne

Directrice de thèse : Pr Fanny Pilot-Storck

Examineur : Pr Laurent Tiret

Invité : Dr Nicolas Renier

CEREBROVASCULAR PLASITICTY DURING MOUSE GESTATION

AUTHOR: Gabrièle LIENHARD

SUMMARY:

Gestation is accompanied by intense vascular remodeling in peripheral areas such as the uterus. In the future mother's brain, it also causes significant neuronal plasticity, but the behavior of the vascular network itself is poorly understood. Generally speaking, the architecture of the cerebral vascular network is considered stable in adults under physiological conditions. However, there is growing evidence that adult cerebral vascular plasticity may exist under certain conditions. The aim of this work was to take advantage of new cerebrovascular reconstruction techniques to reveal possible gestation-induced vascular plasticity in the adult mouse brain, and if so, to study its underlying mechanisms.

This study demonstrated the existence of vascular remodeling in the pregnant mouse brain, particularly in the medial preoptic area (MPO), a hypothalamic region involved in the control of maternal behavior. Densification of the vascular network was associated with the presence of forehead cells, an exploratory structure typical of vascular remodeling, and proliferating endothelial cells. Together, these results suggested a process of budding angiogenesis in the MPO during gestation. Despite this plasticity, there was no evidence of a breakdown of the blood-brain barrier. Progesterone alone did not appear to be a sufficient signal to reproduce the effects of gestation on the MPO vascular network. As for the signaling pathways involved, they probably involve astrocytes, known to release vascular growth factors.

This study represents a major conceptual advance, as it reveals an unexpected plasticity of the cerebral vascular network under physiological conditions. The cerebral vascular network is not as static as previously thought, and it is essential to pursue the study of its plasticity, which could have an unsuspected implication in the modulation of cerebral functions, but also in certain diseases.

KEYWORDS:

CEREBROVASCULAR PLASTICITY, GESTATION, ANIMAL MODEL, MOUSE, HISTOLOGY

JURY:

Chairperson: Pr Alain Fontbonne

Thesis Director: Pr Fanny Pilot-Storck

Reviewer: Pr Laurent Tiret

Guest: Dr Nicolas Renier