



**HAL**  
open science

# Feedphobic : Rôle de l'environnement prénatal dans le développement de la néophobie alimentaire : régulation olfactive et hormonale chez l'oiseau

Aline Bertin

► **To cite this version:**

Aline Bertin. Feedphobic : Rôle de l'environnement prénatal dans le développement de la néophobie alimentaire : régulation olfactive et hormonale chez l'oiseau. ANR-FORM-090601-01-01, INRAE. 2016, 17 p. hal-04182456

**HAL Id: hal-04182456**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04182456v1>**

Submitted on 17 Aug 2023

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

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

**Projet ANR- 12-JSV7-0011-01**

**Feedphobic** : Rôle de l'environnement prénatal dans le développement de la néophobie alimentaire : régulation olfactive et hormonale chez l'oiseau

Programme JCJC 2012

A	IDENTIFICATION.....	2
B	RESUME CONSOLIDE PUBLIC .....	2
	B.1 Instructions pour les résumés consolidés publics .....	2
	B.2 Résumé consolidé public en français .....	2
	B.3 Résumé consolidé public en anglais.....	3
C	MEMOIRE SCIENTIFIQUE.....	4
	C.1 Résumé du mémoire .....	5
	C.2 Enjeux et problématique, état de l'art .....	5
	C.3 Approche scientifique et technique.....	6
	C.4 Résultats obtenus .....	7
	C.5 Exploitation des résultats.....	8
	C.6 Discussion .....	9
	C.7 Conclusions.....	9
	C.8 Références.....	9
D	LISTE DES LIVRABLES.....	10
E	IMPACT DU PROJET .....	10
	E.1 Indicateurs d'impact .....	10
	E.2 Liste des publications et communications.....	11
	E.3 Liste des éléments de valorisation.....	12
	E.4 Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires) .....	13

## A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	FeedPhobic
Titre du projet	Rôle de l'environnement prénatal dans le développement de la néophobie alimentaire : régulation olfactive et hormonale chez l'oiseau
Coordinateur du projet (société/organisme)	A. Bertin, INRA centre Val de Loire
Période du projet (date de début – date de fin)	01/11/2012 31/03/2016
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Aline Bertin
Téléphone	0247427974
Adresse électronique	aline.bertin@tours.inra.fr
Date de rédaction	30/05/2016

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	UMR PRC, INRA Val de Loire
---	----------------------------

## B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

### B.1 INSTRUCTIONS POUR LES RESUMES CONSOLIDES PUBLICS

### B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

*La néophobie alimentaire chez l'oiseau : facteurs de variation et origine*

*Mieux comprendre les facteurs contribuant à l'expression de néophobie alimentaire et les mécanismes sous-jacents impliqués*

L'objectif du projet est de mieux comprendre la relation entre la qualité de l'environnement prénatal des embryons et l'expression de néophobie alimentaire (i.e. peur d'un aliment nouveau) chez la poule domestique. Nous nous intéressons particulièrement à l'environnement chimiosensoriel des embryons et aux hormones d'origine maternelle présentes dans le jaune des œufs. Avec une approche éthologique le projet vise à déterminer dans quelle mesure l'expérience prénatale peut moduler la capacité des jeunes oiseaux à accepter des aliments nouveaux dans leur alimentation. De plus, grâce à une approche pluridisciplinaire le projet a pour objectif de décrire les circuits neurobiologiques ainsi que les gènes impliqués dans l'expression de ce comportement. Malgré la distance phylogénétique entre les Oiseaux et les Mammifères, le présent projet contribue à une meilleure compréhension de l'origine développementale des troubles du comportement alimentaire chez les vertébrés. Ce projet apporte des perspectives appliquées en agronomie où la peur des aliments nouveaux reste un levier à lever pour l'introduction de nouvelles matières premières dans la composition des aliments.

## *L'éthologie, la neurobiologie et la biologie moléculaire pour élucider les mécanismes sous-jacents à l'expression de néophobie*

Nous avons mis au point des tests comportementaux permettant d'évaluer la réponse de peur de jeunes oiseaux lorsqu'ils sont en présence d'un aliment qu'ils n'ont jamais expérimenté auparavant. Ces tests permettent d'analyser de manière fine l'amplitude des réponses de peur en fonction de l'expérience individuelle. Nous avons également mis au point une méthode d'injection d'hormones dans le jaune des œufs avant incubation et un modèle d'apprentissage olfactif *in ovo*. L'ensemble de ces techniques nous a permis de faire varier de manière contrôlée l'environnement dont dispose l'embryon au cours de son développement. En complément de cette approche éthologique, nous avons mis au point la détection d'un marqueur protéique permettant d'analyser les régions cérébrales qui sont spécifiquement activées lorsque les oiseaux expriment de la néophobie alimentaire. Ce projet a également pour objectif de mieux comprendre le déterminisme génétique, encore méconnu, de la néophobie. Par analyse *in silico*, nous avons établi une liste de 20 gènes potentiellement candidats.

### *Résultats majeurs du projet*

Les embryons mémorisent les propriétés chimiosensorielles de l'alimentation maternelle. Cependant, la présence de cette odeur familière ne réduit pas l'expression de peur face à un aliment nouveau. Une augmentation des concentrations en hormones stéroïdiennes dans le jaune des œufs, n'influence pas l'expression de néophobie alimentaire alors que la peur d'un environnement ou d'un objet nouveau est amoindrie. Nous avons identifié pour la première fois une structure cérébrale, le noyau accumbens, qui est activée spécifiquement en présence d'un aliment nouveau.

### *Production scientifique*

Le projet a fait l'objet de 3 articles dans des journaux internationaux à comité de lecture, deux dans des journaux généralistes (PlosOne, Dev. Psychobiol.) et un troisième sur invitation dans un numéro spécial dédié au bien-être des oiseaux d'élevage (Animals). Un 4<sup>ème</sup> est en cours de préparation. Ce projet a fait l'objet de 4 conférences sur invitation et de 5 communications affichées lors de congrès internationaux et nationaux. Un article de presse sur la néophobie est paru dans le journal Le Monde (29 mars 2016).

### *Informations factuelles*

Le projet FeedPhobic est un projet de recherche fondamentale coordonné par A. Bertin impliquant d'autres jeunes chercheurs de l'UMR PRC de l'INRA Val de Loire, L. Calandreau et P. Vaudin. Il a également bénéficié du soutien scientifique et technique de la plateforme d'imagerie de la plateforme d'imagerie cellulaire PIC coordonnée par M. Meurisse. Le projet, débuté en novembre 2012, a duré 42 mois. Il a bénéficié d'une aide de l'ANR de 175 000€ pour un coût total de 830 447 €.

## **B.3 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS**

### *Food neophobia in birds: regulating factors and origin*

#### *To better understand the factors involved in the expression of neophobia and the underlying mechanisms implicated*

The aim of this project is to better understand the relationship between the quality of the prenatal environment and the expression of food neophobia (i.e. fear of a novel food) in domestic hens. We are particularly interested in embryos's chemosensory environment and maternally derived yolk

hormones. With an ethological approach the project aims to determine how prenatal experience can modulate the ability of young birds to accept novel foods in their diet. In addition, through a multidisciplinary approach the project aims to describe the neurobiological circuitry as well as genes involved in the expression of this behavior. Despite the phylogenetic distance between birds and mammals, this project contributes to a better understanding of the developmental origin of eating disorders in vertebrates. This project brings perspectives applied in agronomy where fear of novel foods remains a lever up to the introduction of new raw materials in food composition.

### ***Ethology, neurobiology and molecular biology to elucidate the mechanisms underlying the expression neophobia***

We have developed behavioral tests to assess young birds fear responses when they are in front of a food they have never experienced before. These tests analyze finely the amplitude of fear responses depending on individual experience. We have also developed a method of injecting hormones into the egg yolk before incubation as well as an *in ovo* olfactory learning procedure. All of these techniques allowed us to modify in a controlled manner the environment available to the embryo during its development. Complementing this ethological approach, we have developed the detection of a protein marker for analyzing the brain regions that are specifically activated when birds express food neophobia. This project also aims to better understand the genetic determinism, still unknown in domestic hens. By *in silico* analysis, we have established a list of 20 potential candidate genes.

### ***Major results of the project***

Embryos memorize the chemosensory properties of the maternal diet. However, the presence of that familiar scent does not reduce the expression of fear responses when facing a novel food. Increased concentrations of yolk steroid hormones, do not influence the expression of food neophobia but reduce fear of a novel environment or a novel object. We have identify a brain structure, the nucleus accumbens , which is specifically activated in the presence of a novel food.

### ***Scientific output and patents since the beginning of the project***

This project resulted in the publication of three articles in international journals, two in generalist journals ( PlosOne , Dev. Psychobiol.) and a third, under invitation, in a special issue dedicated to animal welfare (Animals). Another paper is in preparation. This project was the subject of four invited talks and 5 poster presentations at international and national conferences. A press article on the topic of neophobia was published in Le Monde (29 March 2016).

### ***Factual information***

The project FeedPhobic is a basic research project coordinated by A. Bertin involving other young researchers from the UMR PRC de l'INRA Val de Loire, L. Calandreau and P. Vaudin. It also received the scientific and technical support from the Cellular Imaging Platform PIC coordinated by M. Meurisse. The project began in November 2012, lasted 42 months. He received support from ANR € 175,000 for a total cost of € 830,447.

## **C MEMOIRE SCIENTIFIQUE**

***Mémoire scientifique confidentiel*** : non

## C.1 RESUME DU MEMOIRE

L'objectif du projet est de mieux comprendre la relation entre la qualité de l'environnement prénatal des embryons et l'expression de néophobie alimentaire chez la poule domestique. Nous nous intéressons particulièrement à l'environnement chimiosensoriel des embryons et aux hormones d'origine maternelle présentes dans le jaune des œufs. Avec une approche éthologique le projet vise à déterminer dans quelle mesure l'expérience prénatale peut moduler la capacité des jeunes oiseaux à accepter des aliments nouveaux dans leur alimentation. De plus, grâce à une approche pluridisciplinaire le projet a pour objectif de décrire les circuits neurobiologiques ainsi que les gènes impliqués dans l'expression de ce comportement. Malgré la distance phylogénétique entre les Oiseaux et les Mammifères, le présent projet contribue à une meilleure compréhension de l'origine développementale des troubles du comportement alimentaire chez les vertébrés. Ce projet apporte des perspectives appliquées en agronomie où la peur des aliments nouveaux reste un levier à lever pour l'introduction de nouvelles matières premières dans la composition des aliments.

## C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

Le refus d'incorporer des aliments nouveaux dans son alimentation est un comportement décrit dans un grand nombre de taxa chez les vertébrés dont l'homme (e.g. Brigham & Sibly, 1999). Chez les espèces d'intérêt agronomique et économique, elle peut causer de fortes pertes financières pour les éleveurs (mammifères et oiseaux) et porter atteinte au bien-être animal (Jones, 1986). A ce jour, très peu de moyens sont mis en œuvre pour comprendre l'**origine développementale** de ce comportement et donc potentiellement **prévenir** son expression.

Chez les oiseaux nidifuges, l'ensemble des systèmes sensoriels et des circuits neurobiologiques sous-jacents sont fonctionnels avant l'éclosion. Pendant la vie embryonnaire, les embryons d'oiseau sont exposés à une multitude de stimulations sensorielles ; dont des stimulations chimiosensorielles (olfacto-gustatives). Selon la théorie de la continuité chimiosensorielle transnatale (Schaal & Orgeur, 1992), la capacité des embryons à percevoir et mémoriser des informations chimiosensorielles guide de manière adaptative le comportement alimentaire des jeunes. Dans ce contexte le présent projet avait pour objectif de déterminer si les embryons d'oiseaux pouvaient mémoriser les propriétés olfactives de l'alimentation maternelle et si une continuité olfactive entre l'alimentation de la mère et l'aliment des jeunes pouvait être utilisée, d'un point de vue appliqué, pour proposer un outil opérationnel visant à réduire l'expression de néophobie en élevage (Tâche 2).

En plus des stimulations sensorielles, l'œuf d'oiseau contient des **hormones stéroïdiennes** provenant de l'organisme maternel. Suivant l'environnement rencontré par la mère au moment de la formation de l'œuf, le follicule ovarien de la poule va produire plus ou moins de ces hormones qui vont diffuser dans le jaune de l'œuf. Ces hormones stéroïdiennes sont métabolisées dès les premiers jours de développement des embryons (von Engelhardt et al., 2009). Dans le cadre de ce projet nous avons cherché à déterminer si les concentrations en hormones stéroïdiennes pouvaient moduler de manière spécifique l'expression de néophobie alimentaire chez les jeunes poules domestiques. Nous avons également cherché à déterminer si l'environnement hormonal prénatal interférait avec la capacité des embryons à former une mémoire chimiosensorielle (Tâche 3).

Un autre enjeu du projet visait à identifier le **réseau neurobiologique et les gènes impliqués** dans l'expression de néophobie alimentaire. A ce jour, aucune étude n'avait tenté de caractériser un circuit neurobiologique impliqué dans la néophobie alimentaire chez l'oiseau. Chez les oiseaux, l'amygdale est impliquée dans la régulation des réponses de peur. La région du striatum ventral est, elle, impliquée dans le circuit de la récompense, incluant les récompenses alimentaires (Matsushima et al., 2003). Dans ce contexte, nous avons testé l'hypothèse que l'amygdale et le striatum ventral étaient impliqués dans l'expression de néophobie alimentaire chez la poule domestique.

Le déterminisme génétique de la néophobie alimentaire reste inconnu chez la poule domestique. Des travaux de Jozsa et al. (2005) rapportaient le rôle du gène PACAP dans la mémoire

olfactive chez l'embryon de poulet. D'autre part, une analyse QTL (Quantitative Trait Locus) a mis en évidence le lien entre le phénotype de néophobie alimentaire et le locus D8Mit156 chez la souris. Ce locus contient plus de mille gènes dont certains sont des candidats potentiels, en plus du gène PACAP, pour leur implication dans le phénotype de néophobie alimentaire. Le projet vise à identifier des gènes candidats dont l'expression est associée à la néophobie alimentaire (Tâche 4).

### C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Pour l'ensemble des tâches, nous avons mis en place des tests comportementaux permettant d'analyser de manière fine l'amplitude de la réponse émotionnelle des poussins lorsqu'ils sont placés en présence de nouveauté. Pour la tâche 2, nous avons testé la capacité des embryons à mémoriser les propriétés chimiosensorielles de l'alimentation maternelle en utilisant un ajout d'acides gras polyinsaturés oméga-3 (2% d'huile de poisson) dans l'alimentation maternelle. Ces acides gras sont transférés directement de l'alimentation maternelle au jaune des œufs et confèrent une odeur marquée de poisson (Gonzalez-Esquerra et Leeson, 2000). Cette approche nous a semblé moins risquée que d'utiliser de l'acétate d'isoamyl comme annoncé à l'origine. Après éclosion, nous avons cherché à déterminer si cette odeur de poisson, présente sur un aliment nouveau pouvait favoriser l'acceptation de cet aliment chez les jeunes oiseaux. Pour la tâche 3 nous avons modulé de manière fine les concentrations en hormones stéroïdiennes dans le jaune des œufs par une méthode expérimentale d'injection. Nous avons par la suite caractérisé les réponses de peur des jeunes oiseaux en les exposant à différentes situations présentant de la nouveauté (aliment nouveau, objet nouveau, environnement nouveau). Cette caractérisation fine permet de mettre en évidence les spécificités de la néophobie alimentaire. Nous avons également appliqué un protocole d'exposition *in ovo* à une odeur afin de déterminer si l'environnement hormonal prénatal interagit avec la capacité des embryons à former une mémoire chimiosensorielle.

Pour la tâche 4, notre étude visait à identifier un circuit neurobiologique de la néophobie alimentaire chez l'oiseau. Ainsi, 3 groupes de poussins ont été utilisés. Le premier groupe a été exposé à un aliment nouveau, le second à une mangeoire nouvelle (objet nouveau) contenant de l'aliment familier. Le dernier groupe a été exposé à un aliment familier. Dans chaque condition, les oiseaux ont été exposés 4 minutes au stimulus cible (l'objet nouveau, l'aliment nouveau, l'aliment familier) et replacés dans leur cage d'élevage à l'issue du test. Pendant le test, nous avons mesuré la latence à toucher la cible, le temps de contact avec la cible et le temps passé à manger l'aliment. Une heure trente après la fin du test, les cerveaux des oiseaux ont été prélevés et fixés au paraformaldéhyde. Des coupes de cerveaux ont ensuite été réalisées afin de révéler par immunohistochimie l'expression de la protéine Fos, un marqueur d'activation neuronale. Cette approche permet ainsi de mettre en évidence les structures cérébrales qui se sont activées lors du test.

L'identification des gènes dont l'expression varie selon le phénotype (néophobie alimentaire) a été basée sur la stratégie des gènes candidats. La majorité des gènes candidats sont issus du locus D8Mit156, d'autres proviennent d'analyse bibliographique comme le gène PACAP. Les candidats, parmi le millier de gènes contenus dans le locus D8Mit156, ont été sélectionnés suite à des recoupements de bases de données selon les critères suivants : i) existence d'un homologue aviaire, ii) produit dont la fonction est en accord avec le phénotype étudié et iii) expression dans le système nerveux central. A partir de ces gènes candidats, des amorces seront mises au point afin d'explorer leur expression dans les structures cérébrales impliquées dans le phénotype de néophobie alimentaire, identifiées dans la sous-tâche 4.1. Par la technique de PCR en temps réel sur cDNA issus d'ARN totaux de tissus cérébraux, la quantité de transcrits des gènes candidats sera mesurée sur des animaux avec et sans phénotype de néophobie alimentaire. Des poussins âgés de 7 à 10 jours ont été mis en présence soit d'aliment familier, soit d'aliment nouveau, soit d'une mangeoire nouvelle contenant l'aliment familier. Dans chaque condition, la latence à toucher l'aliment, le temps passé à manger, le nombre de cris de détresse et de trilles de peur ont été quantifiés afin d'évaluer l'amplitude de la réponse émotionnelle. L'ensemble de ces paramètres a permis de détecter et qualifier la réponse émotionnelle émise par les animaux avant prélèvement des tissus.

## C.4 RESULTATS OBTENUS

### Tâche 2 : Régulation chimiosensorielle de la néophobie alimentaire

Les travaux que nous avons menés consistaient à déterminer si une continuité olfactive transnatale pouvait être un outil permettant de réduire l'expression de néophobie chez les jeunes oiseaux. Nous avons ainsi montré que les jeunes oiseaux issus d'œufs de poules nourries avec un aliment contenant de l'huile de poisson mémorisaient cette odeur. Les jeunes oiseaux vont par la suite s'orienter préférentiellement vers l'odeur de poisson. Par contre nous avons observé que seuls les jeunes issus d'œufs de femelles nourries avec de l'huile de poisson exprimaient de la néophobie alimentaire (réduction du temps passé à manger et expression de cris de détresse en présence de l'aliment nouveau). Ils se sont également montrés plus émotifs lors d'un test d'immobilité tonique par rapport aux jeunes témoins. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication (Figure 1 ; Aigueperse et al., 2013). Suite à ces résultats nous avons obtenu une bourse de postdoctorat d'un an de l'Université François Rabelais de Tours pour analyser dans quelle mesure les acides gras polyinsaturés contenus dans le jaune des œufs prédisposaient les jeunes à exprimer de la néophobie alimentaire.

La suite de ces travaux consistait à déterminer si une continuité olfactive entre l'alimentation maternelle et celle des jeunes pouvait être utilisée comme un outil pour réduire la peur des aliments nouveaux, notamment à l'âge de la première transition alimentaire (3 semaines après éclosion). Nous n'avons pas observé d'orientation préférentielle pour l'odeur ce qui suggère qu'à cet âge la présence d'une odeur familière ne semble pas une clé déterminante pour faciliter l'acceptation d'un aliment inconnu.

### Tâche 3 : Régulation hormonale de la néophobie alimentaire

Pour ces travaux nous avons élevé de manière expérimentale les concentrations en hormones (testostérone, progestérone, estradiol) dans le jaune des œufs afin d'en étudier les conséquences sur la réaction immédiate des jeunes face à la nouveauté. Nos travaux ont mis en évidence une influence importante des hormones *in ovo* sur la réaction des jeunes oiseaux face à un objet nouveau (Figure 2) ou face à un environnement nouveau mais pas lorsqu'ils sont confrontés à un aliment nouveau (Tableau 1). Chez la poule domestique, des variations dans les concentrations en hormones dans les œufs ne semblent pas un facteur de risque pouvant contribuer à une expression exacerbée de néophobie alimentaire. De plus, la néophobie alimentaire apparaît comme un trait de comportement indépendant des autres dimensions de la réactivité émotionnelle des animaux (non corrélée). Ces résultats ont été publiés, sur invitation, dans un numéro spécial du journal *Animals* dédié au bien-être (Bertin et al., 2015).

Nous avons mis en évidence une influence de l'environnement hormonal prénatal sur la formation (ou l'utilisation) de la mémoire olfactive *in ovo*. Les jeunes issus d'œufs injectés en hormones et exposés à une odeur de poisson ne montrent aucune préférence pour les aliments odorisés ou non. Alors que les jeunes issus d'œufs sham (injectés avec le solvant) et exposés à la même odeur de hareng (et incubés dans le même incubateur) expriment des préférences nettes. Les jeunes témoins non-exposés ne montrent aucune préférence. De plus, sur une échelle de 24h, les jeunes issus d'œufs injectés consomment significativement moins d'un aliment nouveau (céréales) que les jeunes témoins ou les jeunes sham. Ces résultats indiquent qu'une augmentation dans les concentrations en hormones dans les œufs perturbe la formation des apprentissages *in ovo* ou son utilisation après éclosion. De plus, la difficulté à consommer un aliment nouveau sur une échelle de temps longue (24h) indique qu'un stress maternel pourrait favoriser l'expression de conservatisme alimentaire (évitement à long terme d'un aliment nouveau). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Bertin et al., 2016).

L'ensemble des tâches 2 et 3 a été réalisé en accord avec les livrables prévus (17 mois). Suite à cette étape importante, les hormones stéroïdiennes ou les stimulations chimiosensorielles *in ovo* ne sont pas apparues comme des facteurs forts pouvant réguler spécifiquement l'expression de néophobie alimentaire. Cependant, ces travaux ont permis une caractérisation très fine de la néophobie alimentaire qui se distingue bien de la peur d'un objet ou d'un environnement nouveau. Ce



résultat étant en accord avec d'autres études conduites sur des espèces sauvages (Bokony et al., 2012), nous avons choisi de poursuivre cet axe de recherche en caractérisant la spécificité de la néophobie alimentaire d'un point de vue neurobiologique et génétique (Tâche 4).

#### **Tâche 4 : identification du circuit neurobiologique et des gènes impliqués dans la néophobie**

Comme dans les études précédentes, nos tests comportementaux montrent que la latence à toucher l'aliment nouveau ou l'objet nouveau sont équivalentes et bien supérieures à la latence à toucher l'aliment familier. Inversement le temps passé à manger l'aliment nouveau, ou l'aliment familier dans la mangeoire nouvelle est bien inférieur au temps passé à manger l'aliment familier. Par ailleurs nos mesures indiquent que les vocalisations de peur (trilles), sont plus nombreuses lors de l'exposition à l'aliment nouveau ou à la mangeoire nouvelle que lors de l'exposition à l'aliment familier. Ainsi ces résultats confirment l'idée que les poussins sont bien sensibles à la nouveauté d'un aliment ou d'un objet et que cette nouveauté déclenche une réponse de néophobie.

Les analyses immunohistochimiques ont permis de révéler que l'expression du Fos (Figure 3C) était plus importante dans le groupe exposé à l'objet nouveau dans le noyau PoA, médian et intermédiaire de l'amygdale. En revanche au sein des noyaux taenia et dorsal aucune différence d'expression du Fos n'est constaté entre les groupes testés. Ces données indiquent que les noyaux PoA, médian et intermédiaire de l'amygdale sont spécifiquement activés dans la néophobie à l'objet (Figure 3A). Au sein du striatum, l'expression Fos était plus importante dans le noyau latéral et le noyau accumbens au sein du groupe exposé à un aliment nouveau. Cette fois encore, ces effets semblent spécifiques de certaines aires du striatum puisqu'une telle différence entre les groupes n'est pas observée au sein du noyau médian (Figure 3B). En résumé, nos données suggèrent une double dissociation fonctionnelle entre l'amygdale et le striatum dans la néophobie à un objet et la néophobie alimentaire. Alors que l'amygdale, et plus spécifiquement les noyaux PoA, médian et intermédiaire de l'amygdale, seraient impliqués dans la néophobie à l'objet, le striatum (noyau latéral et accumbens) serait lui spécifiquement impliqué dans la néophobie alimentaire. Ces résultats révèlent ainsi un rôle critique du striatum dans la néophobie alimentaire. Ces travaux ont été réalisés avec le recrutement d'un CDD de 12 mois (E. Perez). De plus nous avons souhaité approfondir ces résultats par une analyse plus approfondie de sous régions du striatum et de l'amygdale. Une prolongation du projet de 6 mois a été obtenue pour conforter ces résultats novateurs.

Les études de biologie moléculaire ont pour objectif de compléter cette première approche afin d'identifier au sein de ces régions des gènes cibles impliqués de façon spécifique dans la néophobie alimentaire. L'analyse *in silico*, consistant à interroger les bases de données numériques et à recouper les informations, a permis de retenir une liste de 20 gènes pour explorer leur expression dans le cerveau de caille avec ou sans phénotype de néophobie alimentaire. Les amorces pour la PCR temps réel ont été mises au point et qualifiées pour certaines. Les échantillons biologiques ont été récoltés à partir de 13 individus avec aliment familier, 12 individus avec aliment nouveau et 13 avec objet nouveau. Deux zones cérébrales ont été disséquées, le striatum et l'amygdale. Des tests d'extraction d'ARN ont été réalisés, ceux-ci ont permis de valider la méthode de préparation des ARN totaux. Les expériences de PCR temps réel pour la mesure d'expression des gènes sont en cours de réalisation. Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'un CDD de 12 mois confié à Gwenhaël Jégot. M<sup>me</sup> Jégot a assuré le travail *in silico* sous l'encadrement du coordinateur de la sous-tâche 4.2 qui a assuré sa formation et son accompagnement dans cette discipline. M<sup>me</sup> Jégot a également suivie une formation d'une semaine en PCR temps réel à l'université Paris-Diderot. Après la récolte des échantillons biologiques, M<sup>me</sup> Jégot a été malheureusement en arrêt pendant les 2 derniers mois et demi du contrat ce qui aurait été nécessaire à l'obtention des premiers résultats d'expression génique des candidats.

## **C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS**

Les résultats du projet sont en partie valorisés. Le projet a fait l'objet de 3 articles dans des journaux internationaux à comité de lecture (Aigueperse et al., 2013 ; Bertin et al., 2015 ; Bertin et al., 2016) Ce projet a fait l'objet de 4 conférences sur invitation et de 5 communications affichées lors de congrès

internationaux et nationaux. Un article de presse sur la néophobie est paru dans le journal Le Monde (29 mars 2016). Pour la tâche 4, un article est en préparation. Les analyses encore en cours seront valorisées d'ici 2017.

## C.6 DISCUSSION

A ce jour la plus grande partie du projet a été réalisée dans les 42 mois (36 mois + 6 mois). Pour la tâche 4, après la récolte d'échantillons, l'analyse de l'expression des gènes candidats constitue la dernière étape. Cette dernière est en cours de réalisation suite à l'amputation de 2 mois et demi de CDD (arrêt de travail en fin de contrat) et à la réorganisation nécessaire. En effet, le coordinateur de la sous-tâche 4.2 doit former à la biologie moléculaire un technicien nouvellement recruté dans son équipe de recherche et ainsi permettre l'achèvement du projet. Dans l'ensemble, les résultats obtenus permettent de répondre aux objectifs initiaux du projet visant à mieux comprendre l'origine développementale et les bases biologiques de la néophobie alimentaire chez la poule domestique. Nos travaux fournissent des résultats originaux qui corroborent l'hypothèse d'une spécificité de la néophobie alimentaire. Ils ouvrent de nouvelles perspectives sur l'implication de l'alimentation maternelle comme facteur de régulation et sur l'identification de gènes pouvant être utilisés par les sélectionneurs.

## C.7 CONCLUSIONS

Le projet Feedphobic a permis d'obtenir des résultats originaux et novateurs. Nous avons montré pour la première fois une capacité des embryons à mémoriser les propriétés olfactives de l'alimentation maternelle. Ces résultats ouvrent des perspectives de recherche sur l'influence de la qualité de l'alimentation maternelle sur la construction du phénotype comportemental des descendants. Nous montrons également que la néophobie alimentaire présente des caractéristiques et un système de régulation différent d'autres types de néophobies classiquement rencontrés chez les vertébrés. Nous révélons pour la première fois un rôle critique du striatum dans la néophobie alimentaire. L'amygdale apparaît davantage impliquée dans des formes de néophobie non alimentaires comme la néophobie à un objet nouveau. Malgré la distance phylogénétique entre les Oiseaux et les Mammifères, le présent projet peut contribuer à une meilleure compréhension de l'origine développementale des troubles du comportement alimentaire chez les vertébrés et servir de base à l'analyse fine des mécanismes de régulation des gènes. *Gallus gallus domesticus* est l'espèce aviaire la plus répandue au niveau mondial avec une production annuelle de 50 billions de poulets de chair et plus de 5 billions de poules pondeuses qui produisent plus d'1 trillion d'œufs pour l'alimentation humaine. Si l'alimentation des populations parentales peut contribuer à une meilleure adaptation des animaux aux conditions d'élevage, ce projet pourrait avoir de fortes retombées pour le bien-être animal.

## C.8 REFERENCES

- Aigueperse, N., Calandreau, L., Bertin, A. (2013). Plos One, 8 (10), 1-11. DOI : 10.1371/journal.pone.0077583
- Bertin, A., Chanson, M., Delaveau, J., Mercierand, F., Möstl, E., Calandreau, L., Arnould, C., Leterrier, C., Collin, A. (2013). Plos One, 8 (2), 1-12. DOI : 10.1371/journal.pone.0057670
- Bertin, A., Arnould, C., Moussu, C., Meurisse, M., Constantin, P., Leterrier, C., Calandreau, L. (2015) Animals. 2015 Nov 30;5(4):1220-32. doi: 10.3390/ani5040408.
- Bertin, A., Meurisse, M., Arnould, C., Leterrier, C., Constantin, P., Cornilleau, F., Vaudin, P., Burlot, T., Delaveau, J., Rat, C., Calandreau, A. (2016) Dev. Psychobiol. 58, 185-197. (doi:10.1002/dev.21364)
- Bókony, V., Kulcsár, A., Tóth, Z., Liker, A., (2012). Personality Traits and Behavioral Syndromes in Differently Urbanized Populations of House Sparrows *Passer domesticus* Plos One 7, e36639.
- Gonzalez-Esquerra, R. and Leeson, S. (2000) Brit. Poult. Sci., 41, 481-488.
- Jones, R.B. (1986) Behav. Processes, 12, 261-271.
- Jozsa, R., Hollosy, T., Tamas, A., Toth, G., Lengvari, I. and Reglodi, D. (2005) Peptides, 26, 2344-2350.
- Schaal, B., & Orgeur, P. (1992). Quarterly Journal of Experimental Psychology: Section B, 44(3-4), 245-278.
- von Engelhardt, N., Henriksen, R. and Groothuis, T.G.G. (2009) Gen. Comp. Endocrinol., 163, 175-183.

## D LISTE DES LIVRABLES

Quand le projet en comporte, reproduire ici le tableau des livrables fourni au début du projet. Mentionner l'ensemble des livrables, y compris les éventuels livrables abandonnés, et ceux non prévus dans la liste initiale.

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
M8	2	Régulation chimiosensorielle de la néophobie alimentaire	Récolte de données comportementales	<u>A. Bertin</u> L. Calandreau	livrée
M17	3	Régulation hormonale de la néophobie alimentaire	Récolte de données comportementales et prélèvements	<u>A. Bertin</u> L. Calandreau	livrée
M42	4.1	Identification des circuits neurobiologiques impliqués dans la néophobie	Analyse des échantillons	<u>L. Calandreau</u> E.Perez (CDD)	livrée
	4.2	Identification des gènes impliqués dans la néophobie	Analyse des échantillons	<u>P. Vaudin</u> G. jegot (CDD)	En cours

## E IMPACT DU PROJET

### E.1 INDICATEURS D'IMPACT

**Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)**

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
<b>International</b>	Revue à comité de lecture		3
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)		4
<b>France</b>	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)		4
<b>Actions de diffusion</b>	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation		1
	Autres		1

**Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)**

*Ce tableau dénombre et liste les brevets nationaux et internationaux, licences, et autres éléments de propriété intellectuelle consécutifs au projet, du savoir faire, des retombées diverses en précisant les partenariats éventuels. Voir en particulier celles annoncées dans l'annexe technique).*

	<b>Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)</b>
<b>Brevets internationaux obtenus</b>	
<b>Brevet internationaux en cours d'obtention</b>	
<b>Brevets nationaux obtenus</b>	
<b>Brevet nationaux en cours d'obtention</b>	
<b>Licences d'exploitation (obtention / cession)</b>	
<b>Créations d'entreprises ou essaimage</b>	
<b>Nouveaux projets collaboratifs</b>	1 dépôt de projet ANR financé
<b>Colloques scientifiques</b>	
<b>Autres (préciser)</b>	

## **E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

### **Revue internationale à comité de lecture (3)**

1-Bertin, A., Meurisse, M., Arnould, C., Leterrier, C., Constantin, P., Cornilleau, F., Vaudin, P., Burlot, T., Delaveau, J., Rat, C., Calandreau, L., (2016). Yolk hormones influence in ovo chemosensory learning, growth, and feeding behavior in domestic chicks. *Dev. Psychobiol.* 58, 185-197.

2- Bertin, A., Arnould, C., Moussu, C., Meurisse, M., Constantin, P., Leterrier, C., Calandreau, L., (2015). Artificially Increased Yolk Hormone Levels and Neophobia in Domestic Chicks. *Animals* 5, 0408.

3- Aigueperse N, Calandreau L, Bertin A (2013) Maternal Diet Influences Offspring Feeding Behavior and Fearfulness in the Precocial Chicken. *PLoS ONE* 8(10): e77583. doi:10.1371/journal.pone.0077583

### **Communications internationales (conférence) classées par année (4)**

1. Poster: Bertin, A., Aigueperse, N., Calandreau, L. (2015). Maternal diet influences offspring feeding behavior and fearfulness in birds. 48th Annual Meeting of the International Society for Developmental Psychobiology ISDP, San Sebastian, ESP (2015-07-20 - 2015-07-23)

2. **Conférence invitée:** A. Bertin, T. Burlot, B. Bernard, M. Meurisse, F. Cornilleau, P. Constantin, P. Vaudin, L. Calandreau (2014): Olfactory experience of chicken embryos influences food preferences after hatching. Royal Society scientific meeting "When senses take flight: the evolution, development, mechanisms and function of avian senses", 4-5 sept, Buckinghamshire (UK).

3. Poster: A. Bertin, T. Burlot, B. Bernard, M. Meurisse, F. Cornilleau, P. Constantin, P. Vaudin, L. Calandreau (2014): Yolk hormones influence in ovo olfactory learning and feeding behavior in domestic chicks. VII European Conference on Behavioural Biology, 17-20 juillet, Prague (Hongrie)

4. Poster: Perez, E., Constantin, P., Cornilleau, F., Meurisse, M., Vaudin, P., Bertin, A., Calandreau, L. (2014). First investigation of the cerebral network implicated in food neophobia in young chicken

Gallus gallus domesticus. VII European Conference on Behavioural Biology, 17-20 juillet, Prague (Hongrie)

#### **Communications françaises (conférences) (4)**

1. **Conférence invitée** : A. Bertin (2016). Expérience olfactive in ovo et comportement alimentaire chez l'oiseau. 5e colloque annuel de l'ITMO Physiopathologie, métabolisme, nutrition : Vers de nouveaux concepts, Paris, 21/01/2016.
2. **Conférence invitée**: Bertin, A., Arnould, C., Leterrier, C., Lévy, F., Calandreau, L. (2014). Expérience olfactive in ovo et comportement alimentaire chez l'oiseau. 10èmes Journées d'Animation Scientifique AROMAGRI, Comportement Alimentaire et Sens Chimiques, Nouzilly, (2014-11-20 - 2014-11-21)
3. Poster : N. Aigueperse, L. Calandreau, A. Bertin (2013) : L'alimentation de la mère influence les préférences alimentaires des descendants chez l'oiseau. Société Française pour l'Etude du Comportement Animal, 19-21 Novembre 2013, Dijon.
4. Poster : N. Aigueperse, L. Calandreau, A. Bertin (2013) : L'embryon de poulet mémorise l'odeur de l'alimentation maternelle. Journées d'Animations du Département Phase, INRA, 3-4 Octobre 2013. Prix de la meilleure communication affichée.

#### **Conférences vulgarisation**

- 1- **Conférence invitée** : Bertin, A. (2014). La vie d'une poule pendant qu'elle fait son œuf influence le comportement des descendants. Journée d'Animation Scientifique "Epigénétique et Elevage", Paris, FRA (2014-04-03 - 2014-04-03).

#### **Autres**

1. Article de presse dans le journal le monde 29 mars 2016 « La phobie alimentaire, les poules aussi ».

### **E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION**

-Ce projet a permis l'émergence d'un nouveau projet collaboratif : projet ANR PReSTO'Cog financé en 2014. Effets de stress prénatals sur le développement précoce des comportements et des capacités cognitives : une approche comparative

-Les premiers résultats obtenus sur l'influence de l'alimentation maternelle ont permis d'obtenir une bourse de l'Université François Rabelais de Tours sur projet pour le financement d'un post-doctorat étranger (2014).

## E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Ce tableau dresse le bilan du projet en termes de recrutement de personnels non permanents sur CDD ou assimilé. Renseigner une ligne par personne embauchée sur le projet quand l'embauche a été financée partiellement ou en totalité par l'aide de l'ANR et quand la contribution au projet a été d'une durée au moins égale à 3 mois, tous contrats confondus, l'aide de l'ANR pouvant ne représenter qu'une partie de la rémunération de la personne sur la durée de sa participation au projet.

Les stagiaires bénéficiant d'une convention de stage avec un établissement d'enseignement ne doivent pas être mentionnés.

Les données recueillies pourront faire l'objet d'une demande de mise à jour par l'ANR jusqu'à 5 ans après la fin du projet.

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
Jégot Gwenaël	F	gwen_jegot@yahoo.fr	9 juin 2015	Doctorat	Tours, France	6	P Vaudin	Post-doc	12	31/08/2015	Sans nouvelles				
Perez Emilie	F	perezemilie@gmail.com	25 Mai 2016	Doctorat	Lyon/Saint Etienne, France 2) Sydney, Australie	3 ans 4 mois assistante de recherche Université Jean Monnet, Saint Etienne	L. Calandreau	Post-doc (contrat ingénieure de recherche)	12	05/01/15	Post-doc à l'étranger, CDD	Universités (Étranger, Angleterre et États Unis)	Chercheuse	NON	OUI
Marion Georgelin	F	georgelin.marion@hotmail.fr	30 mai 2016	Master 2	Tours, France	0	L. Calandreau	Assistant ingénieur	4	31/12/2015	CDD	INRA	Assistant ingénieur	OUI	OUI

### Aide pour le remplissage

(1) **Adresse email** : indiquer une adresse email la plus pérenne possible

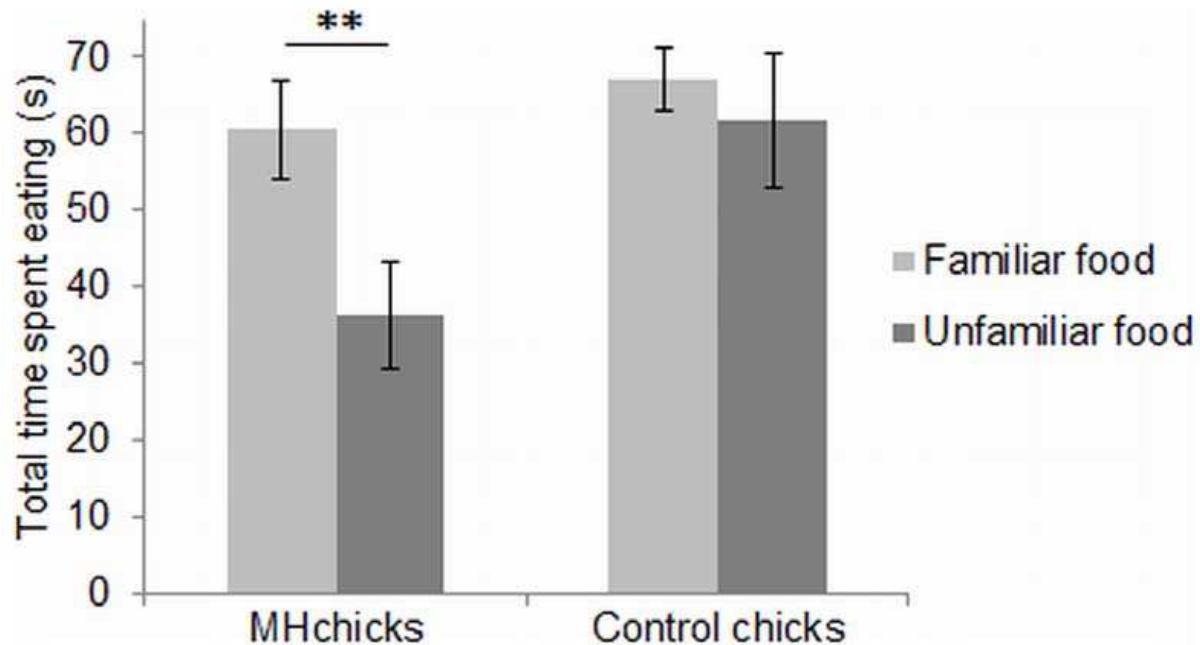
(2) **Poste dans le projet** : post-doc, doctorant, ingénieur ou niveau ingénieur, technicien, vacataire, autre (préciser)

(3) **Durée missions** : indiquer en mois la durée totale des missions (y compris celles non financées par l'ANR) effectuées sur le projet

- (4) **Devenir professionnel** : CDI, CDD, chef d'entreprise, encore sur le projet, post-doc France, post-doc étranger, étudiant, recherche d'emploi, sans nouvelles
- (5) **Type d'employeur** : enseignement et recherche publique, EPIC de recherche, grande entreprise, PME/TPE, création d'entreprise, autre public, autre privé, libéral, autre (préciser)
- (6) **Type d'emploi** : ingénieur, chercheur, enseignant-chercheur, cadre, technicien, autre (préciser)
- (7) **Lien au projet ANR** : préciser si l'employeur est ou non un partenaire du projet
- (8) **Valorisation expérience** : préciser si le poste occupé valorise l'expérience acquise pendant le projet.

*Les informations personnelles recueillies feront l'objet d'un traitement de données informatisées pour les seuls besoins de l'étude anonymisée sur le devenir professionnel des personnes recrutées sur les projets ANR. Elles ne feront l'objet d'aucune cession et seront conservées par l'ANR pendant une durée maximale de 5 ans après la fin du projet concerné. Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, les personnes concernées disposent d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données personnelles les concernant. Les personnes concernées seront informées directement de ce droit lorsque leurs coordonnées sont renseignées. Elles peuvent exercer ce droit en s'adressant l'ANR (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/Contact>).*

**Figure 1** : Comparaison du temps total passé à manger entre un test de 3-min avec un aliment familier (familiar food) et un test de 3-min avec un aliment nouveau (unfamiliar food) par des poussins témoins (Control chicks) ou des poussins provenant de mères nourries avec un aliment contenant de l'huile de poisson (MH chicks). Les symboles \*\* indiquent une différence très significative entre les deux aliments chez les poussins MH. Ces poussins ont passé deux fois moins de temps à manger l'aliment nouveau que l'aliment familier ce qui constitue un signe de néophobie alimentaire. Cette réaction est absente chez les poussins témoins. Ce graphique est issu de la publication: Aigueperse N, Calandreau L, Bertin A (2013) Maternal Diet Influences Offspring Feeding Behavior and Fearfulness in the Precocial Chicken. PLoS ONE 8(10): e77583. doi:10.1371/journal.pone.0077583





**Figure 2 :** Comparaison de la latence à aller manger et du temps passé à manger un aliment familier dans un test de 3-min avec une mangeoire nouvelle (objet nouveau). Les poussins témoins (C chicks) mettent deux fois plus de temps à approcher la mangeoire et passent deux fois moins de temps à manger que les poussins issus d'œufs injectés avec une solution hormonale avant incubation (H chicks).

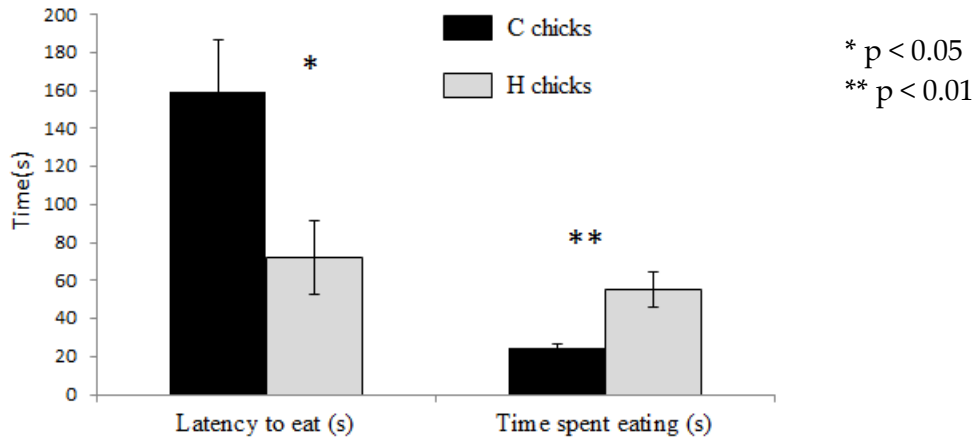


Tableau 1 : Comparaison de la latence à aller manger et du temps passé à manger différents types d'aliments nouveaux (test 1, test 2, test 3) dans un test de 3-min. Les poussins témoins (C chicks) ne diffèrent pas significativement des poussins issus d'œufs injectés avec une solution hormonale avant incubation (H chicks).

Food Neophobia Test	Parameters Measured	C Chicks	H Chicks	* p-Value
Odorized familiar food Test 1	latency to eat (s)	72.1 ± 10.9	54.1 ± 10.1	0.48
	time spent eating (s)	41.7 ± 6	46.4 ± 6.3	0.87
Corn wheat mix Test 2	latency to eat (s)	75.3 ± 15.2	63.8 ± 15.5	0.48
	time spent eating (s)	11.6 ± 2.5	9.6 ± 2.1	0.23
Millet seeds Test 3	latency to eat (s)	132.7 ± 15.5	135.1 ± 13.1	0.73
	time spent eating (s)	5.4 ± 1.9	13.0 ± 5.0	0.75

Ces résultats illustrent la spécificité de la néophobie alimentaire. Si la peur d'un objet nouveau apparaît fortement influencée par les concentrations stéroïdiennes *in ovo* (Figure 1), il n'en est pas de même pour la peur d'un aliment nouveau (Tableau 1).

Ces illustrations sont issues de la publication: Bertin A, Arnould C, Moussu C, Meurisse M, Constantin P, Leterrier C, Calandreau L (2015) : Artificially Increased Yolk Hormone Levels and Neophobia in Domestic Chicks. *Animals*. 2015 Nov 30;5(4):1220-32. doi: 10.3390/ani5040408.

**Figure 3** : Illustration des activations Fos, un marqueur d'activation cellulaire, au sein des sous régions (A) de l'amygdale (noyau PoA, Médian, Intermédiaire) et (B) du striatum (noyau Accumbens, Latéral) mesurés chez des groupes de poussins exposés 4 min à un aliment familier (groupe Aliment Familier), nouveau (groupe Aliment Nouveau) ou à une mangeoire nouvelle contenant un aliment familier (groupe Objet Nouveau). (C) Illustration du marquage Fos dans le PoA. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ . Les résultats montrent que l'expression Fos dans l'amygdale (noyau PoA, Médian et Intermédiaire) est plus importante chez les individus du groupe exposé à la mangeoire nouvelle. Dans le striatum (noyau Accumbens et Latéral), l'activation Fos est plus importante chez le groupe exposé à l'aliment nouveau. Ces données suggèrent donc une dissociation fonctionnelle entre l'amygdale et le striatum. L'amygdale serait impliquée dans la néophobie à l'objet alors que le striatum serait impliqué dans la néophobie alimentaire.

