



HAL
open science

**Implication du système nerveux central dans la
régulation des grandes fonctions. De l'anatomie à la
fonction, de la neurochimie à l'imagerie par résonance
magnétique**

Elodie Chaillou

► **To cite this version:**

Elodie Chaillou. Implication du système nerveux central dans la régulation des grandes fonctions. De l'anatomie à la fonction, de la neurochimie à l'imagerie par résonance magnétique. Autre [q-bio.OT]. Université François Rabelais (Tours), 2013. tel-02806072

HAL Id: tel-02806072

<https://hal.inrae.fr/tel-02806072>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

Année Universitaire : 2012-2013

HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement

par :

Elodie CHAILLOU-SAGON

Le 11 février 2013

JURY : **(Par ordre alphabétique)**

Prénom:	NOM	Grade	Etablissement d'exercice
André	Calas	Professeur émérite	Université de Bordeaux
Christophe	Destrieux	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier	Université de Tours
Benoît	Malpaux	Directeur de recherche	INRA, TOURS
Olivier	Rampin	Directeur de recherche	INRA, Jouy-en-Josas
Pierre-Yves	Risold	Chargé de recherche HDR	INSERM, Université de Franche- Comté
Yves	Tillet	Directeur de recherche	INRA, TOURS

Je me souviens avoir passé beaucoup de temps à réfléchir aux remerciements pour mon mémoire de DEA (ce diplôme ne s'appelait pas encore un M2 en 1996) et de thèse. A l'occasion du mémoire d'HDR (ce diplôme existait-il en 1996 ?) qu'allais-je faire : remercier toutes les personnes sans lesquelles je ne serais pas parvenue jusque-là, dénoncer la personne à cause de laquelle j'aurais pu ne pas être là ou que sais-je encore ! Finalement, je me suis décidée, je profite de l'occasion pour partager quelques pensées que vous êtes libres de passer !

Ma première extase scientifique s'est déroulée en terminale F7 (1990), en cours de biochimie lorsque j'ai pris conscience que nous étions ce que nous étions grâce à quatre molécules dont la combinaison à l'infini fait que nous sommes ce que nous sommes ! La deuxième s'est produite à la fin de l'année 1996, lorsque j'ai vu pour la première fois un neurone dans un microscope. C'était incroyable de voir l'entité qui est à l'origine de notre pensée !

Depuis, il y a eu de nombreux moments professionnels excitants, émouvants, hilarants, affligeants, décourageants, déprimants, épanouissants... Excitant lorsque le cœur s'emballe parce qu'on a peur de ne pas terminer à temps, parce qu'on attend l'apparition d'un marquage les yeux collés aux oculaires du microscope, parce qu'on croise les doigts pour que la brebis ne bêle pas... Hilarant lorsque les expériences tardives se terminent dans le mur... Affligeant lorsque l'on prend conscience que le fruit du travail de la recherche résulte d'un collectif d'individualistes... Captivant lorsque les idées fusent à tout va et qu'elles avancent dans le débat... Décourageant lorsque les projets auxquels on croit n'aboutissent pas... Epanouissant lorsqu'on partage notre savoir avec un public d'enfants qui réalisent à quoi peut servir leur cerveau : « c'est à cause de lui si je me fais gronder », « Le cerveau est un ordinateur qui marche tout seul »...

Mais pour marcher toute seule, nombreux sont ceux qui ont tenu ma main : grand-papy et grand-mamie, papy et mamie, mes parents, mes nombreux « tatas et tontons », sans parler de leurs enfants et de leurs petits enfants ! Les parrains Michel et Guy. Et les plus chers à mon cœur qui ont à me supporter (dans tous les sens du terme) : Nicolas, Pierre, Apolline et Hippolyte.

Sans oublier les nombreux autres : Sandy, Yves, Benoît, Philippe, Alain, les DidierS, les nombreuses Sophie, Eric et nos lectures, Marie-Christine de Saint-Gilles, Gaëlle, Aline de Theix, Nicole et le club café, mes coachs Ludo et Matth, les copains du gîte, Kat-woman, Cath, les choristes du ♥², les copines de step, Annie, Anne-Lyse et tous les autres... qui ont tenu, tendu, guidé, aidé, encouragé... Merci !

Et alors ? Pourquoi l'HDR ? Bonne question ! Pour avoir l'occasion de rédiger cette page ? De m'inscrire dans une université pour la première fois en 2012 ? Tout simplement pour avoir l'occasion de diriger une thèse, d'encadrer un doctorant, de passer le flambeau, de transmettre ce qu'on m'a transmis et qui sait un jour de passer encore un concours !

Dans le document qui suit, j'aurais aimé ponctuer certaines de mes phrases par quelques points d'interrogation, d'exclamation mais c'est avant tout un document scientifique même s'il n'a pas la prétention d'être une démonstration mais simplement un bilan de mes activités de recherche. Activités de recherche qui n'auraient pu se faire sans l'aide des animaliers de Saint-Gilles, de Nouzilly ou de Theix, l'aide des membres d'atelier et labo communs (Anne-Lyse, Christian...), l'aide de précieux techniciens (Aline, Fabien, Hélène), sans la collaboration avec l'IdRS, Jozsef... et tant d'autres !

Et un très grand merci à vous, membres du jury, qui avez accepté d'examiner ce mémoire et de vous rendre disponibles pour une dernière soutenance. Vous êtes tous des témoins de ces années écoulées : ma naissance de chercheur, mon titre de docteur, ma tentative sur le cochon, ma renaissance, ma mutation de l'histologie vers l'imagerie in vivo, ma joie de rencontrer l'auteur de la revue que j'ai tant admirée au cours de ma thèse !

Pour mes parents, Nicolas et mes enfants que je me permets de citer :

« Quand je suis triste, j'ai mon cerveau qui pleure de tout son cœur », Pierre, 31 mars 2010

« Si je sais ce que c'est la puberté ! C'est la statue de la puberté » « Les cauchemars, c'est quand le cerveau, il a mal rangé », Apolline, oct-nov

2012 « Mais je dors pas debout, je dors assis ! », Hippolyte, septembre 2012



Membres du jury :

Rapporteurs :

Christophe Destrieux

Olivier Rampin

Pierre-Yves Risold

Examineurs :

André Calas

Benoît Malpaux

Yves Tillet

Invitée et Professeur référent :

Anne Duittoz



***Implication du système nerveux central dans la régulation des grandes fonctions.
De l'anatomie à la fonction,
de la neurohistochimie à l'imagerie par résonance magnétique.***

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	5
CURRICULUM VITAE	7
LISTE DE PUBLICATIONS.....	10
AVANT-PROPOS.....	14
ACTIVITES DE RECHERCHE.....	15
I. NEUROPEPTIDES HYPOTHALAMIQUES ET INTERACTION ENTRE NUTRITION ET REPRODUCTION	15
<i>I.2. Identification des structures neuronales contenant de la galanine, du NPY ou de la CCK</i>	<i>16</i>
Neuropeptide Y	16
Cholecystokinine.....	17
Galanine	17
<i>I.3. Structures activées par l'absence de prise alimentaire et corrélats neuropeptidergiques.....</i>	<i>18</i>
Caractérisations des statuts nutritionnel et reproductif des animaux.....	19
Activation neuronale.....	20
Influence d'un jeûne de 24h sur les populations de neurones contenant du CRF, du NPY et de la galanine	21
Conclusions	21
<i>I.4. Substrats neurobiologiques de la sécrétion de la LH sensibles à l'état nutritionnel</i>	<i>22</i>
Caractérisations des statuts nutritionnel et endocrinien des animaux.....	22
Impact de l'état nutritionnel sur la population de neurones CRF-ir.....	23
Impact de l'état nutritionnel sur les populations NPY-ir.....	23
Impact de l'état nutritionnel sur les populations galanine-ir	23
Conclusions	24
<i>I.5. Etat des connaissances en 2012.....</i>	<i>24</i>
<i>I.6. Publications internationales avec comité de lecture.....</i>	<i>25</i>
II. REGULATION NERVEUSE DE L'INGESTION CHEZ LE PORC : ROLE CENTRAL DES STIMULI GASTRO-DUODENaux POST-INGESTIFS	26
<i>II.1. Contexte professionnel.....</i>	<i>26</i>
<i>II.2. Identification des régions cérébrales activées par la distension gastrique</i>	<i>26</i>
<i>II.3. Identification des régions cérébrales activées par l'électrostimulation de la branche cervicale du nerf vague</i>	<i>28</i>
<i>II.4. Description de l'innervation des voies vagales.....</i>	<i>28</i>
<i>II.5. Etat de mes connaissances en 2012.....</i>	<i>31</i>
<i>II.6. Publication internationale avec comité de lecture.....</i>	<i>31</i>
III. NEUROBIOLOGIE DES EMOTIONS INDUITES PAR L'ISOLEMENT SOCIAL	32
<i>III.1. Les animaux d'élevage ressentent des émotions</i>	<i>32</i>
<i>III.2. Grégarité et comportements émotionnels.....</i>	<i>32</i>
<i>III.3. Influence de la mélatonine sur les réponses émotionnelles induites par l'isolement social.....</i>	<i>34</i>
Validation d'un modèle d'isolement induit par le retrait de congénères familiaux	34
Effets rapides de la mélatonine sur les réponses hormonales et comportementales induites par l'isolement social.....	35
<i>III.4. Réseau neuronal impliqué dans les comportements émotionnels et l'impact de la mélatonine</i>	<i>37</i>
Implication du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans l'effet modérateur de la mélatonine	39
Implication de la matière grise périaqueducule dans l'effet modérateur de la mélatonine	40
<i>III.5. Projet ANR LinkPAG, connexions neuroanatomofonctionnelles de la matière grise périaqueducule.....</i>	<i>43</i>
Description des connectivités fonctionnelles par IRM	43
Stimulation électrophysiologique de la matière grise périaqueducule sur les comportements.....	44
<i>III.5. Financements</i>	<i>44</i>
<i>III.6. Projets collaboratifs</i>	<i>45</i>
<i>III.7. Publications internationales avec comité de lecture.....</i>	<i>46</i>
ACTIVITES D'ENCADREMENT	47
<i>L'encadrement de personnels temporaires.....</i>	<i>47</i>
<i>La formation.....</i>	<i>47</i>



Activités d'expertise : 48

La vulgarisation scientifique 48

REFERENCES50

CURRICULUM VITAE

Elodie Chaillou-Sagon

née le 4 octobre 1973 (Chartres, 28)
3 enfants (06/2003, 03/2006 et 12/2008)

Equipe Comportement, neurobiologie et adaptation

INRA-UMR Physiologie de la reproduction et des
comportements 37380 NOUZILLY
02.47.42.76.57 elodie.chaillou@tours.inra.fr

Cursus professionnel

Chargée de recherche

Equipe Comportement, Neurobiologie et Adaptation (UMR-PRC, INRA Tours-Nouzilly) sur le thème « Emotions sociales : approches comportementale et neurobiologique » depuis le 1^{er} avril 2004 (CR1 depuis le 1^{er} janvier 2009).

Equipe Contrôle nerveux de l'ingestion (UMR-VP, Rennes St-Gilles) du 1^{er} septembre 2001 au 31 mars 2004. Titularisation en septembre 2002 (CR2).

Attachée scientifique contractuelle

Post-doctorat, équipe Contrôle nerveux de l'ingestion (UMR-VP, Rennes St-Gilles) du 1^{er} mai 2000 au 31 août 2001, en détachement à l'UMR-PRC du 1^{er} mai au 15 septembre 2000.

Doctorat, équipe Neuroendocrinologie sexuelle (UMR-PRC), en détachement du 17 mars 1997 au 1^{er} mai 2000.

Equipe Valeur des aliments (UMR-URH) du 1^{er} novembre 1996 (date de recrutement) au 17 mars 1997.

Stages et main d'œuvre occasionnelle

DEA, laboratoire de génétique animale (INRA-ENSA Rennes) du 1^{er} mars au 31 août 1996.

Laboratoire de génétique animale (INRA-ENSA Rennes) du 15 septembre au 15 octobre 1996, en mars et juillet 1995.

Titres et Diplômes

Ecole nationale supérieure agronomique de Rennes

Doctorat, option biologie et agronomie. « Influence de l'état nutritionnel sur l'expression de neuropeptides hypothalamiques potentiellement impliqués dans l'interaction entre la nutrition et la reproduction de la brebis » soutenue le 2 mai 2000. Mention très honorable avec les félicitations du jury.

DEA biologie et productions animales, option régulation des grandes fonctions de production. « Analyse de la variabilité génétique de l'aptitude à faire du foie gras entre les oies Landaises et les oies Polonaises », janvier 1997. Mention bien.

Diplôme d'ingénieur agronome, spécialisation sciences et techniques de productions animales, option physiologie animale appliquée, décembre 1996.

Diplôme d'agronomie générale, septembre 1995.

Ecole nationale de chimie, physique, biologie, Paris

Classes préparatoires biotechnologiques aux concours communs. Admission en juillet 1993.

Lycée Rotrou, Dreux

Baccalauréat série F7 (biochimie), 1990. Mention bien.

Formations

Analyse et traitement statistiques

Prise en main du logiciel Statistica (2012), Traitement statistique des petits échantillons (2007), Modules d'enseignement en analyses statistiques, initiation à SAS, régression linéaire et corrélation linéaire, comparaison des moyennes et analyse de variance (2005)

Anglais

Rédaction scientifique en anglais (2007), Entretiens individuels (2005, 2008, 2007, 2010), Prise de parole en public, conversations téléphoniques (2000, 2004)

Pratiques de laboratoire et expérimentales

JIRFNI Initiation à la neuroimagerie in vivo du petit animal par RMN (22-26 octobre 2012, GIN, Grenoble)

Microscopie confocale (2012), Conduite de projets scientifiques (2012), Analyse d'images (logiciel Mercator) (2008),

Obtention de l'autorisation à expérimenter sur les animaux (2006), Formation Chirurgie expérimentale (2002) et expérimentation animale (partie 1, 2002 ; partie 2, 2003)
 Stage de radioprotection dans les laboratoires de biologie (1999)

Auditrice libre

DEA « Signaux et images en biologie et médecine », Université Rennes 1 (2001)
 DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris, (1997)

Transfert de connaissances

Encadrement

Post-doctorants (S. Ligout, 2005 ; V. Guesdon nov2007-dec2009)
 M2 recherche « Développement et cognition », Tours (S. Conte, 2006 ; A. Radigois, 2008 ; M. Baratte, 2012)
 M2 recherche « Reproduction », Tours (G. Lanoue, C. Mansanet, 2010)
 M1 « Reproduction », Tours (V. Beaulieu, 2008)
 M1 AgroParisTech (M.-C. Prima, 2012)
 Diplôme d'initiation à la recherche scientifique, Tours (S. Conte, 2005 ; Au. Gautier, 2006)
 Licence professionnelle ESA Angers (A. Canin, 2010)
 L3 « Sciences de la vie », Pierre et Marie Curie, Paris (M. Schmidt, 2011)
 BTS « Productions animales », Lycée St-Lô-Thère (M. Duhamel, 2005-2006 ; S. Moulin, 2008-2009)
 DUT génie biologique, La Rochelle (C. Martinet, 2007)
 Stages de découverte (C. Lelong, 2008 ; L. Blanchard et T. Pinheiro, 2009 ; T. Choppin De Janvry, 2010)
 CDD technicien de recherche (Ad. Gautier, 2010 ; H. Blanchon, 2011 ; F. Chevré, 2012)

Enseignement

M2 recherche « Cognition, Neurosciences et Psychologie, UE « Comportements sociaux, apprentissages et émotions chez les animaux », Univ. Tours (4h « Modalités d'étude du SNC et identification du réseau neuronal des comportements émotionnels »).
 M2 recherche « Développement et Cognition », Univ. Tours (3h « Neurobiologie des émotions chez les mammifères » 2009, 2010 et 2011)
 Licence de biochimie et de biologie, Univ. Bretagne Sud (16 heures, 2002)

Journées d'accueil

Nouveaux arrivants non scientifiques de l'INRA Paris (2007, 2006, 2005)
 Lycée Jean Monnet (classe de 2^{nde}, 2007, 2008)

Participation à l'organisation de journées d'animation scientifique

Semaine du cerveau : mise en place d'ateliers dans des classes CE2-CM2 (2009, 2008, 2007) ; organisation d'exposition et d'ateliers (scolaires CE1-CM2 et extrascolaires 7-12 ans) et en partenariat avec les bibliothèques de Tours et la participation de doctorants, post-doctorants, scientifiques (bibliothèque centrale, 2010 ; bibliothèque de la Rotonde, 2011 ; Médiathèque F. Mitterrand, 2012).
 Journées des doctorants (2003, organisation de la première édition, 2001)
 Présentation de la plate-forme imagerie et spectroscopie structurale et métabolique (PRISM) au génopole Ouest (GPO), réalisation de 2 plaquettes de présentation (2002)

Présentation de résultats hors congrès

Journée technique « Transgénése souris », Paris (2009)
 GDR éthologie, Seix (2006)
 Journées de restitution des projets financés sur crédits incitatifs PHASE-INRA, Tours (2006, 2010)
 Journées d'animation scientifique du département PHASE-INRA, Tours (2005, 2006, 2007, 2009)
 Journées d'étude : modèles animaux et perturbations émotionnelles, Rouen (2005)
 Présentation au Molecular Neuroendocrinology Group du Rowett research institute, invitée par le Dr Clare Adam, Aberdeen (2000)
 Journées d'information scientifique du département physiologie animale-INRA, Montpellier (1999)

Groupes et sociétés savantes

Animatrice de la transversalité « **Imagerie In Vivo** » (création en 2010)

Commission nationale des enseignants-chercheurs relevant du ministère de l'agriculture, membre suppléant nommé (2006-2009), membre titulaire nommé (2010-2011), assesseur élu (2012-2013)
Société de neuroendocrinologie (depuis 2006), **Réseau AgriBien Etre Animal** (depuis 2004), **Société des neurosciences** (depuis 1997)
Action transversale « Biologie de l'ingestion : afférents vagues » (2001-2004), **Groupe de réflexion « Ingestion » de l'INRA** (1996-2004)

Participations à des congrès scientifiques

Colloque de la société française des neurosciences, Montpellier (2007), Toulouse (2001), Marseille (1999).
Forum of European Neuroscience, Barcelone (2012), Genève (2008), Lisbonne (2004), Paris (2002), Brighton, (2000, déplacement financé par une bourse de la Fondation Dufrenoy), Berlin (1998)
International congress of neuroendocrinology, Rouen (2010)
Colloque de la société de neuroendocrinologie, Tours (2007), Poitiers (2000).
Ethologie, Colloque de la société française pour l'étude du comportement animal, Rennes (2005), Tours (2011, membre du comité local d'organisation).
Autres, Meeting of the European Pineal Society, Tours (1999); Colloque franco-britannique de nutrition, Nancy (1998) ; Colloque INSERM sur le comportement alimentaire : peptides centraux et périphériques, Vaux de Cernay (1997) ; Journées de la recherche sur les palmipèdes à foie gras, Bordeaux (1996).

LISTE DE PUBLICATIONS

Articles (revues avec comité de lecture)

1. **E. Chaillou**, G. Tramu, J. Thibault, Y. Tillet. Presence of galanin in dopaminergic neurons of the sheep infundibular nucleus : a double staining immunohistochemical study. Journal of Chemical Neuroanatomy 15 (1998) 251-259.
2. **E. Chaillou**, G. Tramu, Y. Tillet. Distribution of galanin immunoreactivity in the sheep diencephalon. Journal of Chemical Neuroanatomy 17 (1999) 129-146.
3. **E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu, Y. Tillet. Effect of feeding on Fos protein expression in sheep hypothalamus with special référence to the supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study. European Journal of Neuroscience 12 (2000) 4515-4524.
4. **E. Chaillou**, R. Baumont, Y. Chilliard, Y. Tillet. Several subpopulations of neuropeptide Y-containing neurons exist in the infundibular nucleus of sheep : An immunohistochemical study of animals on different diets. Journal of Comparative Neurology 444 (2002) 129-143.
5. **E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu, Y. Tillet. Long-term undernutrition followed by short-term refeeding effect on the corticotropin-releasing hormone containing neurones in the paraventricular nucleus : An immunohistochemical study in sheep. Journal of Neuroendocrinology 14 (2002) 269-275.
6. **E. Chaillou**, A. Biraben, J. Leclourec, P. Bourget, C.-H. Malbert. Brain structures activated during gastric distension in pigs. Reproduction Nutrition Development 42 (2002) 492.
7. **E. Chaillou**, R. Baumont, D. Fellmann, G. Tramu, Y. Tillet. Sensitivity of galanin- and melanin-concentrating hormone-containing neurones to nutritional status : an immunohistochemical study in the ovariectomized ewe. Journal of Neuroendocrinology 15 (2003) 459-467.
8. **E. Chaillou**, Y. Tillet. Nutrition and hypothalamic neuropeptides in sheep: Histochemical studies. Histology and histopathology 20 (2005) 1209-1225.
9. A. Boissy, C. Arnould, **E. Chaillou**, L. Desire, C. Duvaux-Ponter, L. Greiveldinger, C. Leterrier, S. Richard, S. Roussel, H. Saint-Dizier, M.C. Meunier-Salaün, D. Valance, I. Veissier. Emotions and cognition: a new approach to animal welfare. Animal Welfare (Proceedings of the UFAW/BVA Symposium 'Quality of life: the heart of the matter'. 13-14 September 2006, London) Kirkwood J.K., Roberts E.A., Weddell S., Hubrecht R.C., Wickens S.M. (Eds.) 16 (2007) 37-43.
10. A. Boissy, C. Arnould, **E. Chaillou**, V. Colson, L. Désiré, C. Duvaux-Ponter, L. Greiveldinger, C. Leterrier, S. Richard, S. Roussel, H. Saint-Dizier, M.C. Meunier-Salaün, D. Valance. Emotions et cognition : stratégie pour répondre à la question de la sensibilité des animaux. INRA Productions animales 20 (2007) 17-22.
11. C. Delavaud, F. Bocquier, R. Baumont, **E. Chaillou**, T. Ban-Tokuda, Y. Chilliard. Body fat content and feeding level interact strongly in the short- and medium-term regulation of plasma leptin during underfeeding and re-feeding in adult sheep. British Journal of Nutrition 98 (2007) 106-115.
12. D. Grouselle*, **E. Chaillou***, A. Caraty, M.-T. Bluet-Pajot, P. Zizzari, Y. Tillet, J. Epelbaum. Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma Ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. Journal of neuroendocrinology 20 (2008) 1138-1146. *, contribution égale.
13. M. Meurisse, **E. Chaillou**, F. Levy. Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. Journal of chemical neuroanatomy 37 (2009) 87-97.
14. **E. Chaillou**, Y. Tillet, C.-H. Malbert. Organisation of the catecholaminergic system in the vagal motor nuclei of pig: a retrograde fluorogold tract tracing study combined with immunohistochemistry of catecholaminergic synthesizing enzymes. Journal of chemical neuroanatomy 38 (2009) 257-265.
15. V. Guesdon, S. Ligout, P. Delagrangé, M. Spedding, F. Lévy, A.-L. Laine, B. Malpoux, **E. Chaillou**. Multiple exposures to familiar conspecific withdrawal is a novel robust stress paradigm in ewes. Physiology and Behaviour 105(2012) 203-208.
16. J. Boulay, **E. Chaillou**, A. Bertin, P. Constantin, C. Arnould, C. Leterrier, L. Calandreau. A higher inherent trait for fearfulness is associated with increased anxiety-like behaviours and diazepam sensitivity in Japanese quail. Behavioural Brain Research 237(2013) 124-128.
17. V. Guesdon, B. Malpoux, P. Delagrangé, M. Spedding, F. Cornilleau, D. Chesneau, J. Haller, E. Chaillou. Rapid effects of melatonin on hormonal and behavioral stressful responses in ewes. Psychoneuroendocrinology (PNEC-D-12-00540, accepté le 15/12/2012).

Chapitre d'ouvrage

18. **E. Chaillou**, Y. Tillet, F. Andersson. MRI techniques and new animal models for imaging the brain. In: When things go wrong – Diseases and disorders of the human brain. T. Mantamadiotis, Ed. In Tech. (2012) Chap. 10, 207-231. <http://www.intechopen.com/books/when-things-go-wrong-diseases-and-disorders-of-the-human-brain/mri-techniques-and-new-animal-models-for-scanning-the-brain>

Publications soumises ou en préparation

- A. Destrez, V. Deiss, F. Levy, L. Calandreau, C. Lee, E. Chaillou, A. Boissy. Chronic stress induces a pessimistic-like judgment and learning deficits in sheep. *Animal cognition*.
E. Chaillou, M. Meurisse, V. Guesdon, D. Chesneau, S. Picard, F. Lévy. Staying alone and being stressed.

Communications dans des congrès et colloques

19. **E. Chaillou**, S. Lagarrigue*, G. Guy, R. Rouvier, M. Douaire. Comparison of liver lipogenic mRNA levels between two breeds of geese with different abilities to hepatic steatosis. XIth European symposium of waterfowl: 312-318. Nantes, France, 8-10 Septembre 1997. (*communication orale, *orateur*)
20. **E. Chaillou**, G. Tramu, Y. Tillet. Distribution of galanin immunoreactive neurons in the sheep diencephalon. FENS, European Journal of Neuroscience Vol.10, sup.10 p231 :92.22 Berlin 1998. (*poster*)
21. **E. Chaillou**, G. Tramu, J. Thibault, Y. Tillet. Co-localization of galanin in dopaminergic neurons of the sheep infundibular nucleus. FENS. European Journal of Neuroscience Vol.10, sup.10 p286 :113.10, Berlin 1998. (*poster*)
22. **E. Chaillou**, R. Baumont, Y. Tillet. Structures neuronales influencées par le comportement alimentaire. Etude immunohistochimique de la protéine c-fos chez les ovins. Colloque de la société des neurosciences abstract n°D17, p128. Marseille 25-28 mai 1999. (*poster*)
23. **E. Chaillou**, R. Baumont, Y. Tillet. Undernutrition and over-feeding effects on the neuropeptide Y (NPY) immunoreactivity in the infundibular nucleus of ewes. European Journal of Neuroscience Vol.12, sup.11 p157 :071.02 Brighton 2000. Bourse Dufrenoy. (*poster*)
24. Y. Tillet, **E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu. Undernutrition and over-feeding effects on the galanin (GAL) immunoreactivity in the preoptic area and infundibular nucleus of ewes. European Journal of Neuroscience Vol.12, sup.11 p159 :071.12 Brighton 2000. Bourse Dufrenoy. (*poster*)
25. **E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu, Y. Tillet. Influence du niveau nutritionnel sur les neurones à corticolibérine (CRF) du noyau paraventriculaire (NPV). Etude immunohistochimique chez la brebis. XXIX^e Colloque de la société de neuroendocrinologie poster XIX, p20. Poitiers 12-14 Septembre 2000. (*poster*)
26. **E. Chaillou**, A. Biraben, J. Lecloirec, C.-H. Malbert. Identification bi-modalité des structures neuronales activées au cours de la distension de l'estomac chez le porc: tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et électroencéphalographie profonde. Colloque de la société des neurosciences abstract n°L12, p230. Toulouse 28-31 mai 2001 (*poster*)
27. **E. Chaillou**, A. Biraben, J. Lecloirec, P. Bourguet, C.-H. Malbert*. Brain structures activated during gastric distention in pigs. Proceedings of the 4th French-Polish symposium animal and human growth and development: regulatory mechanisms (communication orale, *orateur) Paris, 25-26 Septembre 2001, published in *Reproduction Nutrition Development* (2002) 42, p492
28. **E. Chaillou**, R. Baumont, D. Fellmann, G. Tramu, Y. Tillet. Neuropeptides and nutrition in the sheep hypothalamus: a short review. 3rd FENS abstract 025.3. Paris 13-17 juillet 2002.
29. **E. Chaillou**, Y. Tillet, C.-H. Malbert. Organization of the motor connections tracing from the cervical vagus nerve in pig. 4th FENS abstract A094.1. Lisbonne 10-14 juillet 2004.
30. S. Conte*, A. Boissy, G. Toporenko, G. Venier, **E. Chaillou**. Effets comparés du retrait d'un congénère ou d'un objet familier sur la réactivité émotionnelle des agneaux. Colloque de la société française pour l'étude du comportement animal. Rennes, 2-4 mai 2005. (*poster*)
31. **E. Chaillou**, S. Richard*, G. Ferreira, D. Hazard, N. Jouaneau, G. Venier, N. Wacrenier. Validation de modèles expérimentaux de réactivité émotionnelle chez la caille et l'ovin. Journée d'étude modèles animaux et perturbations émotionnelles. Rouen, 13 mai 2005. (*poster, *présentateur*)
32. Y. Tillet, S. Tourlet, G. Ziyazetdinova, **E. Chaillou**, P.Y. Sizaret, A. Caraty. Galanin: a link between oestradiol and hypothalamic gonadotrophin releasing hormone containing neurones? A

neuroanatomical study in sheep. 23rd Conference of European Comparative Endocrinologists Abstract O32, p.40. Manchester 29 août-2 septembre 2006.

33. **E. Chaillou**, Y. Tillet, C.H. Malbert. Distribution of tyrosine hydroxylase-containing neurons in the pig brainstem. 8e colloque de la société française des neurosciences. Abstract B8., p.80. Montpellier, 22-25 mai 2007 (poster)
34. **E. Chaillou**, M.Meurisse, P. Ciofi, F. Lévy. Conséquences de l'isolement social sur l'axe corticotrope chez la brebis adulte. 34^e colloque de la société de neuroendocrinologie. Abstract P2, Tours, 25-27 septembre 2007 (poster). <http://wcentre.tours.inra.fr/societeneuroendocrino/>
35. **E. Chaillou**, V. Guesdon*, S. Ligout, P. Delagrangé, B. Malpoux. Does the implantation of a brain cannula alter the response to stress in sheep? 6th FENS abstract, vol4, 025.9, Genève 12-16 juillet 2008 (poster, * présentateur).
36. V. Guesdon, B. Malpoux, P. Delagrangé, M. Spedding, F. Cornilleau, C. Moussu, N. Jouaneau, **E. Chaillou**. Is melatonin able to modify Fos-neuronal activation induced by the withdrawal of familiar conspecifics ? The 7th international congress of neuroendocrinology abstract P1-87, Rouen 11-15 juillet 2010.
37. C. Mansanet, **E. Chaillou**, S. Freret, L. Guilloteau*, M.-C. Maurel, M. Olivier, C. Arnould, R. Nowak, M. Pellicer Rubio. Impact des traitements photopériodiques sur le bien-être animal et sur la réponse immunitaire chez les ovins. 8^{ème} journées du réseau francophone d'immunologie des animaux domestiques (IAD) abstract 48, Fréjus, 22-25 mai 2011 (poster, *présentateur).
38. X. Boivin, V. Guesdon, C. Tallet, F. Lévy, **E. Chaillou**, M. Keller, F. Cornilleau, E. Archer, P.-G. Marnet, A. Boissy, R. Nowak. Perception positive du soigneur par l'animal : Approche comportementale et physiologique comparée entre l'agneau et le porcelet. Proceedings du Colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal (SFECA) "L'animal dans tous ses sens". 2011. Tours 17-19 mai 2011.
39. L. Calandreau, J. Boulay, **E. Chaillou**, A. Bertin, C. Arnould, C. Leterrier, F. Lévy. Individual trait for emotionality operates as a switch between memory systems. 10^{ème} Colloque de la société des neurosciences françaises. Abstract 640, 24-27 mai 2011.
40. V. Guesdon*, F. Lévy, **E. Chaillou**, M. Keller, M. Meurisse, F. Cornilleau, C. Moussu, E. Archer, N. Jouaneau, X. Boivin, R. Nowak. Relation hétérospécifique soigneur-agneau : la caresse une nécessité pour apaiser un jeune animal stressé ? Communication orale (*, orateur) Proceedings du Colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal (SFECA) "L'animal dans tous ses sens". 2011. Tours 17-19 mai 2011.
41. **E. Chaillou***, C. Arnould, A. Favreau-Peigné, A. Bertin, P. Constantin, S. Lumineau, C. Houdelier, A. Laurence, A. Boissy, C. Leterrier, L. Calandreau. Impact of individual trait for emotionality on behavioural, physiological and neurobiological consequences of chronic stress in birds. 7th FENS abstract F77 136.15, Barcelone, Spain, 14-18 juillet 2012 (poster, * présentateur)
42. Y. Tillet, P. Delagrangé, **E. Chaillou***. Neuronal connectivities of the sheep periaqueductal grey matter. 7th FENS abstract F87 92.17, Barcelone, Spain, 14-18 juillet 2012 (poster, * présentateur)
43. V. Guesdon, S. Ligout, B. Malpoux, P. Delagrangé, M. Spedding, D. Chesneau, E. Chaillou*. When social isolation is less stressful during night than during day-time, is melatonin (MLT) involved? Frontiers in Stress and Cognition" Meeting: from molecules to behavior, Ascona, Suisse, 23-26 septembre 2012 (poster, * présentateur)

Rapports diplômants

- E. Chaillou** Influence de l'état nutritionnel sur l'expression de neuropeptides hypothalamiques potentiellement impliqués dans l'interaction entre le nutrition et la reproduction de la brebis. Etude immunohistochimique. **Thèse, vol. 1,2 ENSAR 2000, 283p.**
- S. Conte** Réactivité émotionnelle chez la brebis (*Ovis aries*) : influence de l'âge de séparation d'avec la mère et de la race. **M2, Université de Tours 2006, 40p.**
- M. Duhamel** Un agneau peut-il créer un lien d'attachement avec un objet inanimé ? **BTS lycée St Thère 2006, 24p.**
- C. Martinet** Caractérisation neurochimique des différents noyaux amygdaliens chez l'ovin. **IUT La Rochelle 2007, 30p.**
- A. Radigois** La réactivité émotionnelle chez la brebis Ile-de-France (*ovis aries*) : un outil pour prédire la

motivation sociale. **M2, Université de Tours 2008, 46p.**

G. Lanoue Evaluation de la persistance de l'effet de la mélatonine sur les réponses de stress. **M2 Université de Tours 2010, 17p.**

C. Mansanet Impact des traitements photopériodiques sur le bien-être animal et la réponse immunitaire chez les ovins. **M2, Université de Tours 2010, 30p.**

A. Canin Les traitements photopériodiques en élevage comme méthodes alternatives pour le contrôle de la reproduction : effet sur le bien-être des brebis (*Ovis aries*). **Licence professionnelle ESA Angers 2010, 51p.**

M. Baratte Conséquences neurobiologiques du stress chez l'oiseau. **M2, Université de Tours 2012, 35p.**

Produits, documents et publications destinés à des utilisateurs de la recherche (professionnels, partenaires institutionnels...)

E. Chaillou, P.-A. Eliat. Réalisation de deux plaquettes de présentation de la plate-forme « Imagerie et Spectroscopie », l'une destinée aux membres du génopole ouest et l'autre destinée aux utilisateurs de la plate-forme. (2002)

E. Chaillou Evaluation de la réactivité émotionnelle chez la brebis. GDR éthologie, Seix, 16-17 novembre 2006. (*communication orale*)

Produits destinés à un public large ; documents à vocation pédagogique

Semaine du cerveau :

E. Chaillou, Y. Tillet, L. Taconnat. Ateliers d'animation, médiathèque Tours nord mars-avril 2012

E. Chaillou, Y. Tillet. Ateliers d'animation (microscope, puzzles, olfaction, graphisme, modelage...) : bibliothèque de la Rotonde mars-avril 2011, bibliothèque centrale mars-avril 2010.

E. Chaillou. Animation dans l'école primaire de Marray (classes de CE et classe de CM), 19 et 20 mars 2009 (livret CE, 7p ; livret CM, 5p).

E. Chaillou. Animation dans l'école primaire de Marray (classes de CE et classe de CM), 11 et 13 mars 2008 (livret CE, 6p ; livret CM, 8p). Animation dans une classe de terminale S. 10 mars 2008.

E. Chaillou. Animation dans une classe de CM1-CM2, Chemillé-sur-Dême, 19 mars 2007 (12p).

AVANT-PROPOS

J'ai été recrutée, par voie de concours, le 1^{er} novembre 1996 comme attachée scientifique contractuelle (ASC) dans l'ex-station de recherche sur la nutrition des herbivores (SRNH). Les ASC bénéficient d'un statut de chercheur contractuel sous contrat de trois ans, renouvelable une fois (3 ans), à condition d'avoir soutenu leur thèse avec succès à l'issue des trois premières années. Par ailleurs, l'ASC réalise une partie de son contrat dans un laboratoire différent de celui de recrutement, l'objectif étant d'acquérir de nouvelles compétences qui seront importées dans ce dernier. Ainsi, la création d'un profil de chercheur contractuel à la SRNH répondait à la volonté d'enrichir l'étude du comportement alimentaire des ovins au pâturage par la compréhension des mécanismes neurobiologiques impliqués dans sa régulation. La neurobiologie, étant une discipline absente des champs investigués par l'équipe de recrutement, j'ai été détachée (mars 1997) dans le laboratoire du contrôle neuroendocrinien de la reproduction (ex-unité de la physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, PRMD). J'ai ainsi réalisé ma thèse sous la direction d'Yves Tillet et la co-direction de René Baumont (SNRH). Au cours de ces trois années de thèse, j'ai étudié les populations neuropeptidergiques potentiellement impliquées dans la régulation de la reproduction par l'état nutritionnel.

En fin de thèse, les politiques scientifiques des départements de recherche ayant évolué, j'ai dû faire le choix entre deux mobilités : retourner dans le laboratoire de recrutement (SRNH) pour étudier les phénomènes d'apprentissage expliquant les comportements de choix alimentaires des ovins au pâturage ou être mutée à l'ex-unité mixte de recherche sur le veau et le porc (UMRVP, Rennes) pour étudier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans la régulation post-ingestive vagale chez le porc. Compte tenu de mes compétences, de mon intérêt pour la thématique développée sur le modèle porcin et séduite par les opportunités technologiques innovantes, j'ai privilégié la deuxième option et réalisé un séjour post-doctoral dans le laboratoire « contrôle de l'ingestion » dirigé C.H. Malbert (septembre 2000). J'y ai été recrutée en septembre 2001. Durant cette période, j'ai abordé l'électrophysiologie et l'imagerie *in vivo* afin d'identifier les structures neuronales différenciellement activées par la distension gastrique isobare ou isovolumique. J'ai installé et mis en œuvre un laboratoire dédié à l'immunohistochimie afin de disposer des outils permettant des études neurohistochimiques. Après quelques mois dans cette équipe, j'ai pris conscience que je ne pourrais pas m'y épanouir scientifiquement, professionnellement et personnellement. Les démarches entreprises pour quitter ce laboratoire se sont conclues par l'opportunité de rejoindre l'ex-équipe « Comportement » de l'unité mixte de recherche sur la reproduction et les comportements (UMR-PRC ex PRMD) en avril 2004. Cette mobilité avait pour objectif de renforcer l'étude des émotions dans l'équipe, par l'abord des mécanismes neurobiologiques chez le modèle ovin.

Comme l'illustre ce bref descriptif de mon parcours, mes thèmes de recherche n'ont de commun que l'identification et la compréhension des mécanismes neurobiologiques. Pour cette raison, mon mémoire d'habilitation à diriger les recherches sera focalisé sur les mécanismes neurobiologiques et les stratégies expérimentales mises en œuvre pour les étudier. Au cours de ces seize premières années de carrière, je me suis intéressée aux mécanismes neurobiologiques impliqués dans l'interaction entre la nutrition et la reproduction, dans le contrôle de l'ingestion et la régulation des réponses de stress. Ce mémoire sera organisé en fonction de mes différentes expériences professionnelles, à l'image d'un rapport d'activités et présentera un résumé des travaux réalisés, de mon projet de recherche et je terminerai par la présentation de mes activités d'encadrement.

ACTIVITES DE RECHERCHE

La compréhension et l'étude des mécanismes neurobiologiques régulant la vie d'un individu reposent sur des concepts expérimentaux complémentaires qui peuvent être décrits selon trois catégories (Berridge et al., 2003) :

- (i) la mise en évidence de corrélats neurobiologiques ou de marqueurs neuronaux activés par un phénomène biologique ou comportemental,
- (ii) la mise en évidence d'une cause neurobiologique suffisante (stimulation) pour induire ou accentuer un phénomène biologique ou comportemental,
- (iii) la mise en évidence d'une cause neurobiologique nécessaire (lésion) pour supprimer ou amoindrir un phénomène biologique ou comportemental.

Dans les deux derniers cas, il est nécessaire de cibler une structure neuronale particulière afin de la stimuler ou de la léser. A l'inverse, dans la recherche de corrélats neurobiologiques, l'ensemble de l'encéphale peut être étudié au travers de modifications d'un système neurochimique (catécholaminergique par exemple), d'un réseau neuronal (le système moteur du nerf vague par exemple) ou d'activation (protéine Fos par exemple).

Dans tous les cas, il est indispensable de développer un modèle biologique ou comportemental standardisé. Celui-ci est caractérisé, selon la fonction étudiée, par des variables endocriniennes, neurovégétatives et/ou comportementales. Toutes ces variables sont autant de paramètres qui seront corrélés aux données neurobiologiques, comme l'activation neuronale, ou modifiés par la stimulation ou la lésion d'une structure ou d'un système neuronal particulier.

I. Neuropeptides hypothalamiques et interaction entre nutrition et reproduction

Chez les mammifères, l'influence de la nutrition sur la reproduction a largement été démontrée (Frisch, 1987 ; Brown, 1994 ; Crown et al., 2007). Chez les animaux domestiques, la balance énergétique est négative lorsque les besoins nutritionnels sont fortement accrus et lorsque la disponibilité alimentaire est insuffisante. Chez les ruminants, la sous-nutrition peut entraîner un retard de puberté chez des animaux en croissance, une augmentation de la durée de l'anœstrus chez la femelle en lactation, des perturbations hormonales du cycle sexuel chez les animaux adultes (l'Anson et al., 1991 ; Adam et Robinson, 1994). A l'inverse, un apport alimentaire très énergétique peut rétablir la cyclicité.

Les troubles hormonaux, relatifs à la fonction de reproduction, concernent principalement l'hormone lutéinisante (LH) dont le principal facteur de régulation est la luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) synthétisée dans le système nerveux central. Des troubles de sécrétion de la LH, observés chez les animaux sous-nutris, sont le reflet d'un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. Une meilleure gestion des troubles de la reproduction liés à des déséquilibres nutritionnels, nécessite de connaître les facteurs modulant la régulation de la production et/ou de la sécrétion de la LHRH. De nombreux neuropeptides (cholecystokinine, corticolibérine, opiacés, galanine, neuropeptide Y...) sont connus pour être sensibles à l'état nutritionnel et jouer un rôle dans la régulation de la reproduction chez différentes espèces.

Chez le mouton, les effets inhibiteurs de la sous-nutrition sur la sécrétion de la LH (Thomas et al., 1990) peuvent être associés à une augmentation du niveau de neuropeptide Y (NPY) dans l'hypothalamus médiobasal (McShane et al., 1993 ; Adam et al., 1997). Ce neuropeptide participe à la régulation de la sécrétion de la LH (Porter et al., 1993) et de la prise alimentaire (Miner et al., 1990). La galanine est sensible à la sous-nutrition chez la brebis adulte (Barker-Gibb and Clarke, 1996), mais ses actions sur la sécrétion de la LH ou sur la prise alimentaire n'étaient pas connues chez cette espèce. La cholecystokinine (CCK) et la corticolibérine (CRF) sont connues chez les ovins pour inhiber la prise alimentaire (Della-Fera and Baile, 1979 ; Bueno and Riviere, 1987). La cartographie de la distribution de ces neuropeptides était partiellement

connue (NPY, Antonopoulos et al., 1989, CCK, Antonopoulos et al., 1987) ou totalement méconnue (galanine). Or ces connaissances sont indispensables pour étudier la sensibilité de ces populations à l'état nutritionnel.

Par ailleurs, l'action satiétogène/anorexigène (CCK) ou orexigène (NPY) de ces neuropeptides a été démontrée chez l'ovine. Le rôle spécifique de certaines structures hypothalamiques a été démontré notamment l'action anorexigène de la CCK après injection dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus. Il est donc primordial de dissocier les effets nutritionnels liés à la prise alimentaire, phénomène à court terme, et les effets à long terme liés à des déséquilibres nutritionnels. Dans ce projet, nous avons donc recherché les structures hypothalamiques différentiellement activées par la prise alimentaire et le jeûne, pour ne pas confondre les effets liés à la sous-nutrition et ceux liés à la prise alimentaire.

La stratégie retenue a été celle des corrélats neurobiologiques et des marqueurs neuronaux, déclinée en trois étapes :

Identifier les structures du diencephale contenant des neurones et des fibres immunoréactifs pour la galanine, le NPY et la CCK.

Identifier les structures hypothalamiques sensibles à la prise alimentaire (vs un jeûne de 24h) par l'étude immunohistochimique de l'expression de la protéine Fos.

Etudier, par immunohistochimie, l'influence de la prise alimentaire (vs un jeûne de 24h) et celle de la sous-nutrition suivie d'une réalimentation, sur la distribution et/ou le nombre de neurones contenant de la galanine, du NPY et du CRF. Dans cette étude, les résultats obtenus ont été mis en regard de l'évolution de la sécrétion de la LH.

1.2. Identification des structures neuronales contenant de la galanine, du NPY ou de la CCK

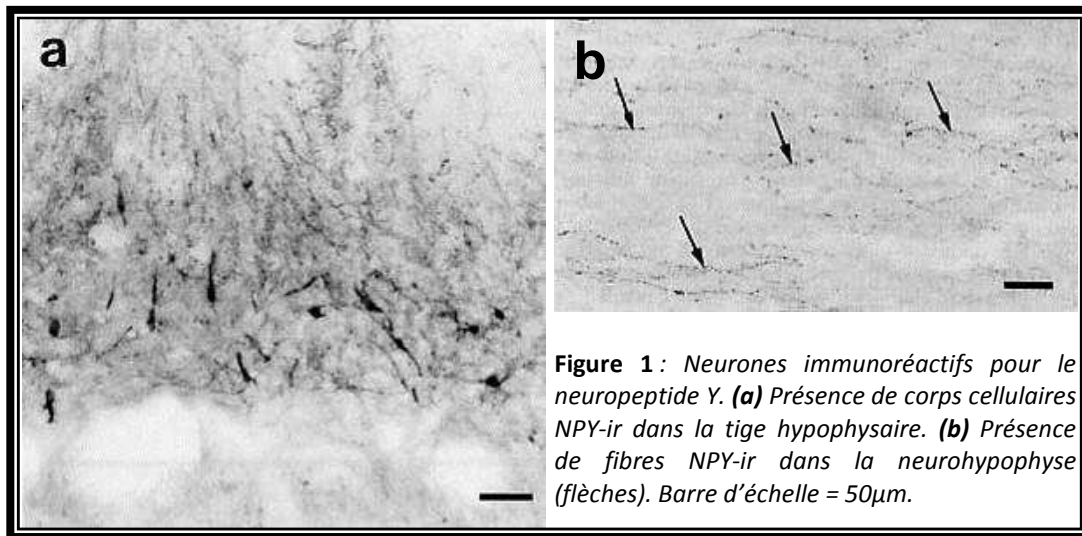
Le travail de description neuroanatomique a été réalisé sur quatre brebis adultes de race Ile de France. Deux brebis ont reçu une injection intracérébroventriculaire de colchicine, 48h avant leur euthanasie, afin de visualiser tous les corps cellulaires qui ont le potentiel d'exprimer le neuropeptide d'intérêt. La colchicine bloque le transport axonal et permet la concentration du contenu peptidergique dans le corps cellulaire du neurone. La description des fibres immunoréactives pour les neuropeptides d'intérêt a été réalisée sur deux autres brebis ovariectomisées sans traitement avec de la colchicine.

Les immunomarquages de la galanine, du NPY et de la CCK ont été réalisés par un système de révélation enzymatique à la peroxydase. Un double marquage galanine-tyrosine hydroxylase (TH) a été réalisé par immunofluorescence afin de caractériser les sous-populations de neurones galanine-immunoréactifs (-ir) identifiés dans le noyau infundibulaire. La TH est la première enzyme de synthèse des catécholamines et est colocalisée avec la galanine dans différentes sous-populations du noyau infundibulaire chez plusieurs espèces.

Neuropeptide Y (Chaillou et al., J. Comp. Neurol. 2002)

Nous avons observé des neurones NPY-ir dans de nombreuses structures (aire préoptique médiane, aire hypothalamique antérieure, noyau infundibulaire, noyau dorsocaudal), résultats cohérents avec ceux d'Antonopoulos et al. (1989). Chez la brebis, comme dans la plupart des espèces, les plus fortes densités de neurones NPY-ir sont observées dans le noyau infundibulaire et l'éminence médiane. Dans le noyau infundibulaire, nous avons mis en évidence une sous-population ventrale et une sous-population latérale de neurones NPY-ir qui n'avaient jamais été décrites chez d'autres espèces. De nombreux neurones NPY-ir sont présents dans l'aire préoptique médiane et l'aire hypothalamique antérieure, dans les noyaux dorsomédian et dorsocaudal. Comme chez les primates, et contrairement aux rongeurs, une forte densité de neurones NPY-ir est localisée dans l'éminence médiane et dans la tige hypophysaire (Figure 1a). Nos résultats mettent en évidence une particularité du modèle ovin puisque nous observons des fibres NPY-ir

dans la neurohypophyse (Figure 1b) alors que les noyaux supraoptique et paraventriculaire sont totalement dépourvus de neurones NPY-ir, chez les brebis ovariectomisées ou traitées avec de la colchicine.



Cholecystokinine (Chaillou et Tillet, *Histol. Histopathol.* 2005)

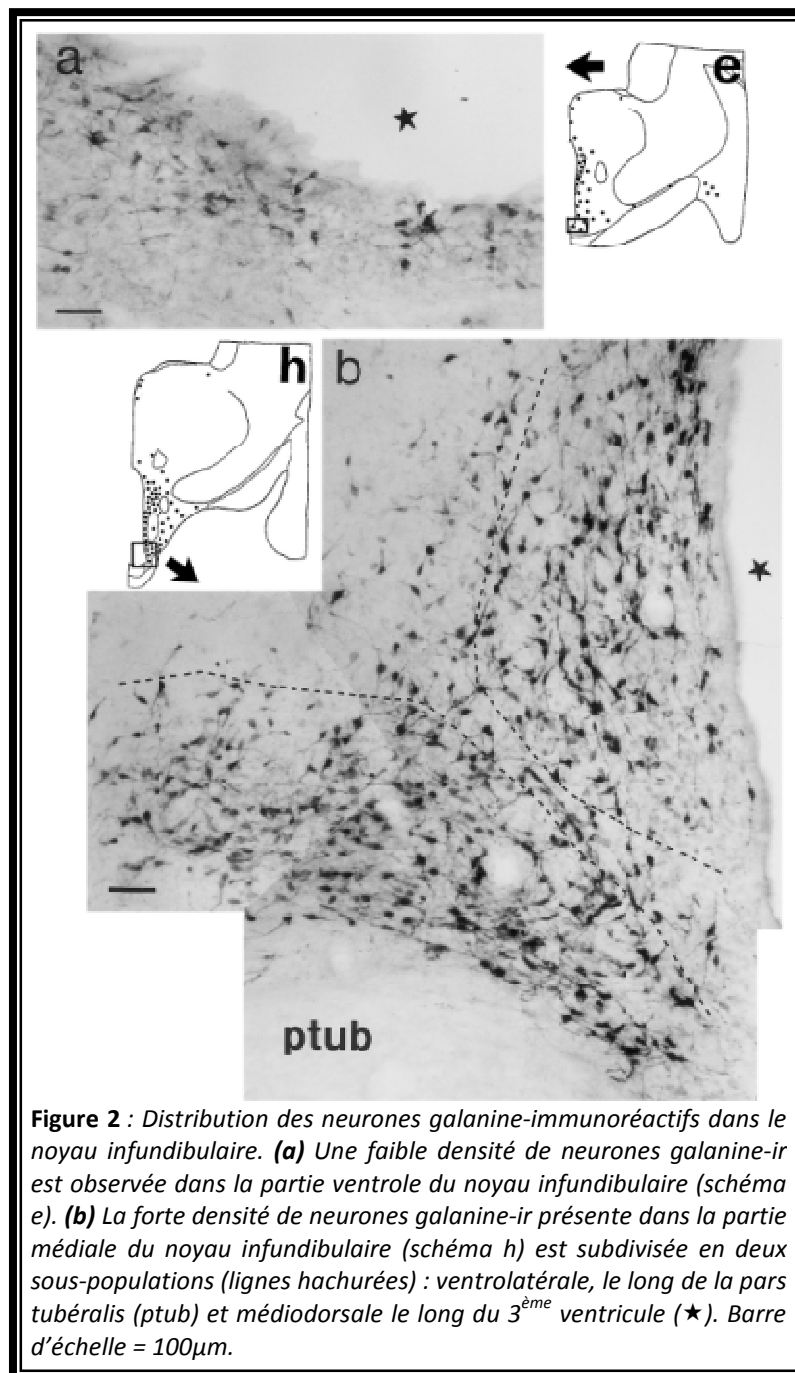
Très peu de neurones CCK-ir ont été observés chez les brebis ovariectomisées, sans traitement avec de la colchicine, le nombre de cellules marquées étant plus important chez les brebis traitées avec de la colchicine. Nous avons observé des neurones CCK-ir dans l'aire hypothalamique antérieure, au-dessus du noyau supraoptique et dans le noyau dorsomédian. Les plus fortes densités sont observées dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus pour les fibres CCK-ir, dans les noyaux dorsomédian et dorsocaudal pour les corps cellulaires. Cette distribution est cohérente avec celle précédemment publiée par Antonopoulos et al. (1987). Contrairement au cobaye, au rat et au singe, les noyaux paraventriculaire et supraoptique des brebis ovariectomisées non traitées avec de la colchicine, ou traitées avec de la colchicine sont dépourvus de neurones CCK-ir. Toutefois, le système magnocellulaire de la brebis contient des neurones CCK-ir dans le noyau supraoptique accessoire.

Galanine (Chaillou et al., *J. Chem. Neuroanat.* 1998, 1999)

Les plus fortes densités de neurones galanine-ir ont été observées dans le noyau infundibulaire et l'éminence médiane chez les brebis ovariectomisées et chez les brebis traitées avec de la colchicine. Dans le noyau infundibulaire, nous avons mis en évidence trois sous-populations de neurones galanine-ir : ventromédiane, ventrolatérale et médiobasale (Figure 2). Cette distinction a été confirmée dans notre étude de colocalisation de la TH avec la galanine, ces deux protéines étant colocalisées uniquement dans la partie caudale du noyau infundibulaire. Chez les brebis traitées avec de la colchicine, une forte densité de neurones galanine-ir est située dans l'aire préoptique et dans les noyaux dorsomédian et dorsocaudal. Le système galaninergique semble être bien conservé entre les espèces puisque la distribution de la galanine dans le diencephale de brebis est proche de celle décrite dans les autres espèces (rat, singe, porc). Cette similitude de distribution suggère une identité fonctionnelle. Ainsi la présence d'une forte densité de neurones galanine-ir dans le noyau infundibulaire ou dans l'aire préoptique pourrait être le reflet de l'implication de la galanine dans la régulation de la LH via la LHRH ou dans celle de la prise alimentaire.

Les résultats neuroanatomiques ont mis en évidence de nombreuses particularités des systèmes neuronaux de la brebis, qui ont déterminé mes choix pour la suite du travail. Nous avons restreint l'étude des effets de la prise alimentaire et de la sous-nutrition aux structures hypothalamiques contenant

d'importantes densités de neurones à la fois chez les brebis ovariectomisées et chez les brebis traitées avec de la colchicine : l'aire préoptique, le noyau infundibulaire et la partie dorsomédiane de l'hypothalamus pour la galanine ; le noyau infundibulaire et les parties antérieure et dorsocaudale de l'hypothalamus pour le NPY.



I.3. Structures activées par l'absence de prise alimentaire et corrélats neuropeptidergiques

Afin de limiter la variabilité interindividuelle et l'influence de facteurs physiologiques pouvant moduler la régulation de la nutrition et/ou de la reproduction, nous avons choisi un modèle de brebis adulte multipare, tarie et ovariectomisée, de race INRA 401.

Chez les ruminants, le comportement alimentaire dépend de la nature et de la distribution de l'aliment. Généralement, chaque distribution de fourrage est suivie d'un grand repas (quantité ingérée et durée d'ingestion) auquel succède une série de repas de plus en plus petits et de plus en plus espacés avec lesquels s'intercalent des phases de rumination. Dans de telles conditions, il est difficile de définir le

meilleur moment pour que tous les animaux nourris présentent le même statut alimentaire (état de faim ou de satiété). Une stratégie consiste à limiter progressivement la durée d'accès à l'aliment, en augmentant les quantités disponibles jusqu'à ce que l'animal ingère la quantité de fourrage nécessaire à la couverture des besoins nutritionnels en un temps limité.

Dans notre étude, les brebis ont été placées en cage individuelle, équipée de capteurs pour le suivi du poids de l'auge. Elles ont été nourries *ad libitum* avec deux distributions d'aliment par jour (8h et 14h). Les quantités de fourrage nécessaires à la couverture des besoins nutritionnels d'entretien ont été évaluées. Après 15 jours d'habitation, les animaux sont parvenus à ingérer, en 6h, les mêmes quantités d'aliment qu'ils ingéraient en accès libre à l'auge et ont présenté des comportements alimentaires similaires quel que soit leur groupe (Tableau 1).

	Groupe « Brebis nourries »	Groupe « Brebis à jeun »
Nombre de repas	5,33 ± 0,5	5,23 ± 0,4
Vitesse initiale d'ingestion	9,69 ± 0,9	8,96 ± 0,7
Quantité ingérée (g de MS)	1192 ± 61	1063 ± 72
Durée totale d'ingestion	3h34min ± 17min	3h33min ± 12min
Quantité ingérée au cours du 1 ^{er} repas (g de MS)	587 ± 54	560 ± 84
Durée du 1 ^{er} repas	1h39min ± 23min	1h41min ± 15min

Tableau 1 : Moyennes (\pm erreur standard) des paramètres caractérisant le comportement alimentaire des brebis nourries et des brebis à jeun, mesurés pendant 5 jours consécutifs avec un accès à l'auge limité à 6h par jour (MS, matières sèches).

Le jour de l'expérience, les brebis « à jeun » ont eu accès à une auge vide et les brebis nourries ont eu accès à l'aliment, pendant 6h, période à l'issue de laquelle toutes les brebis ont été euthanasiées. Toutes les brebis nourries ont terminé leur dernier repas, au plus, 30min avant l'euthanasie et les brebis à jeun ont eu leur dernier repas au moins 24h avant l'euthanasie.

Parallèlement à la caractérisation du comportement alimentaire (vitesse d'ingestion, nombre et durée des repas, quantité ingérée) des brebis, leur statut nutritionnel a été caractérisé par des paramètres plasmatiques (glucose, urée, β -hydroxybutyrate, acides gras non estérifiés, insuline, leptine) et leur statut reproductif par la pulsativité de la sécrétion de LH.

Les nombres de neurones immunoréactifs pour la protéine Fos, marqueur d'activité cellulaire (Krukoff, 1998), pour les neuropeptides d'intérêt (CRF, NPY, galanine) ont été déterminés à l'aide d'un système d'analyse d'images couplé à un microscope à lumière transmise (BIOCOM[®]).

Caractérisations des statuts nutritionnel et reproductif des animaux

L'ensemble des paramètres plasmatiques mesurés avant l'accès à l'auge sont identiques entre les deux groupes. Les concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés et en urée sont moins élevées chez les brebis nourries que chez les brebis à jeun. A l'inverse, les concentrations plasmatiques en β -hydroxybutyrate et en insuline sont plus élevées chez les brebis nourries que chez les brebis à jeun (Tableau 2).

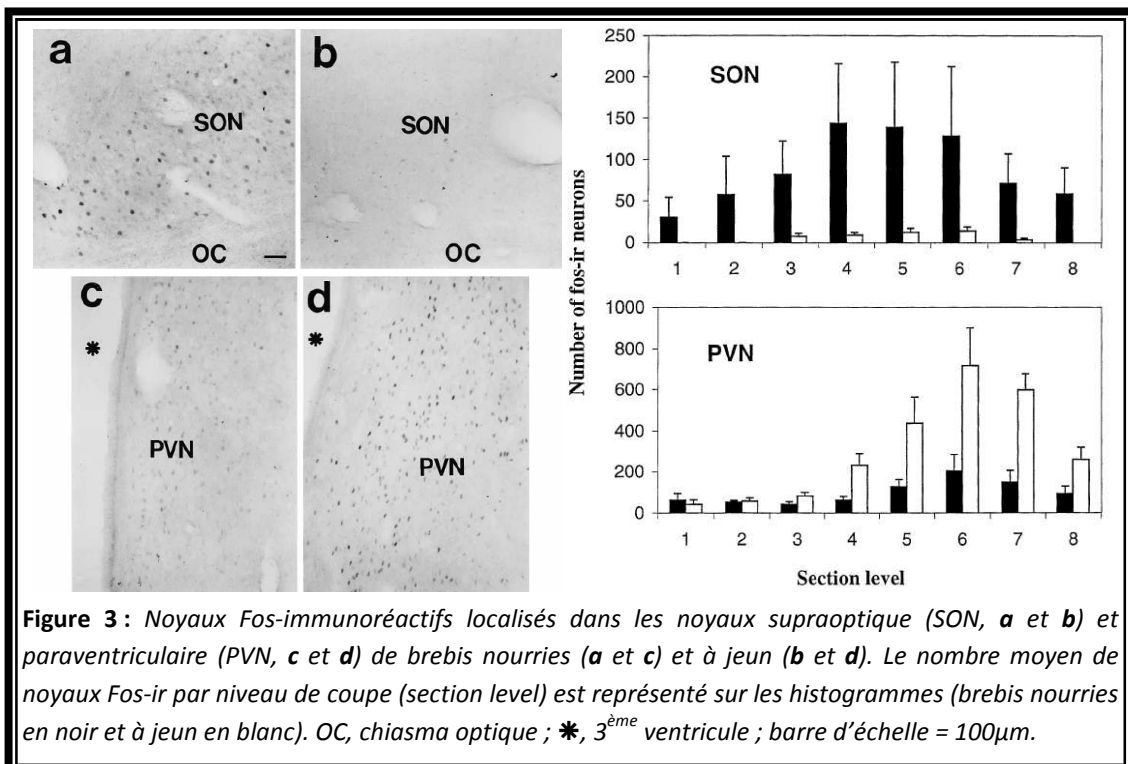
Quel que soit le groupe, les brebis présentent des niveaux moyens de LH (3-4ng/ml/2h) et un nombre de pulses (2-3 pulses/2h) similaires. Nous n'avons pas observé d'effet à court terme de la prise alimentaire ou d'un jeûne de 24h sur ces paramètres.

	Brebis nourries	Brebis à jeun
AGNE (mmol/L)	0,12 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,04 ^b
β-OH (mmol/L)	0,35 ± 0,03 ^a	0,22 ± 0,01 ^b
Urée (g/L)	0,45 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,02 ^b
Glucose (g/L)	0,65 ± 0,01	0,60 ± 0,02
Insuline (μUI/L)	17,58 ± 2,8 ^a	10,41 ± 0,8 ^b
Leptine (ng/mL)	5,83 ± 0,83	5,99 ± 1,41

Tableau 2 : Moyennes (\pm erreur standard) des paramètres sanguins caractérisant le statut nutritionnel des brebis nourries et des brebis à jeun (les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes, les valeurs moyennes mesurées avant l'accès à l'auge ne sont pas présentées dans le tableau ; AGNE, acides gras non estérifiés ; β-OH, β-hydroxybutyrate).

Activation neuronale (Chaillou et al., EJM 2000)

Les neurones Fos-ir n'ont été dénombrés que dans les structures non myélinisées dans lesquelles des populations neuronales ont été clairement identifiées sur les coupes adjacentes colorées au violet de crésyl. De plus, j'ai dénombré les noyaux marqués dont la taille est proche de celle des noyaux des neurones. Une structure est dite activée lorsqu'elle contient un plus grand nombre de neurones Fos-ir dans une situation comparée à une autre. Certaines structures présentent le même nombre de neurones Fos-ir : l'aire préoptique, les aires hypothalamiques antérieure et latérale, et les noyaux supra-chiasmatique et dorsocaudal. Seul le noyau supraoptique est activé chez les brebis nourries. La partie caudale du septum ventrolatéral, les noyaux paraventriculaire, infundibulaire, ventromédian, ventrolatéral et dorsomédian sont activés chez les brebis à jeun. L'originalité de nos résultats concerne les noyaux supraoptique et paraventriculaire. Ces deux structures sont souvent impliquées dans les mêmes régulations et présentent des sensibilités comparables. Dans notre étude, nous ne retrouvons pas cette similitude puisque le noyau supraoptique est activé chez les brebis nourries et le noyau paraventriculaire est activé chez les brebis à jeun (Figure 3).



Afin de comprendre la différence d'activation entre les noyaux paraventriculaire et supraoptique, nous avons entrepris la caractérisation chimique des neurones activés par double-marquages de la protéine Fos avec la neurophysine (contenue dans les neurones magnocellulaires) et avec le CRF (contenu principalement dans les neurones parvocellulaires). Dans le noyau paraventriculaire, les noyaux Fos-ir ne sont jamais colocalisés avec les neurones neurophysine-ir, alors que 99% des neurones CRF-ir présentent un noyau Fos-ir. Ainsi, le système magnocellulaire n'est activé que dans le noyau supraoptique alors que seul le système parvocellulaire est activé dans le noyau paraventriculaire. Par ailleurs, la densité de neurones CRF-Fos-ir est la même dans le noyau paraventriculaire de brebis nourries et dans celui des brebis à jeun, suggérant que l'activation des neurones CRF est indépendante de la prise alimentaire ou du jeûne.

Influence d'un jeûne de 24h sur les populations de neurones contenant du CRF, du NPY et de la galanine

Les neurones CRF-ir ont été dénombrés dans le noyau paraventriculaire, dans le système parvocellulaire. L'absence d'effet de la prise alimentaire (vs un jeûne) sur le nombre de neurones CRF-ir est confirmée, les brebis nourries présentant le même nombre de neurones CRF-ir que les brebis à jeun. Parallèlement, la cortisolémie est la même au cours des 6h d'accès à l'auge quel que soit le groupe de brebis (nourrie ou à jeun).

Les deux sous-populations neuronales NPY-ir du noyau infundibulaire (cf. partie I) ne sont pas identifiables chez les brebis nourries ou à jeun, compte tenu du faible nombre de neurones NPY-ir comptés et de la variabilité entre les animaux d'un même groupe. Le nombre de neurones NPY-ir dans la totalité du noyau infundibulaire n'est pas modifié par la prise alimentaire.

Les neurones galanine-ir ont été dénombrés dans le noyau infundibulaire des brebis nourries et des brebis à jeun, les autres structures ne présentant que de rares neurones immunomarqués. Nous n'avons pas observé d'effet de la prise alimentaire sur le nombre de neurones GAL-ir.

Conclusions

Alors que nous n'avons pas mis en évidence de différence de nombre de neurones immunoréactifs pour les neuropeptides étudiés (galanine, CCK, CRF, NPY), nous avons identifié des différences d'activation neuronale entre les brebis nourries et les brebis à jeun dans plusieurs structures hypothalamiques. Malgré le caractère polygastrique de l'animal, l'ensemble des structures que nous avons identifiées est similaire à celui impliqué dans la régulation de la prise alimentaire d'espèces monogastriques. Par exemple, nous montrons l'implication du noyau dorsomédian dans la régulation de la prise alimentaire du mouton, résultat connu chez les rongeurs (Bernadis and Bellinger, 1987). Ce constat suggère un continuum des régulations du comportement alimentaire par un réseau neuronal commun aux différentes espèces animales, activé par l'absence d'alimentation. Ces effets pourraient résulter d'une action directe des apports nutritionnels différents (Tableau 2) mais cette hypothèse est difficile à soutenir puisque nous ne disposons que de peu d'informations sur le rôle des métabolites (acides gras non estérifiés, β -hydroxybutyrate) au niveau du système nerveux central. Parallèlement à l'impact nutritionnel et/ou gastrique (phénomène d'encombrement ruminal), nous ne pouvons ignorer le facteur émotionnel de frustration. Un tel phénomène pourrait aussi se traduire par l'activation du noyau paraventriculaire ou du septum latéral puisque ces structures appartiennent aussi au réseau neuronal des émotions. Toutefois, la cortisolémie et les nombres de neurones CRF-ir sont similaires entre les deux groupes d'animaux, résultats qui ne soutiennent pas l'hypothèse d'un effet stressant du jeûne. Enfin, la majorité des structures neuronales que nous avons identifiées pourraient être connectées entre elles, l'activation des unes pouvant résulter de celle des autres. Par exemple, l'activation du septum latéral, dont le rôle dans la prise alimentaire chez l'ovin n'est pas documenté, pourrait être la conséquence de l'activation des noyaux paraventriculaire et dorsomédian, ces deux structures hypothalamiques innervant le septum latéral chez les rongeurs (Risold et Swanson, 1997).

Dans ce modèle de modification nutritionnel à court terme, nous n'avons pas mis en évidence d'effet sur la sécrétion de la LH. Cette absence d'effet du jeûne sur la sécrétion de la LH pourrait être due aux particularités digestives des ruminants pour lesquels le temps de séjour moyen du bol alimentaire dans le rumen peut être de 60h, l'apport de nutriments n'étant pas totalement interrompu après 24h de jeûne.

I.4. Substrats neurobiologiques de la sécrétion de la LH sensibles à l'état nutritionnel

Comme précédemment, nous avons travaillé avec le modèle de brebis adulte, multipare, tarie et ovariectomisée de race INRA 401 ; les statuts nutritionnel (note d'état corporel, masses corporelles lipidique et protéique, métabolites circulants) et endocrinien (cortisol, insuline, leptine) des animaux ayant été suivis tout au long de l'expérience jusqu'au jour d'abattage.

Après une période d'adaptation aux conditions expérimentales, les besoins nutritionnels d'entretien ont été évalués afin de nourrir les brebis à 100% des besoins nutritionnels estimés. La moitié des animaux a ensuite été sous-nutrie à 40% (40S) et l'autre moitié maintenue à 100% (100S) pendant 163j. A cette date, la moitié de chaque groupe a été abattue et l'autre moitié a été réalimentée, au moins à 140% des besoins nutritionnels estimés d'entretien (100R et 40R). Les brebis 100R et 40R ont été abattues par décapitation au 4ème jour de réalimentation. La prise alimentaire n'ayant pas d'effet sur la densité des populations neuronales, tous les animaux ont été abattus après avoir été nourris. La durée de la sous-nutrition n'était pas déterminée *a priori*, et devait être interrompue lorsque toutes des brebis sous-nutries présentaient une extinction de leur sécrétion pulsatile de LH, critère que nous n'avons jamais atteint deux fois de suite à quelques jours d'intervalle. Nous avons donc choisi d'interrompre la sous-nutrition après 163j.

Compte tenu des précédents résultats, nous avons focalisé notre intérêt sur certains neuropeptides dans certaines régions hypothalamiques, en tenant compte des subdivisions anatomiques identifiées chez les brebis traitées avec de la colchicine (cf. I.1).

Caractérisations des statuts nutritionnel et endocrinien des animaux

Le poids vif et la note d'état corporels diminuent significativement chez les animaux sous-nutris (40S vs 100S). Chez les 40S, ces modifications résultent principalement d'une mobilisation de la masse lipidique (proche des 13kg avant la sous-nutrition et inférieure à 5 kg après), la diminution de la masse protéique étant d'environ 2kg. L'impact de cette mobilisation se traduit par un taux circulant d'acides gras non estérifiés très supérieur chez les brebis 40S dès le 14ème jour de sous-nutrition (Tableau 3). Aucune différence de leptinémie, d'insulinémie et de cortisolémie n'a été observée entre les groupes 40S et 100S au 163ème jour, seules des différences ponctuelles ayant été notées. L'absence de différence entre les brebis 100S et 40S pour les concentrations plasmatiques en β -hydroxybutyrate et en urée suggère que la sous-nutrition, dans notre étude, n'a entraîné ni cétose, ni mobilisation excessive des protéines (Tableau 3).

Après la réalimentation, le poids vif corporel augmente rapidement, résultat de la taille du bol alimentaire accrue lors de la phase de réalimentation. Cette augmentation ne peut être attribuée à des modifications de l'état nutritionnel comme en témoigne la note d'état corporel inchangée. La réalimentation a eu un effet immédiat sur les acides gras non estérifiés dont la concentration plasmatique chez les brebis du groupe 40S retrouve une valeur proche des animaux 100S ou 100R. Chez les deux groupes, 100R et 40R, la glycémie et l'insulinémie augmentent, la leptinémie étant supérieure uniquement chez les brebis du groupe 100R.

	Brebis 100S	Brebis 40S
AGNE (mmol/L)	0,14 ± 0,02	0,54 ± 0,09
β-OH (mmol/L)	0,33 ± 0,02	0,40 ± 0,04
Urée (g/L)	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,02
Glucose (g/L)	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,01
Leptine (ng/mL)	4,26 ± 0,47	3,56 ± 0,20

Tableau 3 : Moyennes (\pm erreur standard) des paramètres sanguins caractérisant le statut nutritionnel des brebis 100S et des brebis 40S après 163j de sous-nutrition (AGNE, acides gras non estérifiés ; β -OH, β -hydroxybutyrate).

Sous l'effet de la sous-nutrition, nous attendions une inhibition de la sécrétion de la LH, caractérisée par une extinction de la pulsativité. De tels profils ont été observés ponctuellement chez quelques brebis sous-nutries, mais l'effet ne s'est pas maintenu. L'amplitude des pulses de LH mesurée chez les brebis 40S tend à être inférieure à celle des brebis 100S, des différences significatives existant à certaines dates de prélèvements.

Il existe une grande variabilité interindividuelle de la réponse à la réalimentation, des augmentations et des diminutions de la sécrétion de LH étant observées chez tous les animaux, quel que soit leur état nutritionnel. Le seul paramètre ayant été significativement modifié est l'amplitude des pulses qui augmente chez les brebis 40R.

Impact de l'état nutritionnel sur la population de neurones CRF-ir (Chaillou et al., J. Neuroendocrinol. 2002)

Le nombre de neurones CRF-ir est plus élevé dans le noyau paraventriculaire des brebis sous-nutries (40S) que dans celui des brebis alimentées à 100% de leurs besoins. L'effet de la sous-nutrition sur le nombre de neurones CRF-ir n'est pas concomitant avec une modification de la cortisolémie. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du nombre de neurones CRF-ir, que nous observons, résulte d'une diminution de la libération du CRF, ou que les neurones CRF-ir recrutés ne sont pas impliqués dans la régulation de l'axe HPA.

Impact de l'état nutritionnel sur les populations NPY-ir

La population de neurones NPY-ir est sensible à la sous-nutrition et à la réalimentation. Nous avons aisément distingué les sous-populations du noyau infundibulaire précédemment décrites (cf. I.1) et ainsi mis en évidence un effet de la sous-nutrition spécifique de la sous-population latérale et un effet de la réalimentation spécifique de la sous-population ventrale. Les deux sous-populations de neurones NPY-ir que nous avons identifiées dans le noyau infundibulaire, présentent donc des sensibilités spécifiques aux différents états nutritionnels. Cette différence entre les sous-populations peut être due à des différences neurochimiques (comme la présence de récepteurs à la leptine sur une seule des sous-populations) ou à des sensibilités spécifiques de variations de métabolites circulants (acides gras non estérifiés, insuline...).

Impact de l'état nutritionnel sur les populations galanine-ir (Chaillou et al., 2003)

Des nombres élevés de neurones galanine-ir ont été observés dans l'aire préoptique, le noyau infundibulaire et les noyaux dorsomédian et dorsocaudal. Dans l'aire préoptique, l'effet de la réalimentation se traduit par un plus grand nombre de neurones galanine-ir chez les brebis réalimentées. Dans les noyaux dorsomédian et dorsocaudal, il semble que les neurones galanine-ir constituent une même population. Son nombre de neurones augmente avec la sous-nutrition et la réalimentation (nombre de

neurones galanine-ir plus élevé chez les brebis 40R comparé aux brebis 40S, 100S et 100R). Dans le noyau infundibulaire, la sous-nutrition et la réalimentation entraînent, toutes les deux, une augmentation du nombre de neurones galanine-ir. La galanine observée dans l'aire préoptique pourrait être colocalisée avec des neurones à LHRH et être ainsi à l'origine de l'augmentation d'amplitude des pulses de LH après la réalimentation (40R).

Conclusions

L'absence d'effet net de la sous-nutrition sur la pulsativité de la sécrétion de la LH, ne nous permet pas de conclure quant au rôle des différentes populations de neuropeptides étudiés dans l'interaction entre la nutrition et la reproduction. Les effets sur l'amplitude des pulses peuvent résulter d'une action au niveau hypophysaire et non d'une action au niveau hypothalamique. Nos résultats suggèrent une pertinence limitée de notre modèle pour l'étude des effets de la sous-nutrition sur la pulsativité de la LH. De même, les études montrant un effet de la sous-nutrition sur la pulsativité de la LH ont souvent été réalisées sur des animaux adultes en production (croissance, lactation), entiers ou ovariectomisés avec un implant d'oestradiol, contrairement à notre modèle de brebis adulte tarie et sur des races plus rustiques comme la Soay ou à des fins de production différentes que la race INRA 401. Cette race synthétique a été créée afin d'allier des compétences de prolificité et de production de viande.

Nous avons montré que les populations neuronales, contenant du NPY et de la galanine, sont sensibles à la sous-nutrition et/ou à la réalimentation, faisant de ces neuropeptides des médiateurs potentiels dans l'interaction entre la nutrition et d'autres grandes fonctions. Chez les ovins, si le rôle du NPY dans la régulation des fonctions de reproduction et d'ingestion, est bien établi, ce n'est pas le cas pour la galanine. Il serait donc pertinent d'identifier l'effet de la galanine sur la sécrétion d'hormones hypophysaires (LH, hormone de croissance) et sur le comportement alimentaire après une injection intracérébroventriculaire ou dans des structures cibles.

Les variations de nombre de neurones liées à la sous-nutrition et à la réalimentation pourraient résulter des modifications de la concentration de certains facteurs humoraux (insuline, acides gras non estérifiés). Toutefois, des variations comparables, observées après 24h de jeûne, n'ont pas eu d'effet sur les nombres de neurones contenant de la galanine, du NPY ou du CRF. Il serait donc intéressant de tester l'impact de la chronicité des taux circulants des facteurs nutritionnels humoraux.

Nous avons montré qu'un nombre important de structures du diencephale est activé par la prise alimentaire ou par le jeûne. Parmi ces structures, certaines sont aussi mises en jeu lors de la sous-nutrition et/ou de la réalimentation (noyaux infundibulaire, dorsomédian ou dorsocaudal). Toutefois, nous ne pouvons associer ces activations à des variations de nombre de neurones CRF-, NPY- ou galanine-ir. L'absence d'effet de la prise alimentaire, ou du jeûne, sur les populations neuronales étudiées peut être liée à la méthode utilisée (l'immunohistochimie) qui ne permet pas de détecter de faibles variations. Il serait intéressant de rechercher les effets de la prise alimentaire avec des méthodes plus sensibles comme le push-pull ou la microdissection, les neuropeptides étant respectivement dosés dans le LCR ou dans le tissu cérébral prélevé.

I.5. Etat des connaissances en 2012

Au sein du laboratoire (UMR-PRC), l'étude des mécanismes neurobiologiques de la régulation de la LHRH se poursuit indépendamment des mécanismes impliqués dans l'interaction entre la nutrition et la reproduction. En particulier, les interactions morphofonctionnelles entre les neurones galaninergiques et l'oestradiol (Tourlet et al., 2005) et le système LHRH (Tillet et al., 2012), le récepteur de type 1 de la galanine et la LHRH étant colocalisés (Dufourny et Skinner, 2005).

L'implication du NPY dans cette interaction pourrait mettre en jeu des récepteurs différents, le récepteur Y2 jouant un rôle dans la sécrétion de la LHRH et le récepteur Y1 jouant un rôle dans la prise

alimentaire (Clarke et al., 2005). D'autres acteurs, comme la Ghrelin, ont été étudiés pour leur impact sur la prise alimentaire (Grouselle, Chaillou et al., J. Neuroendocrinol. 2008).

Plus généralement, les effets de la sous-nutrition sont étudiés pendant la période de gestation afin d'identifier les conséquences sur la descendance de mères sous-nutries (interrogation pubmed avec les entrées : nutrition AND reproduction AND sheep AND brain sur la période 2004-2012).

I.6. Publications internationales avec comité de lecture

- E. Chaillou**, G. Tramu, J. Thibault, Y. Tillet. Presence of galanin in dopaminergic neurons of the sheep infundibular nucleus: a double staining immunohistochemical study. Journal of Chemical Neuroanatomy 15 (1998) 251-259.
- E. Chaillou**, G. Tramu, Y. Tillet. Distribution of galanin immunoreactivity in the sheep diencephalon. Journal of Chemical Neuroanatomy 17 (1999) 129-146.
- E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu, Y. Tillet. Effect of feeding on Fos protein expression in sheep hypothalamus with special référence to the supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study. European Journal of Neuroscience 12 (2000) 4515-4524.
- E. Chaillou**, R. Baumont, Y. Chilliard, Y. Tillet. Several subpopulations of neuropeptide Y-containing neurons exist in the infundibular nucleus of sheep: An immunohistochemical study of animals on different diets. Journal of Comparative Neurology 444 (2002) 129-143.
- E. Chaillou**, R. Baumont, G. Tramu, Y. Tillet. Long-term undernutrition followed by short-term refeeding effect on the corticotropin-releasing hormone containing neurones in the paraventricular nucleus: An immunohistochemical study in sheep. Journal of Neuroendocrinology 14 (2002) 269-275.
- E. Chaillou**, R. Baumont, D. Fellmann, G. Tramu, Y. Tillet. Sensitivity of galanin- and melanin-concentrating hormone-containing neurones to nutritional status: an immunohistochemical study in the ovariectomized ewe. Journal of Neuroendocrinology 15 (2003) 459-467.
- E. Chaillou**, Y. Tillet. Nutrition and hypothalamic neuropeptides in sheep: Histochemical studies. Histology and histopathology 20 (2005) 1209-1225.
- D. Grouselle*, **E. Chaillou***, A. Caraty, M.-T. Bluet-Pajot, P. Zizzari, Y. Tillet, J. Epelbaum. Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma Ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. Journal of neuroendocrinology 20 (2008) 1138-1146. *, contribution égale.

II. Régulation nerveuse de l'ingestion chez le porc : rôle central des stimuli gastro-duodénaux post-ingestifs

II.1. Contexte professionnel

J'ai intégré l'équipe « Contrôle nerveux de l'ingestion » peu de temps (septembre 2000) avant sa création (janvier 2001). La thématique de l'équipe (1 DR et 1 doctorant ASC) était davantage axée sur la physiologie digestive avec un intérêt pour les troubles de l'ingestion associés à une hypersensibilité digestive. L'équipe appartenait à une unité de recherche aux axes de recherches complémentaires (nutrition, croissance, reproduction, bien-être...) destinés à comprendre la physiologie et les comportements du porc afin de proposer ou d'améliorer les systèmes d'élevage.

Le projet d'équipe proposait d'étudier l'impact des signaux d'origine gastro-intestinale à trois niveaux d'intégration : (1) le système vagal (C.-H. Malbert), (2) le système nerveux intrinsèque (S. Blat, ASC), et (3) le système nerveux central (E. Chaillou). Les finalités affichées par l'équipe étaient (1) d'améliorer le comportement alimentaire des porcs lors des périodes critiques d'élevage, (2) de proposer des solutions pour ajuster la prise alimentaire de personnes présentant des troubles de l'ingestion liés à des pathologies comme l'obésité ou l'hypersensibilité digestive.

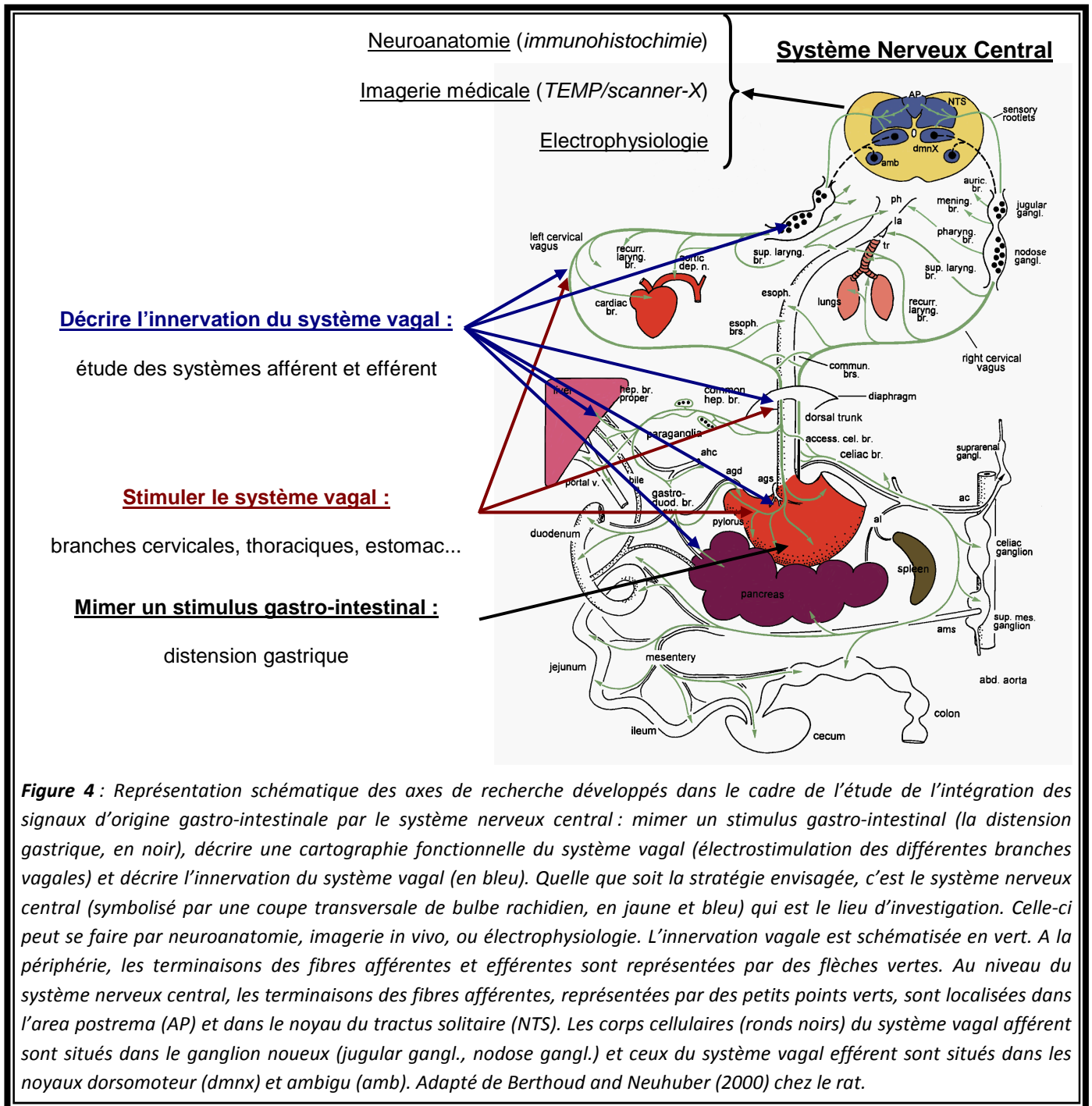
Dans ce contexte, j'ai tenté, dès mon arrivée, de sensibiliser les membres de l'unité aux neurosciences et plus particulièrement aux réseaux neurobiologiques mis en jeu dans les régulations étudiées dans l'unité. J'ai tenté de développer des stratégies expérimentales me permettant d'acquérir les compétences nécessaires à l'utilisation des outils disponibles dans le laboratoire (imagerie *in vivo* et électrophysiologie) en les adaptant à l'étude du système nerveux central. Enfin, j'ai œuvré aux développements d'approches immunohistochimiques pour acquérir une meilleure connaissance du système vagal porcin, indispensable à l'interprétation des données fonctionnelles. Ainsi, pour développer ma thématique de recherche, j'ai engagé trois actions complémentaires (Figure 4) : (i) *mimer un stimulus gastro-intestinal (la distension de l'estomac)*, (ii) *électrostimuler les différentes branches du système vagal*, (iii) *décrire l'innervation du système vagal*.

II.2. Identification des régions cérébrales activées par la distension gastrique (oct. 2000-mai 2001)

L'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac entraîne une diminution du tonus gastrique, appelée relaxation réceptive. Celle-ci permet l'ingestion d'un volume alimentaire plus important que ne le permettrait le volume de l'estomac à jeun. Un modèle expérimental de distension, par l'inflation d'une poche située dans l'estomac, permet de mimer la présence du bol alimentaire dans l'estomac alors que sa relaxation est possible (distension de l'estomac isovolumique, à volume constant) ou non (distension de l'estomac isobare, à pression constante). En physiopathologie digestive, l'absence de relaxation réceptive est souvent associée à des troubles pouvant entraîner des phénomènes de satiété précoce.

Chez le porc, le comportement alimentaire est modifié par la perfusion de nutriments dans le duodénum et par la distension gastrique. Selon que le tonus gastrique est maintenu ou non, la distension gastrique n'a pas les mêmes effets sur le comportement alimentaire du porc en croissance : la distension gastrique isobare accroît la durée du repas alors qu'une distension isovolumique est sans effet (Lepionka et al., 1997).

L'hypothèse était que les régions cérébrales mises en jeu dans ces régulations seraient différenciellement activées par les modalités de distension gastrique. Nous avons choisi d'évaluer l'activité des régions cérébrales au travers de variations de débits sanguins mesurées par tomographie d'émission monophotonique.



Les expérimentations ont été réalisées chez la truie prépubère en croissance limitée (env. 40kg), anesthésiée et équipée d'une canule intragastrique et d'un cathéter intraveineux. La distension de l'estomac proximal a été réalisée automatiquement avec un barostat pneumatique, l'HMPAO (hexaméthylpropylèneamine Oxime) marqué au ^{99}Tc étant injecté par voie intraveineuse à la 4^{ème} minute de distension. Immédiatement après, l'acquisition des images tomographiques a été réalisée.

Les résultats obtenus par tomographie d'émission monophotonique ne sont pas exploitables s'ils ne sont pas associés à des données anatomiques obtenues sur le même animal ou sur un modèle de cerveau moyen (template). Le laboratoire n'ayant aucun outil à sa disposition pour acquérir des images anatomiques, les résultats préliminaires ont été interprétés en utilisant des données anatomiques d'IRM d'un cerveau d'une tête congelée d'un animal de même taille et de même poids que les animaux expérimentaux. Le recalage et la fusion des images fonctionnelles et des images anatomiques ont été

réalisées avec la collaboration du laboratoire UPRES-EA 3192 IDM (B. Gibaud, C. Grova) de l'université de Rennes 1. Nous avons ainsi pu suspecter des variations de débit sanguin dans des régions du télencéphale et du diencéphale.

Face à l'absence de données anatomiques, indispensables à l'interprétation des données fonctionnelles, j'ai choisi d'interrompre ce projet (1er semestre 2001) et de le relancer après l'acquisition d'équipement permettant une connaissance anatomique ou le développement d'un cerveau moyen (template anatomique).

II.3. Identification des régions cérébrales activées par l'électrostimulation de la branche cervicale du nerf vague (mars-juil. 2002)

De nombreux signaux satiétogènes sont transmis par le nerf vague vers les cibles neuronales, en particulier par le relai des structures du bulbe rachidien. Une stratégie expérimentale est d'identifier et d'étudier les structures cérébrales sensibles à la stimulation de différentes branches du système vagal. Ce projet se décline en plusieurs étapes : la stimulation de la branche cervicale du nerf vague, ce qui correspond à stimuler tout le système vagal, la stimulation de la branche thoracique, ce qui revient à supprimer toutes les informations d'origine cardio-ventilatoire, et la stimulation des extrémités libres des fibres afférentes vagales gastriques, ce qui permet de mimer des signaux d'origine gastrique. L'objectif de ce projet était d'établir une cartographie fonctionnelle du système vagal afférent.

La première étape de ce travail a été réalisée en collaboration avec A. Biraben (CHU Pontchaillou) qui étudie la stimulation vagale cervicale comme traitement de certaines épilepsies, les indications, les mécanismes et les cibles cérébrales n'étant pas parfaitement connus.

Cinq truies prépubères en croissance limitée (env. 40kg) ont été équipées, sous anesthésie, d'électrodes de stimulation sur les branches cervicales du nerf vague, préalablement disséqué, et d'électrodes d'enregistrement implantées, par stéréotaxie, dans la région de l'amygdale et du cortex insulaire. Les animaux ainsi équipés ont été soumis, sous anesthésie, à des stimulations de tension du nerf cervical droit, gauche ou droit et gauche. Plusieurs tensions de stimulation, à des fréquences et des durées différentes ont été testées, certaines comparables à des stimulations utilisées chez l'homme (7 V) et d'autres supraphysiologiques (28 V). L'activité cérébrale a été mesurée avant, pendant et après les différentes stimulations par des électrodes multiplots. L'utilisation de telles électrodes d'enregistrement a nécessité le développement d'un amplificateur 8 voies, réalisé par E. Bobillier (IE de l'équipe). L'acquisition et l'analyse des données ont été réalisées grâce à des programmes développés dans le laboratoire (C.-H. Malbert).

Au cours des essais, nous avons constaté des arrêts cardiaques liés à la stimulation du nerf vague (effet décrit dans la littérature), associés à des modifications de l'activité cérébrale. Une première analyse des résultats n'a pas permis de dissocier les effets propres de la stimulation, des effets liés aux arrêts cardiaques. Il a donc été nécessaire de développer de nouveaux programmes d'analyse et de modifier notre protocole expérimental.

II.4. Description de l'innervation des voies vagales (Chaillou et al., J. Chem. Neuroanat., 2009)

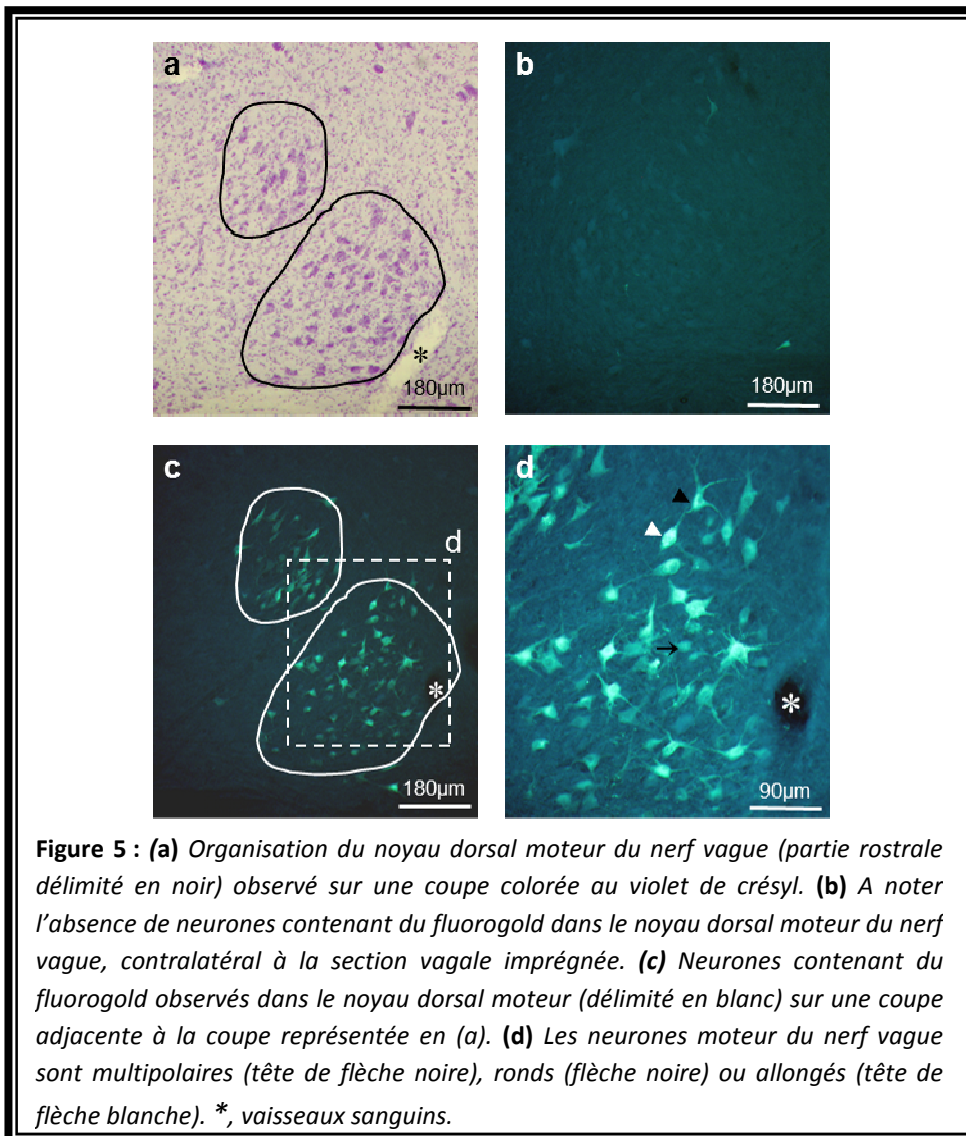
La structure étant fréquemment le substrat de la fonction, il me paraissait crucial de décrire l'innervation vagale afin de dissocier les différentes branches, en particulier celles provenant de la sphère gastrique. Compte tenu des difficultés et des limites rencontrées en développant hâtivement des approches fonctionnelles encore inadaptées à l'étude du système nerveux central porcin, j'ai débuté ce travail par la description globale du système efférent par traçage de voie du nerf vague cervical gauche. Comme le système catécholaminergique est impliqué dans des fonctions mettant en jeu le système moteur vagal, nous avons étudié la proximité anatomique, voire la présence des enzymes de synthèse des

catécholamines (TH, D β H et PNMT) dans les neurones du complexe moteur vagal. Nous avons combiné le traçage de voies et l'immunohistochimie.

L'initiation de cette tâche nécessitait la mise en place d'un laboratoire histologique avec l'acquisition de différents matériels non disponibles sur le site de l'unité : microtome à congélation, microscope à fluorescence, plateau agitateur... A ces fins, j'ai déposé un dossier auprès de Rennes Métropole (en mars 2001) en réponse à un appel d'offre pour le retour d'anciens étudiants rennais (non retenu). L'utilisation du laboratoire a été effective en août 2002.

Afin d'acquérir des données anatomiques transposables aux données fonctionnelles (II.2 et II.3), j'ai réalisé cette étude sur cinq truies prépubères (3 mois) en croissance limitée (env. 40kg). Sous anesthésie, le nerf vague cervical gauche a été disséqué et sectionné. La partie proximale a été plongée dans 20-25 μ l d'une solution de fluorogold 2% (traceur rétrograde). Après 2 semaines de migration, les cerveaux ont été prélevés et des coupes flottantes sériées ont été réalisées dans les plan frontal (n=3) et sagittal (n=2). Une coupe sagittale sur 5 et une coupe frontale sur 10 ont été observées directement ou après immunomarquages par fluorescence pour les différentes enzymes de synthèse des catécholamines (TH, D β H et PNMT).

Nous avons observé deux populations majeures de neurones contenant du fluorogold® : dans le noyau dorsal moteur du nerf vague (Figure 5) et dans la région du noyau ambigu.



Les neurones TH-ir ont été observés dans deux principales régions : la région dorsomédiane, à proximité du noyau dorsal moteur du nerf vague, et la région ventrolatérale (Figure 6a). Des neurones D β H- et PNMT-ir ont été observés dans les mêmes régions, leurs densités étant plus importantes dans la région ventrolatérale (Figures 6b,c). Une troisième région, située entre les deux principales contient des neurones

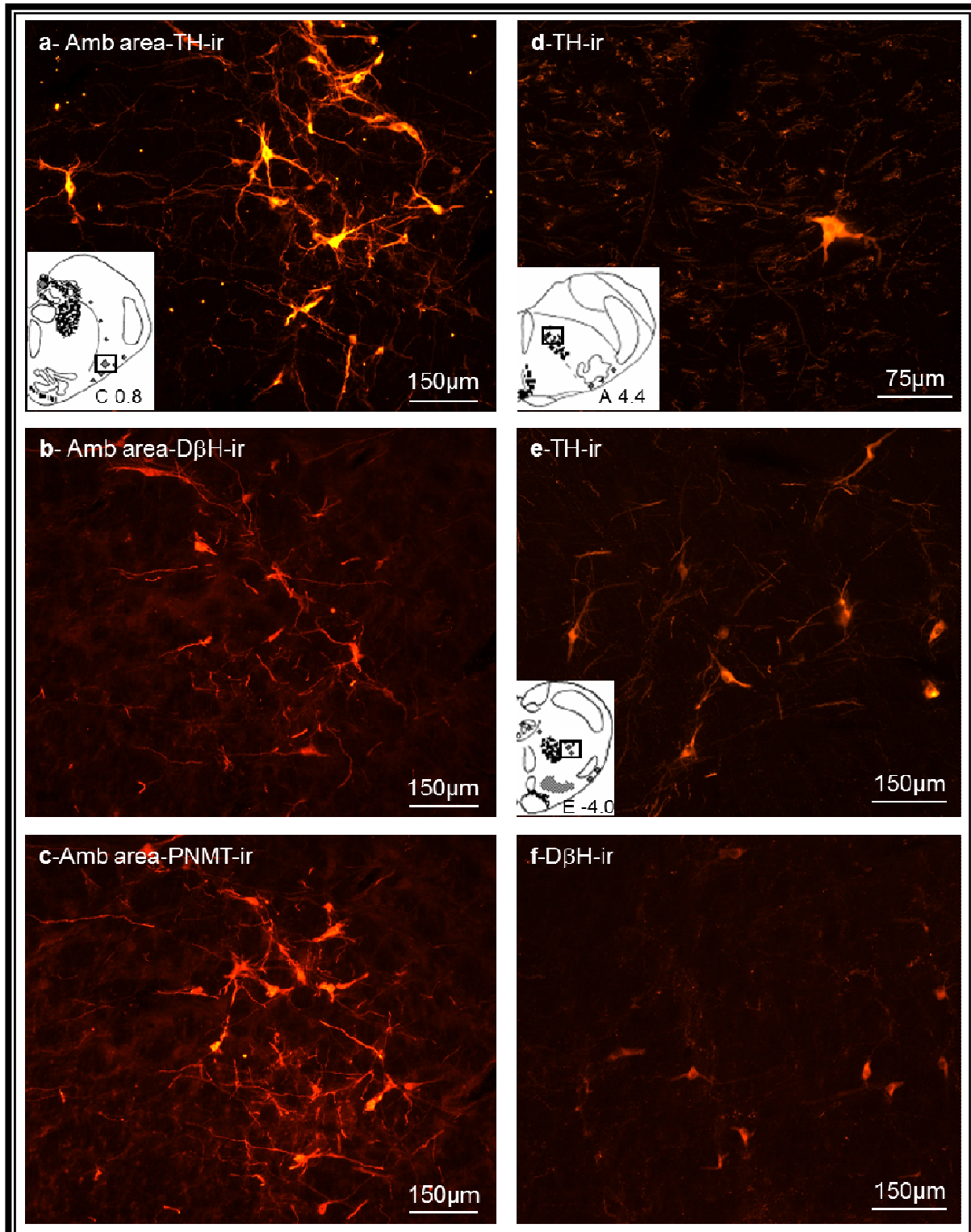


Figure 6 : Photographies illustrant des neurones immunoréactifs pour les enzymes de synthèse des catécholamines. **(a)** Neurones TH-, **(b)** D β H et **(c)** PNMT-immunoréactifs localisés dans le noyau ambigu (Amb, cadre sur schéma C 0,8). **(d)** Les neurones TH-ir sont intercalés dans les fibres TH-immunoréactives localisées entre les principales populations dorsomédiane et ventrolatérale (cadre sur schéma A4.4). **(e)** Neurones TH- et **(f)** D β H-immunoréactifs observés dans la partie caudale du bulbe rachidien (cadre sur le schéma E-4.0).

TH-ir intercalés avec des paquets denses de fibres TH-ir (Figure 6d). Plus caudalement, les neurones D β H-ir sont présents dans la même région que les neurones TH-ir (Figures 6e,f).

Des neurones doublement marqués pour la TH et le fluorogold n'ont été que très rarement vus et uniquement dans le noyau dorsal moteur du nerf vague, les populations étant très proches mais peu superposées.

Nos résultats montrent que l'organisation du système moteur du nerf vague et du système catécholaminergique est similaire à celles décrites chez d'autres mammifères, des similitudes avec l'homme étant relevées (distribution des neurones TH-ir autour du noyau dorsal moteur du nerf vague) confirmant l'intérêt du modèle porcin comme modèle d'étude pour l'homme.

Même si très peu de neurones moteurs du nerf vague contiennent de la TH, il est probable que ces deux systèmes interagissent. Nous avons noté la présence de nombreuses fibres TH-ir orientées vers le noyau dorsal moteur du nerf vague.

II.5. Etat de mes connaissances en 2012

En introduction de ce mémoire, j'ai évoqué la nécessité de définir et standardiser le modèle animal. Dans ce projet, la thématique scientifique portait sur les signaux satiétogènes et leur intégration par le système vagal. Compte tenu des approches développées au laboratoire (imagerie *in vivo* et électrophysiologie), il était nécessaire de disposer d'un animal de taille adapté à ces dispositifs. Ce dernier point a été déterminant pour le choix de travailler sur un animal en croissance limitée, un animal adulte ne pouvant être placé dans les dispositifs d'imagerie compte tenu de sa taille et de son poids. Cette contrainte a justifié de maintenir les animaux à un poids stable lors des expérimentations en distribuant une ration définie, les animaux n'étant plus alimentés *ad libitum*, condition *a priori* nécessaire pour étudier des signaux de satiété. En 2002, j'ai donc initié des démarches pour évaluer la faisabilité d'un élevage de mini-porcs. Cet élevage a été développé après mon départ et des études concernant le traitement de signaux olfactifs, d'apprentissage en relation avec l'obésité ont été développées dans l'équipe.

II.6. Publication internationale avec comité de lecture

E. Chaillou, Y. Tillet, C.-H. Malbert. Organisation of the catecholaminergic system in the vagal motor nuclei of pig: a retrograde fluorogold tract tracing study combined with immunohistochemistry of catecholaminergic synthesizing enzymes. Journal of chemical neuroanatomy 38 (2009) 257-265.

III. Neurobiologie des émotions induites par l'isolement social

III.1. Les animaux d'élevage ressentent des émotions

Les animaux domestiques d'élevage sont soumis à différentes pratiques d'élevage connues pour générer des réactions négatives, caractérisées par des vocalisations, des tentatives de fuite, des concentrations plasmatiques élevées de glucocorticoïdes et de catécholamines, des accélérations du rythme cardiaque (Manteca et Deag, 1993). Ces modifications comportementales et physiologiques se rencontrent notamment lors de rupture de liens sociaux. Certaines de ces pratiques d'élevage sont remises en cause afin de préserver le bien-être de l'animal, pour lequel la société montre un intérêt croissant. Or la notion de bien-être animal pose la question de la capacité des animaux à ressentir des émotions.

Par définition, l'émotion est une réponse affective intense et de courte durée (Kirouac, 1989). Elle résulte de processus mentaux qui se traduisent par une composante subjective (le ressenti), une composante comportementale et une composante physiologique (Dantzer, 2002). Ainsi, chez l'homme, les composantes comportementales et physiologiques (l'expression émotionnelle) sont évaluées par des mesures objectives alors que la composante subjective (le ressenti émotionnel) ne sera évaluée qu'au travers de la verbalisation du sujet, composante inaccessible chez l'animal.

Afin d'objectiver l'évaluation des émotions chez les animaux d'élevage, le réseau AgriBEA (groupe interdisciplinaire créé par l'INRA) a proposé de fonder ses stratégies expérimentales sur la théorie de l'évaluation (appraisal theory) issue des théories cognitives (Boissy, Arnould, Chaillou et al., INRA Prod. Anim. 2007 ; Animal Welfare 2007). Selon ce cadre conceptuel, les émotions sont générées par l'évaluation cognitive d'une situation à laquelle l'animal est confronté. Cette théorie propose d'évaluer une émotion au travers des réponses émotionnelles exprimées par l'animal et de la situation évaluée par l'animal. Ainsi, l'individu évaluerait la situation selon des critères élémentaires de pertinence (soudaineté, nouveauté...), d'implication (prévisibilité...), de conformité aux normes (sociales, culturelles...) et de ses capacités d'adaptation (contrôlabilité de la situation).

Les nombreux travaux réalisés dans l'équipe « Comportement » pour décrire les mécanismes mis en jeu dans l'établissement de la relation mère-jeune ont démontré que les animaux domestiques d'élevage, et en particulier les ovins, ont des capacités cognitives (mnésiques) leur permettant de reconnaître spécifiquement un partenaire ou un élément de leur environnement. De plus, Boissy et son équipe ont montré que de jeunes agnelles étaient capables d'évaluer et de réagir spécifiquement à des événements comme la soudaineté, la nouveauté, selon leur prévisibilité ou leur contrôlabilité, ensemble de critères proposés par la théorie de l'évaluation.

L'ensemble de ces travaux a participé à la démonstration que les animaux d'élevage sont doués de capacités cognitives émotionnelles.

III.2. Grégarité et comportements émotionnels

L'ovin établit des liens avec son environnement social, dès la naissance pour sa mère ou son soigneur (ensemble des travaux dirigés par Raymond Nowak, par Xavier Boivin), et tout au long de sa vie avec les congénères de son groupe. Chez le mâle, la relation hiérarchique structure le groupe (Fisher et Matthews, 2001). Les comportements agonistiques sont plus fréquents lors des périodes de reproduction, les mâles étant en compétition pour la femelle.

Les comportements agonistiques sont plus rares dans les groupes de femelles, où la hiérarchie n'est pas fortement établie. Toutefois, les brebis vont exprimer des comportements agressifs à l'égard de congénères inconnus, d'un agneau étranger ou d'un mâle sexuellement actif en dehors de la période d'œstrus de la femelle. Ces comportements se manifestent par des coups de tête ou de pattes, des sauts, des mouvements de recul suivis de charge et des grognements. Dans des cas extrêmes de brebis maternelle

et sélective, ces comportements peuvent conduire à la mort de l'agneau étranger qui tente d'approcher la femelle. A l'inverse, lorsque la brebis est sexuellement réceptive ou maternelle, elle exprimera des comportements caractéristiques d'acceptation du mâle, dans le premier cas, et caractéristiques d'acceptation de l'agneau à la mamelle avec léchage, dans le second cas. Ces comportements ne sont visibles que dans des périodes physiologiques particulières : en œstrus pour le comportement sexuel (travaux d'Hélène Gelez dirigés par Claude Fabre-Nys) et après la mise bas pour le comportement maternel (travaux de Matthieu Keller dirigés par Frédéric Lévy).

En dehors de ces périodes particulières, les ovins montrent un comportement social de suiveur, ou allomimétique, à l'égard des autres individus de son groupe. Cette tendance à imiter, suivre ou rester à proximité des membres du groupe se manifeste plus fortement chez certaines races (Ile de France, Suffolk) que chez d'autres (Texel). Ce caractère grégaire de l'ovin peut influencer ses autres comportements, comme le comportement alimentaire. Par exemple, placées en conflit de motivations alimentaire vs sociale, des femelles vont privilégier le contact avec le groupe plutôt que l'alimentation, ce choix dépendant de la distance entre la source alimentaire et le groupe (Boissy et Dumont, 2002). Au sein d'un groupe stable, des associations privilégiées et durables sont observées entre deux individus. Elles se manifestent par une synchronisation des activités alimentaire, de jeu ou de repos et par des temps passés en contact plus importants qu'avec d'autres membres du groupe. Ainsi, des individus, quels que soit leur âge et leur genre, vont exprimer une préférence pour le partenaire de vie lorsqu'ils sont soumis à un test de choix entre un congénère familial et un congénère étranger.

En conditions d'élevage extensif, le groupe peut être exposé à un prédateur (chien, loup, homme...) dont la présence va provoquer le regroupement du troupeau et sa fuite. Plus généralement, les pratiques d'élevage contraignent régulièrement l'individu à être séparé de son groupe définitivement (sevrage) ou ponctuellement (tonte). Dans ce dernier cas, l'animal séparé de son groupe est aussi soumis à des manipulations par l'homme, des changements d'environnement, voire la contention, chacun de ses événements pouvant induire, à lui seul, des réponses émotionnelles comportementales et/ou physiologiques (travaux de Marie-France Bouissou). Dans la littérature, les effets de l'isolement social (séparation du groupe) ont souvent été étudiés après manipulation par l'homme et changement d'environnement (Bobek et al., 1986, Niezgod et al., 1987) et contention (Apple et al., 1993). Dans ces conditions, les animaux expriment des comportements de détresse tels que la fuite, l'agitation (sauts, coups de pattes...), émettent de nombreuses vocalisations hautes et ne présentent plus de comportements alimentaire ou de repos.

En absence d'interaction sociale ou quelle qu'elle soit (agonistique, préférentielle, sexuelle, maternelle, interspécifique), l'animal exprime des comportements qui sont considérés comme des comportements adaptatifs ou encore appelés comportements émotionnels. Il existe une variabilité interindividuelle de l'expression de ces comportements émotionnels. Elle dépend des capacités d'adaptation (ou coping style) propres à l'animal qui vont elles-mêmes dépendre de facteurs physiologiques, génétiques ou environnementaux. L'un d'entre eux est la photopériode, étudiée pour son rôle prépondérant dans la régulation de la reproduction des ovins. Un des acteurs de cette régulation est la mélatonine, qui traduit le message photopériodique à l'organisme. Hormis son rôle démontré dans la synchronisation des rythmes photopériodiques et circadiens, et la régulation saisonnée de la reproduction, la mélatonine serait impliquée dans la régulation du système immunitaire (Guerrero and Reiter, 2002), jouerait un rôle neuroprotecteur (Claustrat et al., 2005) et pourrait jouer un rôle dans les processus cognitifs mis en jeu dans les processus mnésiques (Bousslama et al., 2007), douloureux (Whilhemsen et al., 2011) ou émotionnels.

III.3. Influence de la mélatonine sur les réponses émotionnelles induites par l'isolement social

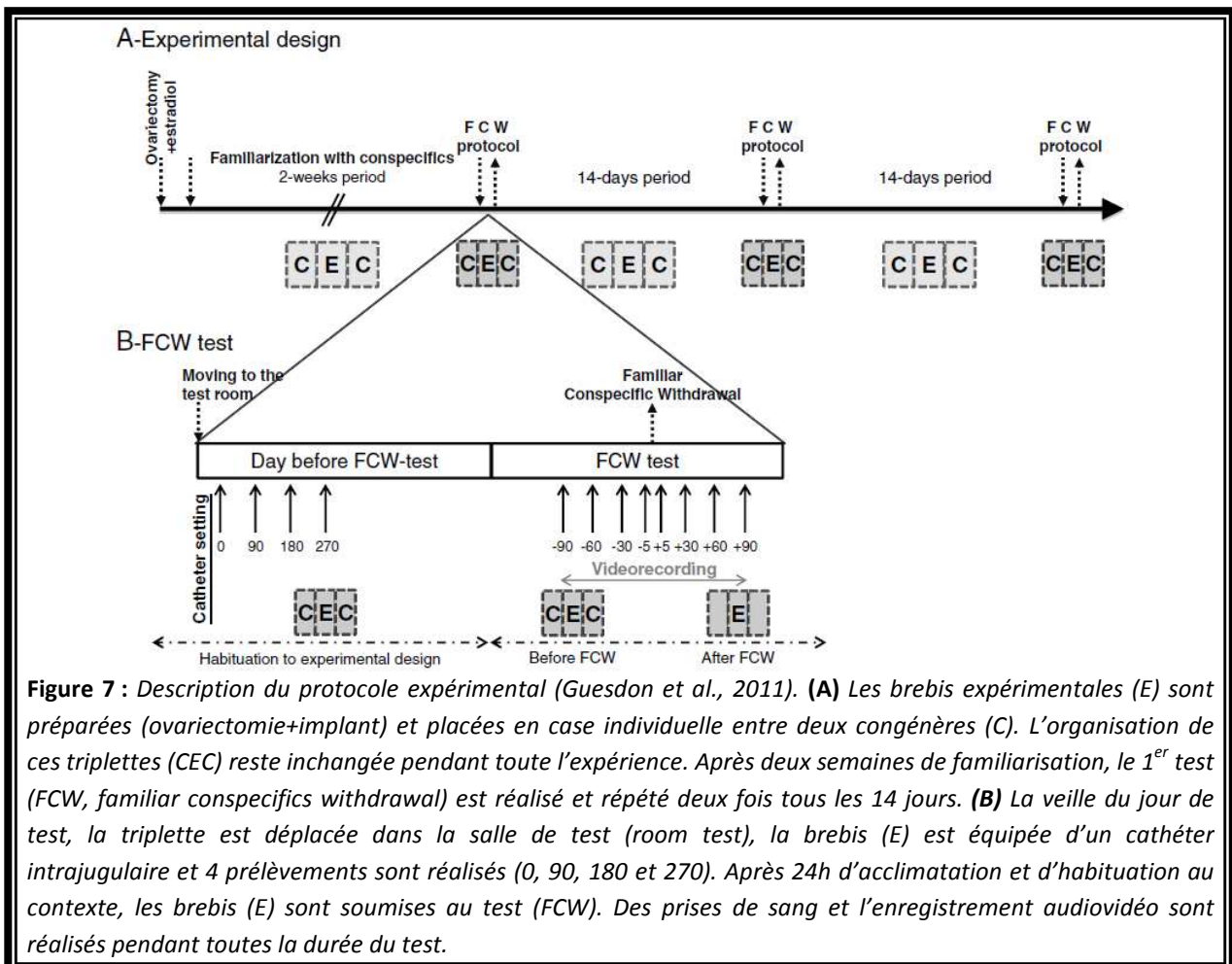
Contrat de recherche avec l'Institut de Recherche Servier 2005-2010

Validation d'un modèle d'isolement induit par le retrait de congénères familiaux (Guesdon et al., 2011)

Afin d'étudier les effets spécifiques de l'isolement social, nous avons évalué l'impact d'un isolement social pratiqué dans l'espace de vie de l'animal sans qu'il soit manipulé. J'ai donc mis en place un modèle de retrait de congénères compatible avec des mesures comportementales, endocriniennes et neurobiologiques.

Nous avons travaillé avec le modèle de brebis adulte ovariectomisée avec implant sous-cutané d'œstradiol (OVX-E₂) maintenue en cycle lumineux 12:12. Dans ces conditions, nous limitons les variations saisonnières et cycliques des stéroïdes sexuels, connus pour modifier les réponses émotionnelles.

Les animaux expérimentaux ont été préparés, habitués et familiarisés aux conditions expérimentales 4 semaines avant le premier test de retrait de congénères (Figure 7A). Pendant toute la durée de l'expérience, les brebis expérimentales ont été maintenues entre deux brebis congénères, la constitution des triplettes étant préservée pendant toute l'expérience sauf pendant les phases d'isolement. La veille du jour de test, chaque triplette est déplacée dans la salle de test, les brebis sont placées en cases individuelles (contacts visuels, olfactifs, auditifs et tactiles maintenus) et la brebis expérimentale est équipée d'un cathéter intraveineux. Le jour du test, les animaux ont été filmés pendant 3h et soumis à des prélèvements sanguins (toutes les 30min), les brebis congénères étant sorties après 1h30 (Figure 7B). Les brebis ont été soumises à trois tests successifs espacés de 2 semaines au cours desquelles les animaux sont dans leur cellule d'élevage (Figure 7A).

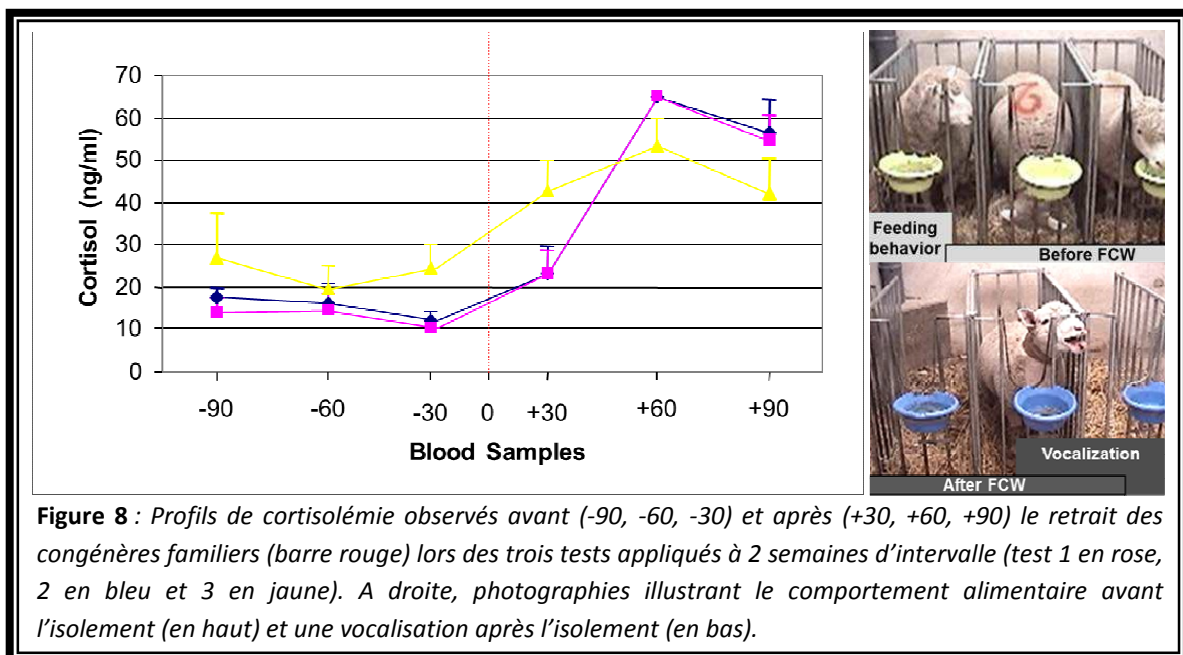


La **cortisolémie** mesurée juste après la préparation des animaux la veille du test est très élevée et diminue dans les prélèvements suivants. Les profils de cortisolémie mesurés la veille du test sont les mêmes quelle que soit la répétition. A chaque test de retrait de congénères, la cortisolémie augmente dans les 30min qui suivent le début de l'isolement social (Figure 8). Toutefois, lors de la 3^{ème} exposition, nous constatons que la cortisolémie augmente juste avant le retrait des congénères, et atteint un niveau moins élevé après le retrait des congénères, en comparaison aux deux premières expositions.

Le profil de cortisolémie observé lors de la 3^{ème} exposition, suggère que les brebis ont anticipé le retrait des congénères familiers en y réagissant moins (Figure 8).

Les **réponses comportementales** se traduisent d'une part, par une diminution des comportements d'alimentation (Figure 8) et de repos après le retrait des congénères familiers et d'autre part, par une augmentation des comportements d'agitation (coups de pattes, tentatives de retournement) et du nombre de vocalisations (Figure 8). Ces effets sont observés lors des trois expositions au retrait des congénères avec une évolution similaire à celle observée pour la cortisolémie. Les animaux sont moins souvent vus au repos ou en alimentation avant le retrait des congénères, comme s'ils anticipaient le départ de leurs congénères mais avec une moindre agitation lorsque les congénères sont effectivement partis.

La concordance des réponses endocriniennes et comportementales démontre que le retrait des congénères suffit à induire des réponses émotionnelles répétables. Toutefois, nous notons aussi une évolution de ces réponses lors de la 3^{ème} exposition. Nous faisons l'hypothèse que le paradigme d'isolement comporte, dans la phase qui précède le retrait des congénères, des indices contextuels assez pertinents (entrée de l'expérimentateur, prélèvements de sang) pour induire une réponse de peur conditionnée.

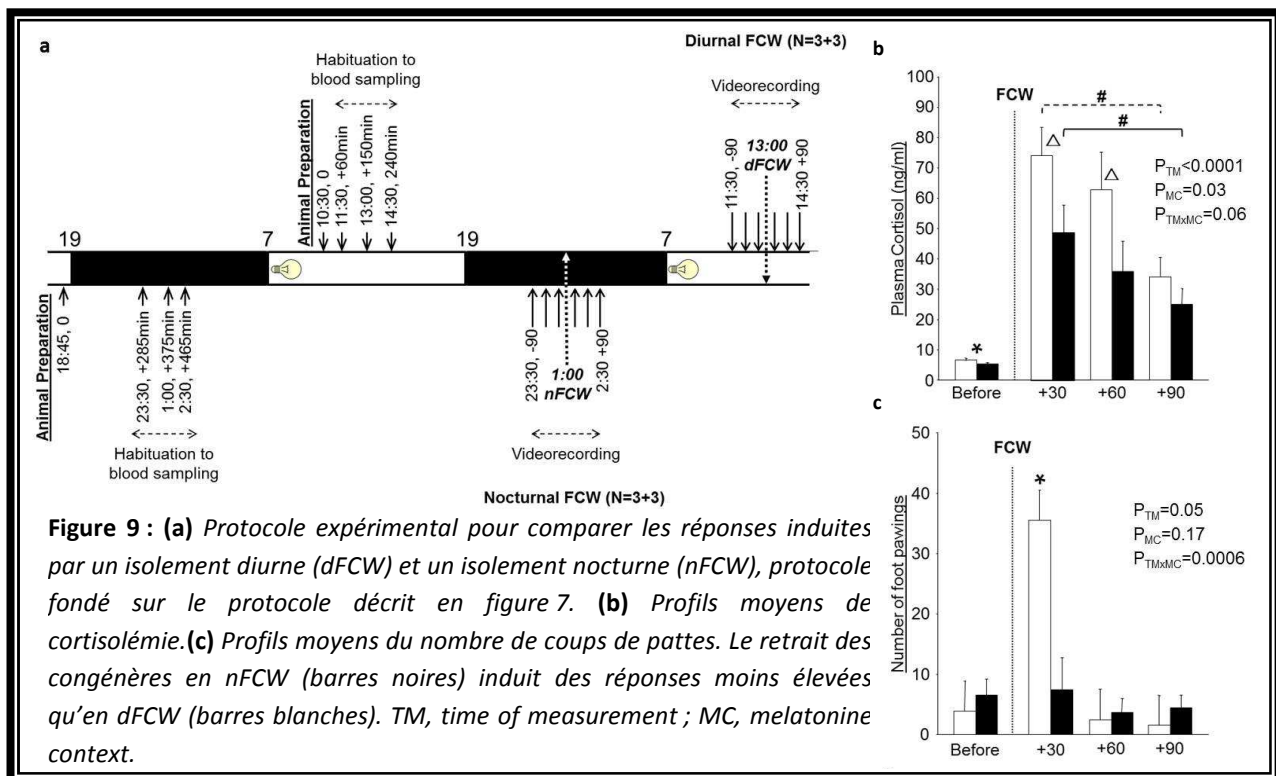


Effets rapides de la mélatonine sur les réponses hormonales et comportementales induites par l'isolement social (Guesdon et al., accepté pour publication le 15/12/2012)

Les données de la littérature rapportent que la sécrétion de mélatonine est affectée par des événements stressants et que l'apport de mélatonine tend à modérer les réponses endocriniennes induites par des situations stressantes. La plupart de ces études a été réalisée chez des espèces nocturnes, dans des paradigmes de stress chronique, avec des administrations chroniques ou répétées de mélatonine. De plus, des mesures endocriniennes et comportementales concomitantes ont rarement été réalisées en réponse à un traitement avec de la mélatonine. Par exemple, l'administration nocturne de mélatonine à des rats

exposés à un stress chronique, prévient certaines conséquences endocriniennes négatives (Detanico et al., 2009). Des effets protecteurs de la mélatonine, après prise orale, ont été observés chez des femmes, dont la réponse de sursaut est alors diminuée (Schachinger et al., 2008). De plus, les dommages de l'hippocampe observés chez des rats privés de leur mère sont réduits par la mélatonine (Tugyan et al., 2006).

Nous avons donc choisi de tester l'impact de la mélatonine sur les réponses comportementales et endocriniennes induites par le retrait de congénères. La mélatonine étant naturellement sécrétée la nuit, une première étape a consisté à comparer les effets du retrait de congénères en phase diurne et en phase nocturne (Figure 9a). Quelle que soit la phase pendant laquelle l'isolement social est réalisé, les animaux présentent des réponses émotionnelles caractérisées par l'augmentation de la cortisolémie (Figure 9b) et du nombre de coups de pattes (Figure 9c). Ces réponses sont moins importantes chez les brebis socialement isolées en phase nocturne que chez les brebis isolées en phase diurne. Cette expérience ne permet pas de démontrer l'impact spécifique de la mélatonine. En effet, les brebis ne perçoivent peut-être pas l'absence de leurs congénères dans le noir : l'odeur des congénères est encore présente, le sens de la vision est peu efficace dans le noir. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les brebis isolées en phase nocturne vocalisent peu et qu'elles émettent des bêlements bas, caractéristiques de la communication de proximité entre la mère et son agneau.



Pour déterminer si les effets précédemment décrits sont dus à la présence de mélatonine ou au contexte nocturne, nous avons mimé les taux nocturnes centraux de mélatonine par perfusion intrajugulaire. Environ 15 minutes avant l'heure habituelle d'extinction lumineuse, les animaux ont reçu une perfusion de solution saline ou de mélatonine (350µg/ml/h) et ont été maintenus dans un contexte suffisamment éclairé pour inhiber la sécrétion nocturne de mélatonine (Figure 10a).

La mesure des taux de mélatonine circulants, intra-tissulaires cérébraux et dans le liquide céphalo-rachidien ont confirmé l'efficacité du traitement. Comme dans les expériences précédentes, l'isolement social induit une augmentation de la cortisolémie et des réponses comportementales (nombre de vocalisations) chez toutes les brebis (Figure 10b,c). Ces réponses sont moins élevées, et moins durables, chez les brebis ayant reçu une perfusion de mélatonine que les brebis ayant reçu une perfusion de solution saline.

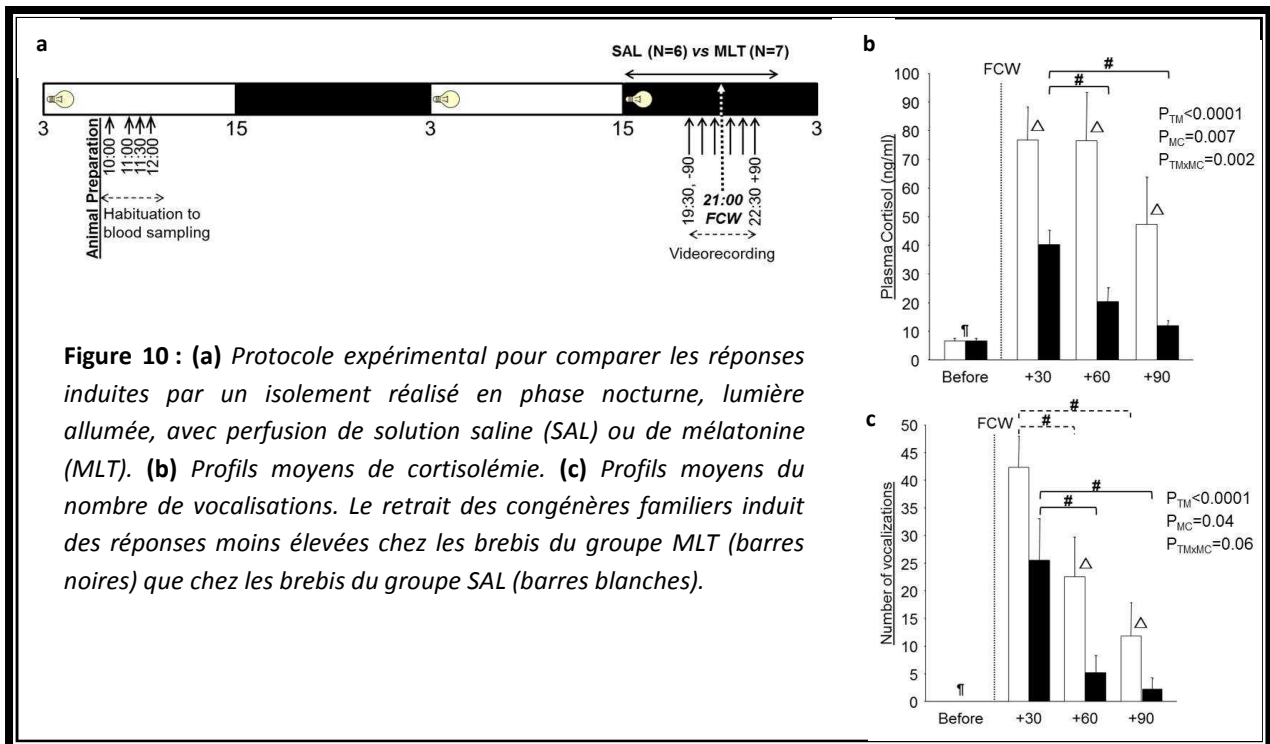


Figure 10 : (a) Protocole expérimental pour comparer les réponses induites par un isolement réalisé en phase nocturne, lumière allumée, avec perfusion de solution saline (SAL) ou de mélatonine (MLT). (b) Profils moyens de cortisolémie. (c) Profils moyens du nombre de vocalisations. Le retrait des congénères familiaux induit des réponses moins élevées chez les brebis du groupe MLT (barres noires) que chez les brebis du groupe SAL (barres blanches).

Ces résultats démontrent que la mélatonine diminue rapidement les réponses émotionnelles induites par l'isolement social. Nos données suggèrent que cette neurohormone aurait une fonction physiologique apaisante. Les mécanismes d'action de la mélatonine pour diminuer la cortisolémie résident probablement aux différents niveaux de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus présente des sites de liaison à la mélatonine et des récepteurs à la mélatonine de type MT1, à la fois chez l'homme et la brebis (Wu et al., 2006 ; Bittmann et Weaver, 1990). De plus, la mélatonine injectée par voie centrale ou sous-cutanée inhibe l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (Wang et al., 1999 ; Konakchieva et al., 1998), une action directe sur le cortex surrénalien ayant été démontrée par des études *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, la distribution des sites de liaison de la mélatonine et des récepteurs MT1 supporte l'hypothèse selon laquelle la mélatonine module le comportement par une action centrale. Chez la brebis, les cibles potentielles de la mélatonine ont été trouvées dans le cortex frontal, le septum, l'amygdale et dans les noyaux ventromédian, prémammillaire et dorsomédian de l'hypothalamus (Bittman et Weaver, 1990 ; Cogé et al., 2009). Parmi ces structures, le cortex frontal, l'amygdale et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus sont activées chez des brebis en isolement social (Da Costa et al., 2004). L'injection de mélatonine dans l'amygdale de rat diminue leur anxiété dans un test de labyrinthe surélevé (Karakas et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que la structure cérébrale qui contient le plus de mélatonine, chez la brebis, de jour comme de nuit, est la région située sous la glande pinéale incluant la matière grise périaqueducule, structure impliquée dans la régulation des comportements émotionnels chez le rat et le chat (Keay et Bandler, 2001).

III.4. Réseau neuronal impliqué dans les comportements émotionnels et l'impact de la mélatonine - contrat de recherche avec l'Institut de Recherches Servier 2005-2010

Selon la théorie de l'évaluation (« appraisal theory »), l'animal évalue la situation dans laquelle il se trouve et y réagit par une émotion (cf. III.1). L'étude des mécanismes neurobiologiques peut alors s'envisager selon deux voies : une voie intégrative, qui permet d'évaluer la situation, une voie effective, qui permet d'exprimer les réponses émotionnelles.

Chez les ovins, l'intégration des informations environnementales est surtout étudiée en relation avec la reconnaissance entre congénères, la relation mère-jeune. Ainsi, les réseaux sensoriels olfactif et visuel sont mis en jeu dans l'intégration et le traitement des informations d'origine sociale. Ceux-ci concernent le bulbe olfactif, le cortex préfrontal, l'amygdale (travaux de Frédéric Lévy), structures anatomiquement connectées entre elles (Meurisse, Chaillou et Lévy, 2009).

Les réseaux mis en jeu dans l'expression émotionnelle concernent l'axe hypothalamo (CRF)-hypophysaire (ACTH)-surrénalien (cortisol), le système neurovégétatif, l'amygdale et la matière grise périaqueducule (PAG).

Le premier système a largement été documenté chez l'ovin. La concentration porte-hypophysaire de CRF est augmentée chez des béliers soumis à un isolement social associé à une contention (Cataldi et al., 1994). Cet effet peut-être lié à la libération de CRF par les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Paull et al., 1982), structure qui présente une activation cellulaire chez des individus soumis à un isolement ou à un transport (Vellucci et Parrott, 1994). Toutefois, cette activation cellulaire peut concerner d'autres populations neuronales comme les neurones contenant de la pro-énképhaline ou de la dynorphine dont l'accumulation d'ARNm dans le noyau paraventriculaire hypothalamique augmente après un isolement social (Matthews et al., 1993). Chez le mouton, la présence d'un chien induit une augmentation de la concentration de CRF et de noradrénaline dans le liquide céphalorachidien (Turner et al., 2002).

Le rôle de l'amygdale a d'abord été démontré dans la mise en place de la reconnaissance olfactive du nouveau-né par sa mère (travaux de Matthieu Keller dirigés par Frédéric Lévy). Son activation neuronale est modifiée chez la brebis socialement isolée selon qu'elle est en présence d'une image projetée de triangle, de face de brebis ou de chèvre (Da Costa et al., 2004). De plus, la présence d'un chien qui aboie induit une augmentation de la quantité de corticolibérine libérée dans l'amygdale (Cook, 2001), cet effet étant amoindri lorsque les animaux ont la possibilité de s'échapper (Cook, 2002).

Aucune donnée n'existe quant à l'implication de la matière grise périaqueducule dans les réponses émotionnelles chez l'ovin. Les rares données neuroanatomiques rapportent l'existence de projections neuronales de la matière grise périaqueducule vers le bulbe olfactif, l'aire préoptique médiane, le noyau ventromédian, le noyau infundibulaire et l'aire rétrochiasmatique latérale (Lévy et al., 1999 ; Qi et al., 2008 ; Scott et al., 2003 ; Tillet et al., 2000). Des sites de liaisons ou des récepteurs ont été décrits dans des régions limitées de la matière grise périaqueducule : le récepteur de type I au GnRH (Albertson et al., 2008), les récepteurs aux oestrogènes (Scott et al., 1998), le récepteur de type 2 à la bradykinin (Murone et al., 1997), des sites de liaison à la somatostatine (Fodor et al., 1997). Enfin, des neurones contenant de la neurotensine, du vasoactive intestinal peptide, de la CCK, de la somatostatine et de la sérotonine ont été décrits dans différentes zones de la matière grise périaqueducule (Tillet, 1995 ; Tillet et Kitahama, 1998). L'ensemble de ces données montre une distribution hétérogène au sein de la matière grise périaqueducule, suggérant qu'il existe bien des subdivisions dans la matière grise périaqueducule de l'ovin. Chez d'autres espèces, la matière grise périaqueducule est organisée en colonnes avec des spécificités fonctionnelles (Keay et Bandler, 2001). Par exemple, la stimulation de la subdivision rostralatérale induit des comportements de confrontation, une tachycardie et celle des subdivisions caudolatérales induit des comportements de fuite. Dans ces deux derniers cas, les réponses induites par ces stimulations sont caractéristiques d'une stratégie de coping dite active. A l'inverse, la stimulation de la région caudo-ventrolatérale induit un comportement de quiescence, d'hypoactivité qui caractérise la stratégie de coping dite passive (Keay et Bandler, 2001).

Compte tenu des effets de la mélatonine sur les réponses émotionnelles, à la fois la cortisolémie et les comportements, j'ai choisi de focaliser mon intérêt sur deux structures : le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et la matière grise périaqueducule. Dans un premier temps, j'ai recherché l'effet de la mélatonine sur l'activation du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Compte tenu de l'absence de

données neuroanatomiques précises des subdivisions de la matière grise périaqueducale, j'ai entrepris d'étudier ses connexions neuroanatomofonctionnelles par histologie et imagerie par résonance magnétique.

Implication du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus dans l'effet modérateur de la mélatonine

Dans une première étude, nous avons comparé les activations du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus de brebis adultes, tariées, OVX+E₂ de race Romanov, soumises à des interactions sociales différentes : totale (3 brebis sont libres de mouvement dans un parc), limitée (1 brebis est logée en cage individuelle entourée de 3 brebis libres de mouvement), nulle (1 brebis logée en cage individuelle, isolée pendant 1h30 après le retrait de 3 brebis libres de mouvement).

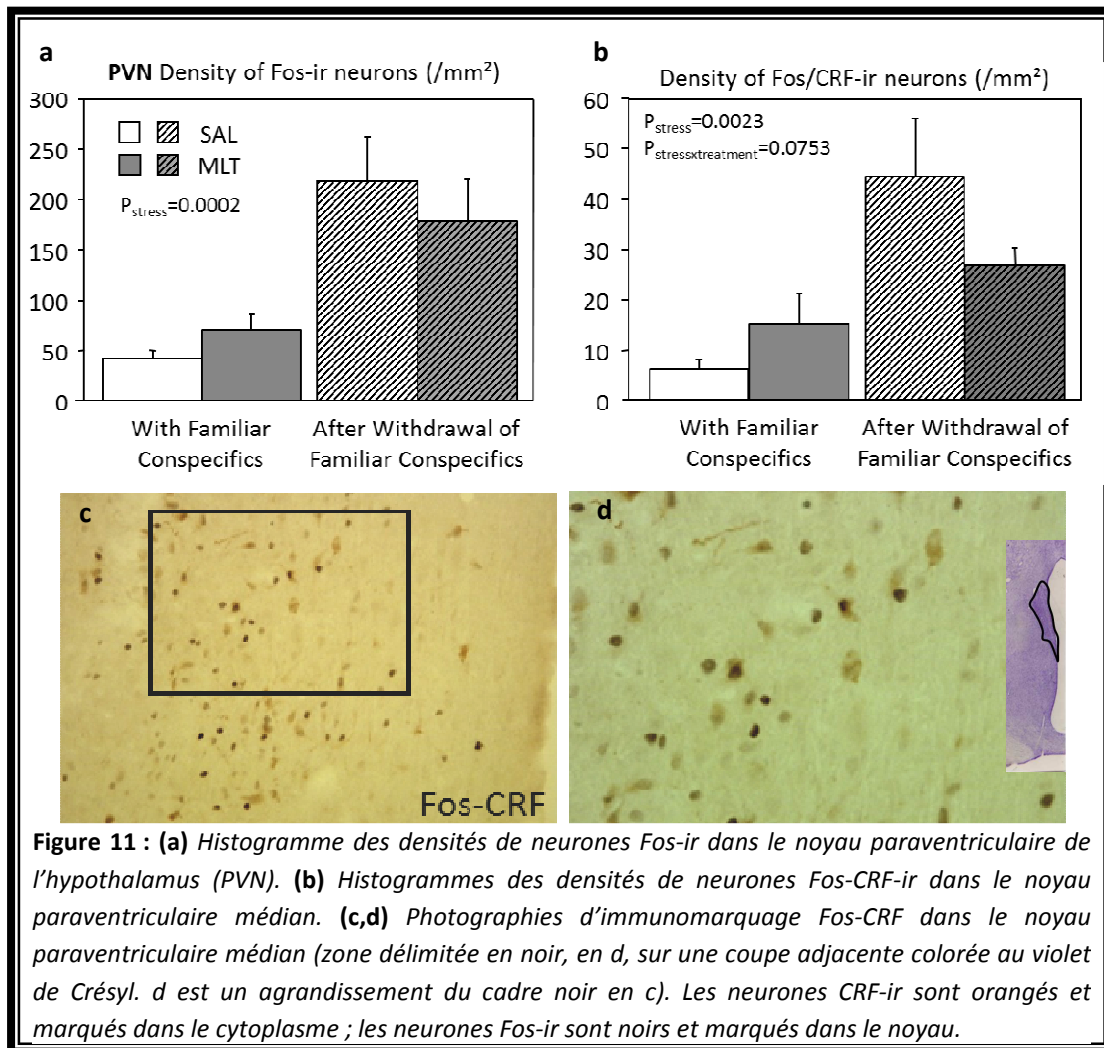
Afin de caractériser les réponses émotionnelles des animaux dans ces différentes qualités d'interactions sociales, nous avons mesuré les réponses comportementales et endocriniennes des animaux. Les réponses comportementales et endocriniennes des brebis isolées sont similaires à celles précédemment décrites (cf. III.3). L'examen de la densité de neurones Fos-ir dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus suggère une activation de la structure chez les brebis sans interaction sociale. L'examen de la densité des neurones CRF-ir dans le noyau paraventriculaire médian ne permet pas d'identifier une différence entre les qualités d'interactions sociales. Une différence est identifiée uniquement sur la densité des neurones CRF-ir faiblement marqués. Celle-ci est en faveur des brebis sans interaction sociale. Nous supposons que les neurones de ces animaux ont déchargé le CRF qui a agi sur l'axe neuroendocrinien avec un niveau plasmatique de cortisol plus élevé chez ces brebis. Cette hypothèse est soutenue par l'examen de neurones doublement marqués CRF-Fos-ir, la proportion de neurones CRF-ir activés (CRF-Fos) étant plus élevée chez les brebis sans interaction sociale (isolées) que chez les brebis des 2 autres groupes.

Une deuxième étude a été réalisée sur des brebis adultes, tariées, OVX+E₂, de race Ile de France. Elles ont subi le protocole de perfusion de mélatonine précédemment décrit (cf. III.3) et ont été euthanasiées après 1h30 d'isolement social. Quatre groupes ont été constitués :

- Brebis non isolées avec perfusion de solution saline (NIsal) ou de mélatonine (NImt),
- Brebis isolées avec perfusion de solution saline (Isal) ou de mélatonine (Imt).

Dans ces conditions, nous constatons que la densité de neurones Fos-ir dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est plus importante chez les brebis isolées, quelle que soit la nature de la perfusion. L'examen de la densité des neurones CRF-Fos-ir montre que les brebis isolées perfusées avec de la mélatonine ont une densité de neurones Fos/CRF-ir dans le noyau paraventriculaire médian plus faible que les brebis isolées perfusées avec de la solution saline (Figure 11).

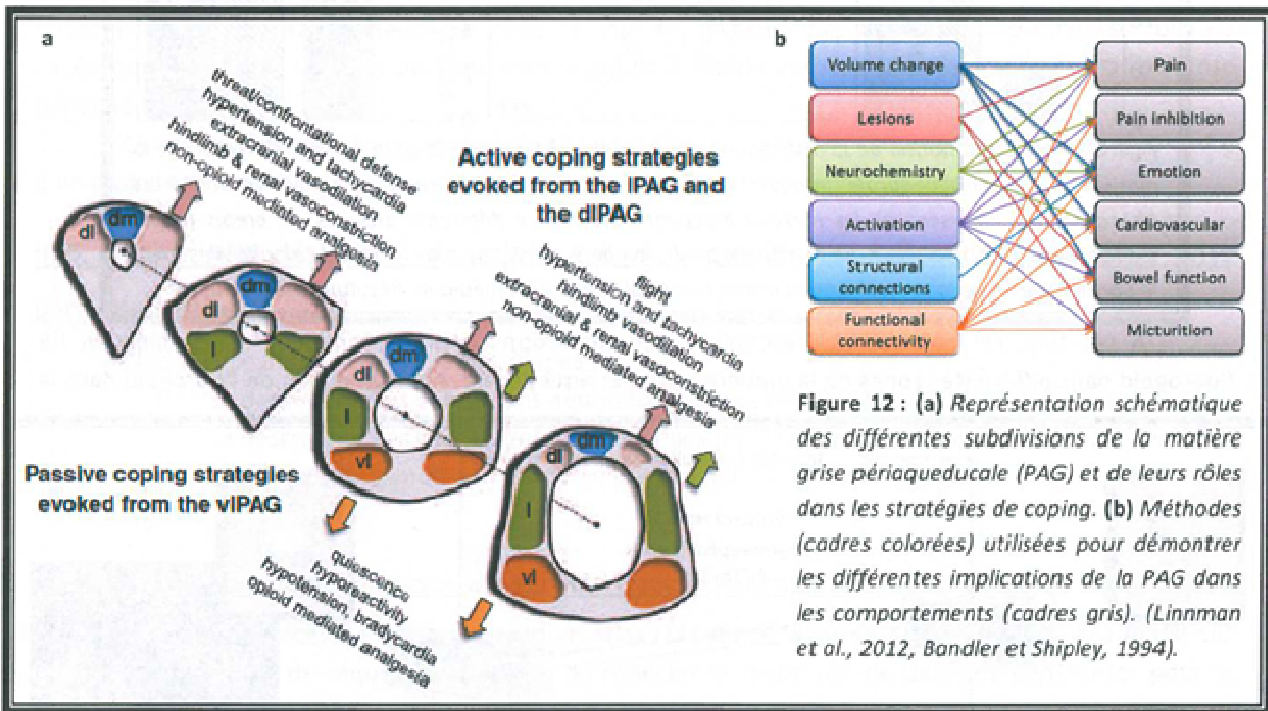
Ces résultats montrent que la mélatonine est capable de diminuer le nombre de neurones contenant du CRF activés par le retrait de congénères familiaux. Toutefois, dans cette étude l'effet observé au niveau central n'est pas associé à un effet sur la cortisolémie, ni sur les comportements, le retrait des congénères ayant eu un effet très fugace visible dans la première demi-heure d'isolement social. Nous interprétons ce résultat par la lourdeur du protocole qui a nécessité un plus grand nombre d'expérimentateurs et d'interventions, que lors des expérimentations précédentes (cf. III.3). Dans ces conditions, il est possible que les expérimentateurs aient joué un rôle social apaisant. En effet, les animaux expriment des comportements de repos sans comportements d'agitation dès la deuxième intervention des expérimentateurs, 30 minutes après le retrait des congénères.



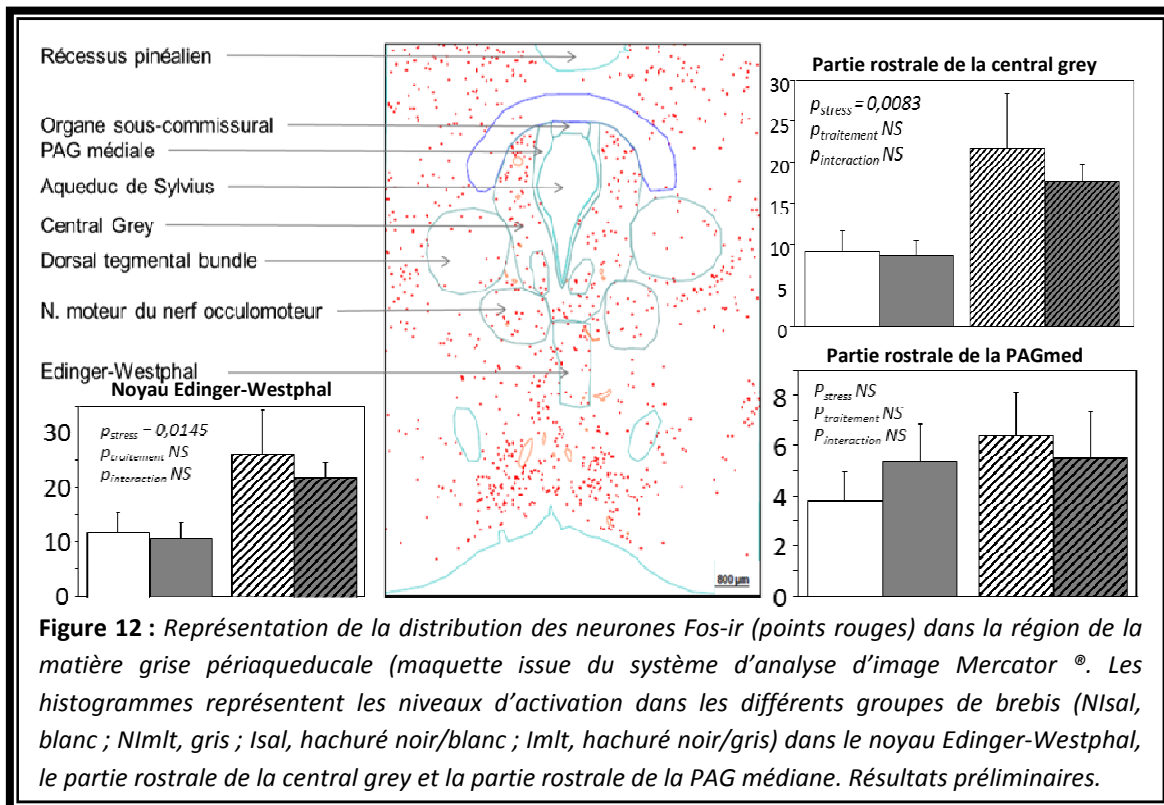
Implication de la matière grise périaqueducale dans l'effet modérateur de la mélatonine – contrat de recherche IdRS, 2010-2012. projet ANR JCJC déposé en 2011 (non retenu) et en préparation pour un dépôt en 2013.

Les comportements émotionnels sont sous le contrôle de structures cérébrales interconnectées telles que l'amygdale et la matière grise périaqueducale (Behbehani, 1995 ; Price et Drevets, 2010). La matière grise périaqueducale est décrite comme la structure des comportements de coping strategy. Chez le rat et le chat, la partie dorsale contrôle les comportements actifs (la fuite, la confrontation..) alors que la partie ventrale contrôle les comportements passifs (quiescence, hypoactivité...) (Keay et Bandler, 2001 ; Figure 12a).

Par ailleurs, comme l'ont résumé Linnman et al. (2012), la matière grise périaqueducale est impliquée dans la régulation de nombreux comportements, certains d'entre eux étant des comportements du répertoire comportemental émotionnel (miction, rythme cardiaque...) (Figure 12b).

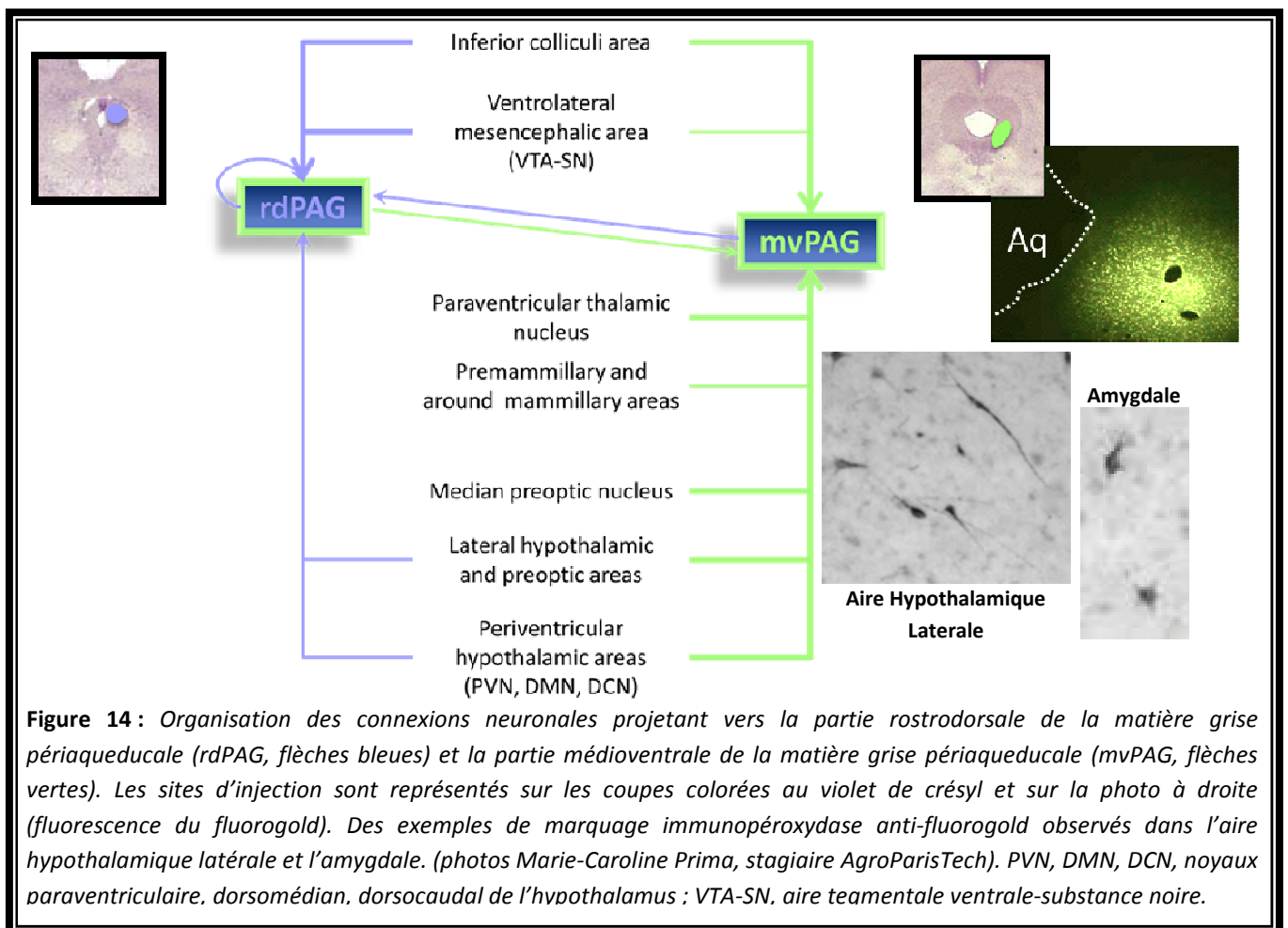


Comme je l'ai indiqué précédemment (cf. III.2), les ovins expriment des comportements émotionnels dans différents contextes sociaux pour lesquels la matière grise périaqueducale pourrait être impliquée. Cette hypothèse est renforcée par des données préliminaires que nous avons obtenues et qui montrent une activation (neurones Fos-ir) de la matière grise périaqueducale rostrale chez des brebis en isolement social (Figure 13, mêmes individus que pour les résultats illustrés à la figure 11). Toutefois, ces résultats sont difficiles à analyser puisque nous n'avons pas la connaissance de l'anatomie et des subdivisions de cette structure. Cette connaissance permettra, par ailleurs, la mise en œuvre d'approches *in vivo* de stimulation ou de lésion spécifique.



Pour décrire l'anatomie d'une structure neuronale, la première démarche consiste à identifier s'il existe une organisation cellulaire sur des critères de taille, d'orientation et de densité des neurones à partir de coupes colorées avec du violet de crésyl par exemple. Cette première étape n'a pas permis de discriminer des sous-populations ou des subdivisions au sein de la matière grise périaqueducale. Elle a toutefois permis de délimiter la matière grise périaqueducale et les structures voisines (Figure 14). Il est possible d'envisager le marquage des subdivisions par histochimie des neurones qui contiennent le transporteur-2 de la glycine, la NADPH diaphorase, pour la colonne dorsolatérale, comme cela a été réalisé chez le rat (Bandler et Shipley, 1994 ; Keay et Bandler, 2004). Ces différents marquages n'étant pas couramment réalisés au laboratoire, j'ai préféré une autre démarche qui consiste à décrire les connexions neuroanatomiques. Ce choix a aussi été motivé par l'idée d'associer les subdivisions supposées de la matière grise périaqueducale avec les réseaux neuronaux déjà décrits chez l'ovine. Cette connaissance permet d'envisager des hypothèses fonctionnelles quant aux subdivisions et leurs connexions.

Pour identifier les connexions neuronales de la matière grise périaqueducale, j'ai entrepris la description des connexions neuroanatomiques après injection de fluorogold® dans différentes zones de la matière grise périaqueducale. Après injection de fluorogold® dans la partie rostr dorsale de la matière grise périaqueducale (rdPAG, Figure 14), les régions contenant les plus grands nombres de neurones projetant sur la rdPAG sont localisés dans l'aire inférieure des colliculi et la région ventrolatérale du mésencéphale. Quelques neurones sont observés dans les aires préoptique et hypothalamique latérales et dans les régions périventriculaires de l'hypothalamus. Ces deux régions contiennent aussi des neurones qui projettent vers la partie médioventrale de la matière grise périaqueducale (mvPAG). La mvPAG est innervée par un plus grand nombre de régions que la rdPAG. Elle reçoit notamment des projections en provenance du noyau préoptique médian, de la région prémammillaire et du noyau paraventriculaire du thalamus (Figure 14).



Ces premiers résultats suggèrent que la matière grise périaqueducule de la brebis possède des subdivisions. Ces résultats préliminaires de traçage doivent être confirmés par des observations supplémentaires. La poursuite de ce travail descriptif des subdivisions de la matière grise périaqueducule se poursuit par l'ajout d'individus supplémentaires et de sites d'injection localisés dans d'autres régions. L'utilisation du Fluororuby® traceur antérograde permettra d'identifier les régions vers lesquelles la matière grise périaqueducule projette.

Ce travail, financé par un contrat de recherche avec l'Institut de Recherche Servier, fait l'objet de la première tâche du projet LinkPAG soumis à l'ANR en jeune chercheur en 2012 (non retenu).

III.5. Projet ANR LinkPAG, connexions neuroanatomofonctionnelles de la matière grise périaqueducule

L'objectif de ce projet est de décrire l'organisation anatomofonctionnelle de la matière grise périaqueducule et de démontrer son implication dans l'expression des comportements émotionnels. Pour décrire l'organisation anatomofonctionnelle, je propose d'associer les approches de neuroanatomie, précédemment décrites (III.4) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). L'utilisation de l'IRM permet d'évaluer, entre autres, le volume sanguin cérébral (CBV) et le flux sanguin cérébral (CBF) ou l'oxygénation du sang (BOLD), qui sont des indicateurs de l'activité cérébrale (Chaillou et al., 2012). Les connectivités fonctionnelles sont définies par les tables des corrélations d'activités mesurées dans les régions d'intérêt. Ces cartes de connectivités fonctionnelles seront établies dans des conditions de repos et dans des conditions stimulées. Dans ce cas, il s'agira d'implanter une électrode de stimulation dans la matière grise périaqueducule (selon les subdivisions identifiées par traçages de voies). Cette étape devrait permettre de définir plus finement les paramètres de stimulation qui seront utilisés pour identifier l'implication de la matière grise périaqueducule dans l'expression des comportements émotionnels.

Description des connectivités fonctionnelles par IRM

L'utilisation de l'IRM nécessite le développement de différents outils comme la création de cerveaux moyens (cerveaux de référence ou templates) et la création d'un atlas anatomique. Les cerveaux moyens résultent d'images acquises à partir de plusieurs individus, et seront élaborés pour les différents temps de relaxation T_1 , T_2 et T_2^* . L'atlas anatomique sera fondé sur différentes modalités de séquences IRM (T_1 , T_2 , tractographie) afin de collecter le maximum de données pertinentes pour la délimitation des structures, qui seront recalées avec les coupes histologiques. A terme, l'atlas anatomique sera associé à une base de données bibliographiques concernant la neuroanatomie de l'encéphale ovin.

Je projette de valoriser ces outils par leurs publications dans des revues internationales à comité de lecture (NeuroImage), par leur intégration dans un logiciel d'analyses statistiques (type SPM) et par leur mise en libre accès (site web de CIRE). Ce travail est soutenu par les crédits incitatifs du département PHASE/INRA et se fait en collaboration avec F. Andersson (U930, INSERM), J.Y. Ramel, P. Makris (EA6300, PolyTechTours, université de Tours) et différentes équipes de l'UMR-PRC.

A l'issue de ce travail, je souhaite déterminer les connectivités fonctionnelles de repos de la matière grise périaqueducule par la mesure du CBV, du CBF ou du signal BOLD chez l'animal anesthésié. Le réseau fonctionnel ainsi défini sera comparé au réseau neuroanatomique (cf. III.4). Pour la mesure des CBV et CBF, il est nécessaire d'utiliser un agent de contraste, le gadolinium (Gd), qui est injecté par voie intraveineuse et détecté au niveau cérébral après le passage de la barrière hématoencéphalique (BHE). Les travaux conduits par J.-C. Thiéry ont mis en évidence que la perméabilité de la BHE varie avec la saison chez l'ovin. Il est donc nécessaire de vérifier si la perfusion du Gd à travers la BHE est modifiée par la photopériode (jours courts vs jours longs). La mesure du BOLD est plus délicate puisqu'elle dépend du

niveau d'anesthésie de l'animal, anesthésie qui doit être validée afin de répondre aux contraintes éthiques (anesthésie et/ou analgésie) et expérimentales (immobilisation de l'animal).

Après ces mises au point, mon objectif est de comparer les connectivités fonctionnelles de la PAG au repos ou après stimulation. Il s'agirait d'une stimulation profonde de la matière grise périaqueducale selon la démarche réalisée par D. Olivier (Institut des Neurosciences de Grenoble) ou Min et al. (2012).

Le rôle fonctionnel de la mélatonine sur les réseaux de connectivités fonctionnelles sera testé, en comparant les connectivités fonctionnelles en présence et en absence de mélatonine selon les modalités décrites en III.3. Sur les mêmes séries d'acquisition IRM, j'envisage de déterminer les cartes de corrélations de la matière grise périaqueducale, de l'aire hypothalamique prémammillaire et de la glande pinéale. Ces deux dernières structures étant régulées ou régulant le système mélatoninergique, elles seront considérées comme des témoins de l'impact de la mélatonine.

L'ensemble de ces connaissances anatomiques et fonctionnelles devraient me permettre de définir les subdivisions sur lesquelles agir pour étudier les sorties comportementales et d'établir les réseaux de connexions sensibles à la mélatonine.

Stimulation électrophysiologique de la matière grise périaqueducale sur les comportements

La tâche précédemment décrite devrait permettre de définir finement les paramètres de stimulation à retenir pour évaluer l'impact de la stimulation de la matière grise périaqueducale sur les comportements émotionnels. Les animaux seront soumis au même contexte expérimental que celui précédemment décrit (III.3). Mon hypothèse est que l'animal exprime des comportements similaires à ceux observés en isolement social (cf. III.3) lorsque la matière grise périaqueducale est stimulée : émission de vocalisations hautes, de tentatives de fuite, de coups de pattes... Si ces effets sont observés, j'envisage de répéter la stimulation chez l'animal placé en phase nocturne et chez l'animal perfusé avec de la mélatonine (cf. III.3). La présence de mélatonine devrait alors diminuer les réponses comportementales induites par la stimulation de la matière grise périaqueducale.

Ici, compte tenu du rôle de la matière grise périaqueducale dans le comportement maternel, de reproduction (comportement de lordose chez la souris) et dans la douleur, je serai vigilante aux répertoires comportementaux à étudier, en prenant en compte le répertoire des comportements de nature émotionnelle mais aussi maternelle ou sexuelle.

L'ensemble de ce projet est évidemment conditionné par l'obtention d'un financement ! Et dans le cas où les bons numéros sortiraient, je suis convaincue de l'utilité des résultats acquis : la création et le développement d'outils nécessaires à la communauté des neurobiologistes travaillant sur le modèle ovin ; l'apport de connaissances sur une structure cruciale dans l'expression comportementale et relativement peu étudiée dans le réseau des émotions (comparativement à l'amygdale sponsorisée par la peur conditionnée et J. Ledoux) ; et l'apport d'outils recherchés en agronomie pour évaluer les états de douleur ressentis ou de mal-être. Sur ce dernier point, nous manquons de modèles pour l'étude de ces processus cognitifs chez les gros animaux, les paradigmes utilisés chez le rongeur étant peu transposables et éthiquement acceptables chez l'ovine ou le porc. Par ailleurs, si nous démontrions le rôle de la mélatonine dans ces processus cognitifs, nous pourrions proposer de tester de nouvelles techniques d'élevage comme réaliser les manipulations (tonte...) à des moments clefs du cycle circadien ou photopériodique.

III.5. Financements

L'ensemble des travaux présentés ci-dessus n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien financier des crédits incitatifs du département Phase-Inra. Ces crédits ont permis la réalisation des travaux concernant les études de neuroanatomie fonctionnelle dans les différentes modalités d'interaction sociale, les études

sur la capacité des agneaux à créer des liens de nature sociale avec leur environnement (non présentées dans ce mémoire) et la création de l'atlas IRM de cerveau de brebis.

Toutes les expérimentations menées sur la validation du modèle d'isolement social et du rôle de la mélatonine dans les réponses émotionnelles ont été financées par un contrat de recherche avec l'Institut de Recherche Servier. Les échanges scientifiques au cours de cette collaboration ont été un des moteurs de cette recherche.

Les différents contrats obtenus ou en cours de soumission sont résumés ci-dessous :

Projets ANR :

2013 : Soumission ANR JCJC - LinkPAG

2012 : Soumission ANR JCJC – LinkPAG (non retenu)

2010 : ANR EmoFarm (A. Boissy), responsable sous-tâche neurobiologie

ANR Bond007 (R. Nowak), participation pour l'imagerie cellulaire et l'imagerie cérébrale

Programme Hubert Curien :

2011 : Obtention d'un soutien Balaton avec J. Haller (Institut of Experimental Medecine, Budapest, Hongrie) pour 2 ans.

Partenariat avec industrie pharmaceutique – contrat de recherche :

2010-2012 : responsable scientifique d'un projet « stress et MLT » avec l'IdRS (53000€, 40% du budget fonctionnement et 45000€, CDD TR). Co-responsables scientifiques : A. Duittoz et L. Dufourny.

Crédits incitatifs, département PHASE-INRA

2005, Porteur, Emotion et activation neuronale (100% de la demande financée, 3200€)

2005, Porteur, Emotion et modification de l'environnement physique ou social de l'agneau (100% de la demande financée, 7450€)

2009, Partenaire, Traitements photopériodiques et bien-être (100% de la demande financée, 30000€).

2012, Porteur, Création d'un atlas de cerveau de brebis 3D par IRM (année 1 soutenue, 7500€).

III.6. Projets collaboratifs

EMOFARM, coordonné par A. Boissy. Responsable d'une sous-tâche dédiée à l'identification des structures neuronales activées (Fos-ir) par des tests comportementaux (soudaineté, nouveauté, présence de l'homme...) chez des agnelles soumises à des stress répétés ou élevés dans un environnement enrichi ; et chez des cailles de lignées sélectionnées sur la durée d'immobilité induite (STI et LTI) soumises à des stress répétés ou non.

Chez l'ovine, les stress répétés n'ont pas modifié la sécrétion basale de cortisol, ni l'état général des animaux. Les tests comportementaux ont révélé des différences de comportement face à l'homme ou à la nouveauté. Ces stimuli acquièrent des valences différentes, l'homme et l'objet nouveau suscitent de l'attrait pour les brebis élevées dans le contexte enrichi et au contraire de l'évitement chez les animaux soumis aux stress répétés. Chez la caille, les stress répétés ont eu un impact sur la cortisolémie, la prise de poids, la réactivité émotionnelle en openfield, le comportement social et l'âge d'entrée en ponte ; ces effets dépendants aussi de la lignée.

Dans ces conditions, j'ai proposé aux partenaires de ce projet, de privilégier le modèle caille pour initier l'étude des mécanismes neurobiologiques, en collaboration avec L. Calandreau. J'ai développé différents immunomarquages afin d'évaluer l'immunohistochimie de la doublecortine (marqueur de prolifération neuronale) dans l'hippocampe, de la tyrosine hydroxylase dans la matière grise périaqueducule et de la neurophysine dans tout l'encéphale. L'analyse de ces résultats est cours.

Bond007, coordonné par R. Nowak. Mon action dans ce projet concernait l'étude, par tomographie d'émission monophotonique, du développement du système oxytocinergique en fonction des conditions de vie des agneaux (en présence ou en absence de la mère, interaction avec le soigneur). Comme le matériel de scintigraphie et l'aménagement prévu à son installation n'ont pas été réalisés, cette tâche n'a pas été initiée. Sur cette même problématique, un projet de thèse a débuté en octobre 2011, sous la direction de

R. Nowak. Je suis impliquée dans le co-encadrement de S. Gaudin, doctorante, en particulier pour le développement du paradigme expérimental fondé sur un projet réalisé précédemment (cf. crédits incitatifs phase III.5).

III.7. Publications internationales avec comité de lecture

- A. Boissy, C. Arnould, **E. Chaillou**, L. Desire, C. Duvaux-Ponter, L. Greiveldinger, C. Leterrier, S. Richard, S. Roussel, H. Saint-Dizier, M.C. Meunier-Salaün, D. Valance, I. Veissier. Emotions and cognition: a new approach to animal welfare. Animal Welfare (Proceedings of the UFAW/BVA Symposium 'Quality of life: the heart of the matter'. 13-14 September 2006, London) Kirkwood J.K., Roberts E.A., Weddell S., Hubrecht R.C., Wickens S.M. (Eds.) *16 (2007) 37-43*.
- V. Guesdon, S. Ligout, P. Delagrangé, M. Spedding, F. Lévy, A.-L. Laine, B. Malpoux, **E. Chaillou**. Multiple exposures to familiar conspecific withdrawal is a novel robust stress paradigm in ewes. *Physiology and Behaviour* *105(2012) 203-208*.
- V. Guesdon, B. Malpoux, P. Delagrangé, M. Spedding, F. Cornilleau, D. Chesneau, J. Haller, **E. Chaillou**. Rapid effects of melatonin on hormonal and behavioral stressful responses in ewes. *Psychoneuroendocrinology* (PNEC-D-12-00540, accepté le 15/12/2012).
- E. Chaillou**, Y. Tillet, F. Andersson. MRI techniques and new animal models for imaging the brain. In: *When things go wrong – Diseases and disorders of the human brain*. T. Mantamadiotis, Ed. In Tech. (2012) *Chap. 10, 207-231*. <http://www.intechopen.com/books/when-things-go-wrong-diseases-and-disorders-of-the-human-brain/mri-techniques-and-new-animal-models-for-scanning-the-brain>

Activités d'encadrement

L'encadrement de personnels temporaires

Mon implication dans l'encadrement est motivée par mon envie de transmettre des connaissances, d'informer sur les métiers de la recherche, de susciter l'esprit critique pour chaque type de stage (découverte, bac+2, M2...).

Ainsi, j'accompagne des stages de découverte à des niveaux très divers : 3^{ème}, L3, M1. Les étudiants que je reçois dans ce contexte s'interrogent sur le cursus qu'ils souhaitent suivre. Mon rôle est de les informer sur les activités des différents métiers de la recherche et de les accompagner dans leur orientation. J'ai ainsi accueilli C. Lelong (2008), L. Blanchard et T. Pinheiro (2009) et T. Choppin De Janvry, (2010).

Pour les étudiants en BTS, DUT ou licence, je suis vigilante aux programmes sur lesquels ces étudiants participent afin de répondre aux critères attendus de leur formation. Les étudiants en BTS « Productions animales » ou licence ESA que j'ai encadrés ont participé à des projets à visée agronomique : M. Duhamel (BTS, 2005-2006) a travaillé sur l'impact de l'élevage au jeune âge, S. Moulin (BTS, 2008-2009) et A. Canin (Licence Pro, 2010) ont travaillé sur la réactivité émotionnelle face à l'homme, à la nouveauté et la séparation sociale. De même dans le cas de formation en génie biologique ou science de la vie, les étudiants ont participé à des projets mettant en œuvre des techniques de laboratoire les plus diverses possibles. C. Martinet (DUT, 2007) et M. Schmidt (L3) ont ainsi participé à des études de neuroanatomie par des approches d'immunohistochimie.

Pour les étudiants en stage de plus longues durées, je les accompagne dans la prise en charge d'un projet. Je les incite à réaliser des recherches bibliographiques, à participer à la réflexion sur le protocole, à réaliser l'analyse et l'interprétation des résultats. Quand les circonstances sont favorables, je les encourage à présenter leurs résultats lors de réunions.

Pour les étudiants de M2, j'essaie de leur donner un regard critique sur les données de la littérature et les données acquises. J'essaie de les motiver et d'attiser leur curiosité. Leur formation se concluant par la rédaction d'un mémoire et une soutenance, je les invite à entreprendre des recherches bibliographiques avant le début de leur stage afin de préparer un mémoire bibliographique.

L'encadrement de post-doctorants ne requière pas autant de cadre compte tenu de leur expérience doctorale. Toutefois, je pense qu'il peut être utile de rappeler les objectifs du projet et de proposer aux candidats de travailler en mode projet avec un calendrier précis. Ce cadre peut aider certains jeunes post-doctorants à faire la transition après le doctorat.

Plus récemment, dans le cadre du contrat de recherche avec l'IdRS et du projet EMOFARM, j'ai encadré trois techniciens de recherche en CDD (A. Gautier, 2010 ; H. Blanchon, 2011 ; F. Chevré, 2012). Après une période de formation, j'attends de ces personnels une autonomie dans la gestion et l'organisation des tâches. S'ils témoignent l'envie et l'intérêt d'analyser et d'interpréter les données qu'ils acquièrent, je les y encourage. Par ailleurs, je pense qu'il est crucial d'inciter les personnels en CDD à participer aux réunions scientifiques d'équipe et à la vie collective du laboratoire. Ces interactions sont indispensables à leur formation professionnelle et deviennent des atouts lors d'entretien de recrutement, comme j'ai pu le constater lors ma participation comme présidente de jury de concours de recrutement.

La formation

Depuis 2009, je participe à la formation de master II « Neurobiologie, Cognition et Développement » de l'université de Tours à raison de 3h par an. Cette année, après la refonte de la formation, je dispense un enseignement de 4h « Comportements sociaux, apprentissages et émotions chez les animaux et dispense un cours sur la neurobiologie des émotions » du M2 « Cognition, Neurosciences et

Psychologie ». Cette formation rassemble des étudiants de cursus très différents : linguistique, psychologie et éthologie. Le public est composé d'orthophonistes, de médecins (interne en psychologie) et d'étudiants issus de M1 d'éco-éthologie. J'ai bâti mon intervention avec une introduction théorique qui permet de donner quelques définitions et concepts sur les émotions. Depuis cette année, j'ai introduit la présentation des approches d'études en neurobiologie compte tenu de la diversité de l'auditoire.

Dans le cadre de l'accueil d'étudiants d'AgroParisTech (organisation C. Arnould et C. Duvaud-Ponter), je propose un cours et une visite du laboratoire afin de présenter les approches complémentaires utilisées pour étudier la neurobiologie des comportements.

Activités d'expertise :

Je suis membre de la commission nationale des enseignants-chercheurs relevant du Ministre chargé de l'Agriculture (section 1) depuis 2008. Membre nommé titulaire depuis 2012, j'ai été élue assesseur en 2012. Je suis sollicitée pour reviewer des articles : *Neuroscience Letter* (2012), *Neuroimage* (2010) et *Animal* (2009, 2012).

J'ai présidé le jury de recrutement par concours externe de deux techniciens de recherche en 2012.

La vulgarisation scientifique

J'attache une grande importance à cette part de mon activité de recherche. Je participe régulièrement à l'accueil de lycéens ou de groupes grand-public (administratifs INRA par exemple) afin de présenter nos activités de recherche et nos métiers.

La semaine du cerveau est une manifestation internationale qui a pour objectifs de promouvoir les études sur le cerveau auprès de la société. Cette manifestation soutenue par différentes associations, fondations et sociétés savantes (DANA, société des neurosciences...) consiste en l'organisation de conférences grand public et des rencontres thématiques (café science, rencontre littéraire...). A Tours, cette manifestation est organisée et coordonnée par Y. Tillet. J'y participe depuis 2004.

En 2007, je me suis investie dans cet évènement en proposant des interventions auprès d'écoliers et de lycéens. En école primaire, je présente le cerveau par une courte présentation théorique, des manipulations (dissection d'encéphales porcins, observations microscopiques) et des activités ludiques (fabrication de cerveau en pâte à modeler, simulation de la transmission électrique). En 2009, un partenariat initié par Y. Tillet et R. Rech, directeur des bibliothèques de Tours, a permis la réalisation des ateliers destinés aux enfants avec le secteur jeunesse des bibliothèques de Tours (B. Rouchon-Borie). Je coordonne les ateliers destinés aux enfants sur les temps d'accueil des bibliothèques destinés aux scolaires (CE1-CM2) et aux participants des ateliers d'arts plastiques (7-12 ans). Chaque séance dure environ deux heures et se déroule en deux temps. Le premier temps concerne le groupe entier, et consiste à donner quelques notions sur l'organisation et les fonctions du cerveau. Le deuxième temps concerne les ateliers thématiques auxquels tous les enfants participent par groupes de 5-6.



France

Student at Le Pommer Vert Primary School, Marray, France, solving a brain puzzle.

Image: E. Chailion

En 2010, nous sommes intervenus à la bibliothèque centrale de Tours. J'ai pris contact avec le muséum d'histoire naturelle d'Aix pour l'emprunt d'une exposition « Cerveau-réseau ». Avec la participation des ateliers de l'UMR-PRC, nous avons créé un jeu « électro-quizz » (deux planches de questions-réponses « à qui appartient ce cerveau ? » et « à quoi sert le cerveau ») et j'ai créé les autres ateliers : « dessiner et modeler le cerveau », « quand le cerveau nous trompe » (illusions optiques, reconnaissance olfactive avec incohérence visuelle), « observer le cerveau ».

En 2011, nous sommes intervenus à la bibliothèque La Rotonde située dans un quartier de zone d'éducation prioritaire de Tours. Sur le même principe qu'en 2010, j'ai construit les ateliers en support à l'exposition sur les 5 sens. Avec le concours des ateliers de l'UMR-PRC, nous avons créé des boîtes du toucher et ainsi proposé des ateliers sollicitant la vue, l'odorat, le toucher et l'ouïe.

En 2012, nous sommes intervenus à la médiathèque de Tours nord, en partenariat avec le secteur « adulte » qui a proposé une exposition sur la maladie d'Alzheimer. La difficulté pour trouver des expositions dédiées au cerveau et adaptées aux classes primaires m'a conduite à créer un jeu interactif sous forme de questions-réponses. En collaboration avec F. Vincent (informaticien du plateau d'imagerie cellulaire) et Y. Tillet nous avons développé une application informatique qui traite de l'ensemble des questions/réponses sur les bases d'organisation et de fonctionnement du cerveau. Les ateliers proposés à cette occasion ont permis d'aborder la mémoire, un atelier étant animé par l'équipe « mémoire et vieillissement » du Cerca, Tours (L. Taconnat).

En 2013, l'opération est reconduite en partenariat avec la bibliothèque du quartier des Fontaines.

Ces manifestations touchent, ainsi, chaque année 250 à plus de 300 enfants issus des différents quartiers tourangeaux. Nos interventions sont supervisées par Y. Tillet ou moi-même et un représentant de la bibliothèque d'accueil. Pour l'animation des différents ateliers (5 à 6 par session), nous sollicitons des étudiants en thèse qui s'initient ainsi à la vulgarisation scientifique. Leur participation a été validée par l'obtention d'ECTS jusqu'en 2012.

Cette activité est un moyen de présenter les métiers de la recherche à de jeunes enfants (et leurs accompagnateurs), de présenter les recherches menées à l'INRA (très souvent méconnues) et de transmettre des connaissances sur le fonctionnement du cerveau, peu abordé dans les programmes scolaires. Il me paraît crucial de communiquer sur le métier de chercheur, sur les pratiques scientifiques et de décrire le vaste panel des recherches menées en productions animales à l'INRA.

REFERENCES

- Adam et al. *J. Endocrinol.* (1997) 152:329-337
- Adam et Robinson *Proc. Nutr. Soc.* (1994) 23:89-102
- Albertson et al. *J. Chem. Neuroanat.* (2008) 35:326-333
- Antonopoulos et al. *J. Comp. Neurol.* (1987) 263:290-307
- Antonopoulos et al. *J. Hirnforsch.* (1989) 30:349-360
- Apple et al. *J Anim Sci* (1993) 71:71-77
- Bandler et Shipley *TINS* (1994) 17:379-389
- Barker-Gibb and Clarke *Neuroendocrinol.* (1996) 64:194-207
- Behbehani *Progress in neurobiology* (1995) 46:575-605
- Bernadis and Bellinger *Brain Res.* (1987) 434:321-381
- Berridge et al. *Brain and Cognition* (2003) 52:106-128
- Berthoud et Neuhuber *Aut. Neurosci. Bas. Clin.* (2000) 85:1-17
- Bittman et Weaver *Biol. Reprod.* (1990) 43:986-993
- Bobek et al. *J. Vet. Med.* (1986) 33:698-705
- Boissy et Dumont *Appl Anim. Behav. Sci.* (2002) 79:233-245
- Bousslama et al. *Neuroscience* (2007) 150:712-719
- Brown, RND (1994) 34:89-114
- Bueno and Riviere *RND* (1987) 27:157-169
- Cataldi et al. *Neurosci. Lett.* (1994) 178:103-106
- Clarke et al. *Endocrinol.* (2005) 146:769-775
- Claustrat et al. *Sleep Med. Rev.* (2005) 9:11-24.
- Cogé et al. *Br. J. Pharmacol.* (2009) 158:1248-1262
- Cook *J. Neurosci. Meth.* (2001) 110:95-101
- Cook *Physiol. Behav.* (2002) 75:455-464
- Crown et al., *Neuroendocrinology* (2007) 86 :175-182
- Da Costa et al. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (2004) 271:2077-2084
- Dantzer *Les émotions. Que sais-je ?* 2002
- Della-Fera and Baile, *Ann. Rech. Vet.* (1979) 10:234-236
- Detanico et al. *Eur. J. Pharmacol.* (2009) 607:121-125
- Dufourny et Skinner, *Brain Res* (2005) 1054:73-81
- Fisher et Matthews *Social Behaviour of Sheep.* (2001)
- Fodor et al. *J. Chem. Neuroanat.* (1997) 12:175-182
- Frisch *Hum. Reprod.* (1987) 2:521-533
- l'Anson et al. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* (1991) 13:239-311
- Guerrero and Reiter, *Curr. Top. Med. Chem.* (2002) 2: 167-179.
- Karakas et al. *Behav. Brain Res.* (2011) 222:141-150
- Keay et Bandler *Neurosci. Biobehav. Rev.* (2001) 25:669-678
- Keay and Bandler. *The rat nervous system.* 3rd Ed. (2004) 243-257
- Kirouac, *Les émotions.* Presses Univ. Québec (1989)
- Konakchieva et al. *Neuroendocrinol.* (1998) 67:171-180
- Krukoff *Neuromethods* (1998) 33:213-229
- Lepionka et al. *RND* (1997) 37:449-457
- Lévy et al. *J. Chem. Neuroanat.* (1999) 16:245-263
- Linnman et al. *Neuroimage* (2012) 60:505-522
- Manteca et Deag *Appl. Anim. Behav. Sci.* (1993) 37:265-270
- Matthews et al. *J. Mol. Endocrinol.* (1993) 11:181-189
- McShane et al. *Biol. Reprod.* (1993) 49:831-839
- Min et al. *Neuroimage* (2012) 63:1408-1420
- Murone et al., *J. Comp. Neurol.* (1997) 381:203-218
- Niezgoda et al. *J. Vet. Med.* (1987) 34:734-739
- Paull et al., *Peptides* (1982) 1:183-191
- Porter et al., *J. Neuroendocrinol.* (1993) 5:163-174
- Price et Drevets *Trends Cogn. Neurosci.* (2010) 16:61-71
- Qi et al., *Neuroendocrinology* (2008) 87 :91-112
- Risold et Swanson *Brain Res. Rev.* (1997) 24:115-195
- Schachinger et al. *Horm. Behav.* (2008) 54:258-262
- Scott et al., *Neuroscience Letters* (1998) 241:29-32
- Scott et al., *Biol. Reprod.* (2003) 68:1119-1133
- Thomas et al. *Endocrinol.* (1990) 126:1361-1367
- Tillet et al. *J. Chem. Neuroanat.* (2000) 19:47-67
- Tillet et al., *J. Chem. Neuroanat.* (2012) 43:14-19
- Tillet et Kitahama *Histol. Histopathol.* (1998) 13:1163-1177
- Tillet, *Reprod. Fertil.* (1995) 49:199-220
- Tourlet et al., *J. Neuroendocrinol.* (2005) 17: 145-151
- Tugyan et al. *Neurosci. Lett.* (2006) 398:145-150
- Turner et al. *Neuroendocrino.* (2002) 76:373-380
- Vellucci et Parrott *Exp. Physiol.* (1994) 79:241
- Wang et al. *Jpn J. Pharmacol.* (1999) 81:29-33
- Wilhelmsen et al. *J. Pineal Res.* (2011) 51:270-277
- Wu et al. *J. Comp. Neurol.* (2006) 499:897-910