



HAL
open science

Rôle de la plasticité comportementale dans l'adaptation aux variations nutritionnelles chez un primate malgache

Nicolas Villain

► **To cite this version:**

Nicolas Villain. Rôle de la plasticité comportementale dans l'adaptation aux variations nutritionnelles chez un primate malgache. Biologie animale. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2017. Français. NNT : 2017MNHN0006 . tel-01717592

HAL Id: tel-01717592

<https://theses.hal.science/tel-01717592>

Submitted on 26 Feb 2018

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.

Remerciements

J'avais attendu ce moment pendant trois ans. Et pourtant, confronté à cette page blanche, une seule certitude m'habite, celle de ne pouvoir entièrement exprimer ce que je ressens. Tenter de décrire ces trois dernières années serait leur ôter leur complexité, leur beauté et ne serait probablement pas représentatif de ce qu'est une thèse. Au risque de tomber dans ce piège, je vais cependant me risquer à une courte analogie. Sportif amateur, coach dans mon temps libre, j'ai pu, au cours des trois dernières années faire de nombreux parallèles entre la pratique sportive et la réalisation d'un travail de thèse. Comme pour le sport, j'ai appris qu'il fallait penser à long terme, planifier, tout en sachant que tout pouvait être remis en cause, ne pas en faire trop, trop vite au risque de plier sous la charge... Durant la longue préparation de cette thèse, il y aura eu des doutes, des mauvaises chutes et il aura fallu trouver les ressources pour se remettre en selle, retrouver le goût de l'effort et tendre vers le but du doctorant : la soutenance. La soutenance, telle la compétition, mettra en lumière les longs mois d'efforts anonymes endurés lors de l'entraînement et la fierté de franchir la ligne d'arrivée. Le doctorant devient Docteur comme le sportif arbore fièrement son T-shirt de *finisher*. Comme pour une performance sportive, la réussite d'une thèse repose sur un entourage solide qui, tels des coaches, des équipiers, des conseillers techniques, des supporters... vous poussent à dépasser vos limites et atteindre votre but. Mes remerciements vont donc à toutes ces personnes qui m'ont soutenues au cours de ces trois dernières années.

Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de thèse, aux membres du jury ainsi qu'aux membres de mon comité de thèse :

Fabienne Aujard, merci pour l'opportunité que vous m'avez offerte en élaborant cette thèse et en me recrutant. Merci pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre unité de recherche. Merci pour l'aide que vous m'avez apportée et pour les conseils qui ont rendu ce travail meilleur.

Fabien Pifferi, merci pour tout ! Merci d'avoir pris le temps de comprendre qui j'étais et comment je fonctionnais pour obtenir plus que je ne pensais pouvoir donner. Tu

m'as accordé la liberté dont j'avais besoin et soutenu dans mes choix. Tu m'as permis d'avancer professionnellement et personnellement au cours des trois dernières années. Malgré ce rôle d'encadrant tu as su rester proche quand, pendant les pauses, nous plaisantions sur l'avancement de ces travaux, ma culture cinématographique, mon goût pour le bitume. Merci encore pour ces trois années.

Marie-Stéphanie Clerget-Froidevaux, Marina Bentivoglio, Stéphane Blanc, Claire Rampon, merci d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse. Je suis honoré de pouvoir bénéficier de votre expertise et de vos conseils. Merci pour le temps que vous avez accepté de consacrer à l'évaluation de mes recherches.

Jérémy Terrien, merci pour ton aide, pour le temps que tu m'as accordé en prenant part à mon comité de thèse. Tu as toujours su te montrer disponible pour répondre à mes interrogations. Merci pour tes conseils et tes remarques au cours de ces 3 ans, et ta bienveillance, quand, par deux fois, j'ai vidé les bouteilles de gaz du respiromètre ! Ton aide m'a permis de d'améliorer la qualité de mes travaux et je t'en remercie.

Jean-Luc Picq, merci beaucoup pour votre apport à ce travail. Vous m'avez initié à la tâche de discrimination qui a été centrale dans ce travail. Merci de m'avoir proposé un poste de chargé de cours au sein de l'Université Paris 8. J'ai beaucoup appris à vos côtés. Sans vous ce travail ne serait certainement pas le même.

Laure Rondi-Reig, merci beaucoup pour vos différentes remarques qui ont pu faire avancer ce projet. Vous m'avez fait bénéficier de votre expertise lors des différents comités de thèse et je vous en remercie.

Mes remerciements vont également aux autres membres de l'équipe dont j'ai porté les couleurs ces trois dernières saisons, les membres de l'UMR CNRS-MNHN 7179 et plus particulièrement l'équipe Bioadapt :

Marc Théry, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe. Merci de votre intérêt pour ce travail. Merci pour les moyens que vous avez mis à ma disposition pour que ce travail s'effectue dans les meilleures conditions possibles.

Martine Perret, merci pour votre aide au cours de ce travail. Vous avez toujours su trouver des animaux disponibles pour que je puisse le réaliser dans de bonnes conditions. Merci pour vos remarques, vos anecdotes et finalement merci pour vos délicieux gâteaux qui ont bien souvent eu raison de mon régime.

Pierre-Yves Henry, Jacques Epelbaum, Caroline Gilbert, Loic Desquilbet, Anisur Rahman, merci pour votre aide et votre présence durant ces trois années. Merci de votre intérêt pour ce travail.

Thomas Le Tallec, mon co-équipier, mon coloc'. Nous étions collègues, *sparing-partners*, colocataires, et nous sommes restés amis. Nous avons tellement partagé que ce soit au bureau, à la salle, à la piscine ou dans le salon quand nous regardions les pires programmes téléés en mangeant un kebab. Je te remercie pour tous ces moments, pour ton aide, ton soutien. Tu as été mon prédécesseur, tu m'as formé, et moi tel un petit frère j'admirais ta culture, ton calme, ta capacité à travailler... Je te souhaite le meilleur, professionnellement et personnellement pour les années à venir. Quand je vois la personne que tu es, j'ai confiance dans la formation des générations futures.

Manon Ghislain, ma collègue préférée. Ce court paragraphe ne suffira certainement pas à évoquer les très nombreux souvenirs que nous avons bâtis ensemble ces trois dernières années. Je me souviendrai des pauses thé de 16h, des kilos de chocolat Lindt, des (trop) nombreux mojitos, des soirées Walking Dead. Mais aussi des nombreuses conversations dans le bureau des étudiants, où, chacun derrière son écran nous nous remontions ensemble le moral. Tu finis ta thèse et, comme moi, tu la soutiendras début 2017. Tu sais à quel point les gens qui nous entourent sont importants dans cette aventure. Je te remercie pour tout. Tu mérites de réaliser tes rêves et même plus.

Je remercie **Julie Landes, Laureline Chaise, Pauline Thomas, Laurianne Dezaire, Romain Provost, Julien Laignel, Julia Marchal, Pauline Vuarin, Solène Languille**. Merci à toutes et tous d'avoir partagé ces trois ans dans la région parisienne. Que ce soit au labo lors des "*journal club*", expériences, séminaires et autres pauses café/midi, ou lors de soirées film/sushi/mojito à Brunoy ou resto à

Paris. Vous avez toujours su me faire garder le sourire et m'accompagner. Je vous en remercie.

Fathia Djelti, Delphine Champeval, Isabelle Hardy, merci à vous trois pour tous les moments que nous avons partagés au Restrikal, ou lors de la pause midi. Vous avez été d'une gentillesse extrême durant ces trois ans et je vous en remercie.

Eric Gueton, merci pour tout ce que tu as fait pour moi pendant ces 3 ans. Plus que le travail, ce sont sûrement les soirées console ou nos longues discussions qui me resteront en mémoire. Merci pour les nombreuses photos que tu m'as envoyé. Tu es quelqu'un de vrai, quelqu'un de passionné. Je suis persuadé que tu réaliseras les rêves dont tu m'as parlé.

Manuela Da Fonseca, Nadine Desplanques, Yamso Sekpon, merci pour votre aide dans les nombreuses formalités administratives. Bien souvent, vous m'avez été d'un grand secours lorsque, trop occupé, je réalisais les démarches dans l'urgence. Votre bonne humeur communicative m'aidait grandement dans ces moments de stress administratif.

Julie Royo, Sophie Dupont, Céline Brunel, merci pour votre aide. Vos longues heures de stage sur les tests cognitifs, les suivis métaboliques, les coupes de cerveau... ont contribué à la réussite de ce travail et je vous en remercie. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également **Sandrine Gondor, Didier Lavoine, Pacal Delpy, Céryl Técher, Justin Thomas, Marielle Peroz, Khaldia Akkari, Bernadette Lesenfans, Pierre Fiquet, Nathalie Becker** et tous les personnels du site de Brunoy pour leur aide, votre bonne humeur et nos nombreux moments partagés au cours des trois dernières années.

Un grand merci aux **collègues du BDEM et du comité d'organisation du 3^{ème} YNHM**. Vous êtes malheureusement trop nombreux à citer individuellement mais je vous remercie tous. Pour la majorité d'entre vous, vous savez ce que mener un projet de thèse veut dire. Je vous souhaite plein de réussite dans vos projets.

Je tenais également à remercier certains de mes anciens professeurs qui m'ont amenés à être présent aujourd'hui :

Mr. Simon professeur d'EPS au collège, **Mme Aka** professeur de mathématiques au lycée, **Mme Michel** professeur de mathématiques en classe préparatoire. Quand je repense à mes nombreuses années d'études, ce sont vos trois noms qui me reviennent en tête. Vous avez su me donner le goût de l'effort, physique ou intellectuel, sans en enlever le plaisir, ce qui m'a conduit là où j'en suis aujourd'hui. Pour cela je tenais à vous remercier chaleureusement.

Mr. Plantegenest enseignant chercheur en écologie à Agrocampus-Ouest, les **Pr. Whiting** et **Roulin** respectivement de l'Université Macquarie de Sydney et de l'Université de Lausanne. Vous m'avez initié à la recherche en écologie comportementale à l'occasion de cours et de stages qui m'ont permis d'envisager de démarrer ce projet de thèse. Merci beaucoup.

La thèse étant une aventure professionnelle mais aussi personnelle (Le Tallec, 2015), la distinction vie privée/travail est souvent compliquée. C'est pourquoi je voulais aussi remercier tous les amis, camarades, coéquipiers d'ici ou d'ailleurs :

Juliette Di Francesco, que ce soit à Reims, à Alfort, ou plus récemment à Calgary, nous avons toujours su garder contact et, bien que nous ne nous voyions que rarement, nous nous retrouvons à chaque fois comme si nous nous étions vu la veille. Après plusieurs années à être en retard, c'est à mon tour d'être en tête et de te soutenir alors que tu entames ta thèse. Merci pour ton soutien pendant toutes ces années.

Un grand merci au banc de moules de Rennes et ceux qui s'y sont rajoutés avec la marée : **Julie, Victor, Luc, Astrid, Caroline, Jean, Caroline, Matthieu, Audrey, Maxime, Anna, Lucas, Yolaine, Bérengère, Paul, François, Martin, Louise, Antoine, Pauline, Marion, Gabriel, Emile, Charlotte**, et j'en oublie sûrement. Que des bons moments partagés depuis l'agro de Rennes. Même éparpillés aux quatre coins de la France nous avons toujours su rester proches et je sais que nous le

resterons toujours, telles les moules collées les unes aux autres sur les rochers des côtes. Merci pour votre aide, votre soutien, qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Les compères des week-ends du renard : **Matthieu Merceron, Elliott Commissaire, Adrien de Vulpillières**. Merci pour tout. Matthieu, même perdus de vue pendant un certain temps, rien n'avait changé quand nous nous sommes retrouvés. Merci pour les séjours passés et à venir sur Vannes, merci pour ton dynamisme merci pour ta joie de vivre, merci pour ton soutien. Tu me fais regagner confiance en moi dans les moments difficiles. Elliott, merci pour ces nombreuses soirées dans Paris, merci pour les discussions, merci pour ton aide et ton soutien lors de la rédaction. On se refera le semi de Boulogne en 1h25 cette fois ci. Adrien, merci pour ton soutien. Je suis persuadé que nous partagerons encore beaucoup de bons moments.

Aurélie Guerin, mon soutien moral. Impossible pour moi de te remercier assez pour ton aide ces dernières semaines. Tu as été présente pour le plus éprouvant. Tous les jours tu m'auras interrogé sur l'avancement du manuscrit, tous les jours tu auras cherché à savoir comment j'allais, tous les jours tu m'auras apporté ton soutien moral. Merci pour les dégustations de thés, les quiches revisitées, les discussions canap'. Merci pour tout.

Thomas Loirat, l'autre coloc'. Un grand merci pour ton esprit malin, ta gentillesse. Nous n'aurons partagé que quelques semaines de colocations mais elles auront généré une grande quantité de souvenirs. Merci pour ces moments de joie et de délires qui m'ont permis de m'évader.

Un grand merci à mes amis sportifs. A mes coéquipiers du Club Yerrois de Triathlon 91. Je ne pourrais pas citer les 90 membres du club mais je voulais tous vous remercier. Un merci particulier au bureau : **Lydie Humery, Laurent Humery, Bruno Clement** et **Fabrice Tinat** vous m'avez accordé votre confiance et m'avez permis d'obtenir mon BF5 pour participer à l'encadrement au sein du club. Merci à **Lucas Handelberg**, merci pour ta gentillesse, merci de m'avoir permis de venir encadrer les stages ETC dans le sud au printemps, j'en garderai toujours un très bon souvenir. Merci à tous les autres membres du CYT pour votre bonne humeur lors de nos sorties vélo ou des séances au stade. Merci également à **Guy Hemmerlin**, mon

coach. Merci d'avoir su adapter la préparation de mes objectifs sportifs en prenant en compte ce travail de thèse. Merci de m'avoir accordé ta confiance, d'avoir cru en moi. Par le sport je pense avoir réussi à trouver un équilibre qui m'a permis de mener ce travail à son terme.

Voici venu le temps des derniers remerciements. En anglais nous aurions dit "Last but not least". Cette formulation "derniers mais pas des moindres" résume assez bien les personnes que je voulais remercier ici : ma famille car sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui.

Monique et **Didier Villain**, mes parents. Comment vous remercier assez, vous qui m'avez, à tout moment fait passer avant vous. Vous n'avez pas un seul moment hésité à faire des sacrifices pour que je puisse poursuivre mes rêves. Même si nous ne sommes pas toujours d'accord vous acceptez mes choix, et m'encouragez à poursuivre dans la voie que j'ai choisie. Vous me relevez lors de mes chutes, vous m'empêchez d'abandonner. Je vous dois beaucoup, tout même. Si je suis ici aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci pour votre soutien au quotidien sans lequel, rien n'aurait été possible. Vous êtes des modèles pour moi et j'espère pouvoir être aussi bon parent que vous l'êtes.

Merci aux Fluffy's : **Pauline Villain** alias Senior Fluffy, **Mathilde Villain** alias Fluffy Kriff et **Pierre-Baptiste Villain** alias Giant Fluffy. Vous êtes des frères et sœurs géniaux. Merci d'avoir été là au quotidien dans le bons comme les mauvais moments. Je vous dois beaucoup.

Un grand merci à mes **grands parents**, ici ou là haut, pour m'avoir toujours poussé à faire ce dont j'avais envie.

Joëlle et **Serge Lacourt**, merci pour votre temps, merci pour votre gentillesse. Vous avez toujours été là pour me rendre service. Merci de vous être régulièrement intéressés à l'avancement de ce travail. Merci pour votre aide.

Curriculum vitae

Liste des productions scientifiques

Articles liés à la thèse

Articles publiés :

Picq J-L, Villain N, Gary C, Pifferi F, Dhenain M (2015) Jumping Stand Apparatus Reveals Rapidly Specific Age-Related Cognitive Impairments in Mouse Lemur Primates. PLoS ONE 10(12)

Villain N, Picq JL, Aujard F, Pifferi F. Body mass loss correlates with cognitive performance in primates under acute caloric restriction conditions. Behavioural Brain Research. 2016 May 15;305:157-63

Article en préparation :

Villain N, Aujard F, Pifferi F. Link between body condition and circadian rhythms in a primate under acute caloric restriction. Chronobiology International.

Autres articles (M1, M2):

Dreiss A.N., Séchaud R., Béziers P., Villain N., Genoud M., Almasi B., Jenni L., Roulin A., 2016. Social huddling and physiological thermoregulation are related to melanism in the nocturnal barn owl. *Oecologia* 180(2) pp. 371-381.

Participation à des congrès

Présentations orales :

11ème congrès Ecology and Behaviour, Toulouse (17-21 mai 2015). Impact of a short-term caloric restriction on learning and memory in a small Malagasy primate. Villain N., Pifferi F., Aujard F.

3ème congrès YNHM (Young Natural History scientists Meeting), Paris (2-6 février 2016). Costly cognitive processes in a context of low food availability: Learning and memory in a small Malagasy primate facing sudden drop in available energy. Villain N., Pifferi F., Aujard F.

Présentations affichées :

44ème congrès de la Société Francophone de Chronobiologie à Paris (29-31 octobre 2014). Impact d'une restriction calorique aigüe sur la synchronisation de l'horloge biologique en tant que marqueur de la plasticité comportementale innée chez un primate nocturne. **Villain N.**, Pifferi F., Aujard F.

10ème Forum de la Société Européenne des Neurosciences à Copenhague (2-6 Juillet 2016). Link between body condition and cognitive performances in a primate under acute caloric restriction. **Villain N.**, Picq J.L., Pifferi F., Aujard F

Prix et bourses

Bourse de voyage de la **Société Française de Neurosciences** pour participer au 10ème Forum de la Société Européenne des Neurosciences à Copenhague (2-6 Juillet 2016)

Enseignements et encadrement de stage

Chargé de cours en deuxième année de **licence de psychologie** à l'Université de Paris 8 intitulé : "Système nerveux et fonctions sensori-motrices" (2012-1025, 30h/an).

Master 1 :

Co-encadrement Sophie Dupont (Université de Paris Sud). 29 novembre 2014 - 16 janvier 2015. Effet d'une restriction calorique aigüe sur les capacités cognitives des microcèbes. Augmentation de l'effectif de l'expérience RC-Cog.

Co-encadrement Julie Royo (Université de Paris Sud). 30 mars 2015 - 5 juin 2015. Effet d'une restriction calorique aigüe sur les capacités de resynchronisation des individus sur une alternance lumière-obscurité après un décalage horaire. Augmentation de l'effectif de l'expérience de RC-Chrono. Mise en place du suivi métabolique à l'aide du respiromètre.

Master 2 :

Co-encadrement Lucie Ramage (Ecole vétérinaire de Nantes). 5 janvier 2015 - 5 juin 2015. Effet de variations qualitatives et quantitatives de l'apport nutritionnel sur les capacités cognitives métaboliques et locomotrices des microcèbes. Tests cognitifs après six mois de supplémentation en AGPI n-3. Augmentation de l'effectif de l'expérience RC-Cog. Suivi métabolique à l'aide de mesures de la glycémie et de la cétonémie.

Autres expériences scientifiques

Responsable étudiants étrangers/bourses de voyage, gestion du secrétariat et membre du comité scientifique de la session biodiversité pour le comité d'organisation du **3ème YNHM (Young Natural History scientists Meeting)**, congrès international pour jeunes chercheurs en sciences naturelles. Gestion de la partie internationale du projet. Mise en place d'une grille d'évaluation des candidatures pour les bourses de voyage, classement de candidatures. Secrétariat international, aide aux formalités administratives

Actions de vulgarisation

Participation aux sélections et à la finale Sorbonne Universités pour le concours de vulgarisation **Ma thèse en 180 secondes " MT180s"**. Formation à la vulgarisation scientifique et aux techniques de présentation et d'expression orale.

Coréalisation d'un court métrage de vulgarisation scientifique sur les maladies neuro-dégénératives dans le cadre du festival "**Les chercheurs font leur cinéma**". Différentes formations sur les techniques audiovisuelles (scénario, montage, animation ...).

http://www.dailymotion.com/video/x3gwnvh_le-temps-nous-est-compte_shortfilms

Liste des abréviations

AGPI n-3 : Acides gras polyinsaturés de type oméga 3

ALA : Acide α -linoléinique

AMPA : Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BrdU : Bromodésoxyuridine

Ca²⁺ : Ion calcium

CTL : Contrôle

DG : Dentate gyrus (Gyrus denté)

DHA : Acide docosahexaénoïque

EPA : Acide eicosapentaénoïque

GLUT : Transporteur de glucose

LTP : Long term potentiation (Potentialisation à long terme)

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NSC : Neural stem cell (Cellule souche neurale)

OB : Olfactory bulb (Bulbe olfactif)

RC : Restriction calorique

RER : Respiratory exchange rate (quotient respiratoire)

RMS : Rostro migratory stream (Courant rostro-migratoire)

SVZ : Sub-ventricular zone (Zone sous ventriculaire)

VGCC : Voltage gated calcium channels (Canaux calciques voltages dépendants)

Liste des figures

Figure 1 : Organisation des réseaux neuronaux pour les deux types de plasticité comportementale.

Figure 2 : Mécanismes et zones principales de la neurogenèse chez le mammifère adulte.

Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'horloge biologique interne chez les mammifères montrant les interactions entre les différents oscillateurs et les indices environnementaux permettant la synchronisation pour une adaptation optimale.

Figure 4 : Mécanismes moléculaires permettant la plasticité synaptique.

Figure 5 : Schéma des interactions entre modifications alimentaires et oscillateurs de l'horloge biologique interne chez les mammifères.

Figure 6 : Voies de synthèse des différents acides gras polyinsaturés à longues chaînes au sein des différents organismes vivants.

Figure 7 : Les trois principaux acides gras de la famille des AGPI n-3

Figure 8 : Arbre phylogénétique du genre *Microcebus* obtenu par analyse d'ADN mitochondrial.

Figure 9 : Microcèbes adulte (environ 2 ans) et âgé (>10 ans) montrant les caractéristiques morphologiques typiques de l'espèce

Figure 10 : Aire de répartition du microcèbe gris sur l'île de Madagascar.

Figure 11 : Evolution de la disponibilité alimentaire au cours de l'année à Madagascar.

Figure 12 : Taille et superposition des domaines vitaux de différents individus adultes des deux sexes.

Figure 13 : Photographie d'un groupe de sommeil regroupé au sein d'un nichoir dans la colonie de Brunoy.

Figure 14 : Représentation du rythme circadien de la température corporelle et de l'activité locomotrice spontanée d'un microcèbe en période de jours courts.

Figure 15 : Photographie de deux individus mâles en hiver et en été présentant un phénotype typique saisonnier avec des réserves de graisse et des testicules atrophiés pour l'individu en hiver.

Figure 16 : Activité des individus mâles et femelles lors de la saison sèche.

Figure 17 : Fréquence d'utilisation des sites relocalisés d'une nuit à l'autre en fonction du fait que la ressource consommée sur le site soit stationnaire ou non.

Figure 18 : Exemple d'itinéraire pour un individu lors de sa recherche de ressource alimentaire.

Figure 19 : Calendrier expérimental de la manipulation expérimentale : Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale innée.

Figure 20 : Calendrier expérimental de la manipulation expérimentale : Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale acquise.

Figure 21 : Dispositif de discrimination visuelle adapté au microcèbe.

Figure 22 : Dispositif expérimental de test de coordination motrice et d'endurance : Rotarod[®].

Figure 23 : Schéma simplifié de l'enceinte permettant le test d'openfield.

Figure 24 : Evolution de la masse corporelle normalisée des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire.

Figure 25 : Activité locomotrice moyenne des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire.

Figure 26 : Onset moyen des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire.

Figure 27 : Actogrammes représentatifs des réactions comportementales (activité locomotrice volontaire) des individus CTL, des individus RC synchronisés sur le cycle lumineux et des individus RC non synchronisés sur le cycle lumineux.

Figure 28 : Nombre d'événements de torpeur des individus CTL et RC avant et après le décalage horaire

Figure 29 : Durée journalière moyenne des événements de torpeur des individus CTL et RC avant et après le décalage horaire.

Figure 30 : Evolution de la température corporelle minimale journalière des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire.

Figure 31 : Profils de température corporelle représentatifs des individus RC non synchronisés sur le cycle lumineux, des individus RC synchronisés sur le cycle lumineux et des individus CTL.

Figure 32 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée et onset pour les individus RC après le décalage horaire.

Figure 33 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée et nombre d'événements de torpeur pour les individus RC avant et après le décalage horaire.

Figure 34 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée et durée journalière moyenne de torpeur pour les individus RC avant et après le décalage horaire.

Figure 35 : Consommation d'oxygène moyenne d'individus CTL et RC au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité et une phase de lumière.

Figure 36 : Quotient respiratoire moyen d'individus CTL et RC au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité et une phase de lumière.

Figure 37 : Evolution de la masse corporelle normalisée des individus CTL et RC au cours des 19 jours de traitement alimentaire.

Figure 38 : Temps passé sur le Rotarod pour les groupes CTL et RC avant et après le traitement alimentaire.

Figure 39 : Métabolisme basal des individus des groupes CTL et RC avant et après le traitement alimentaire.

Figure 40 : Evolution de la glycémie à jeun des individus CTL et RC au cours des 19 jours de traitement alimentaire.

Figure 41 : Nombre d'essais effectués à la fin du test pour les individus des groupes CTL et RC au cours des apprentissages 1 et 2 et du test de mémoire.

Figure 42 : Taux de réussite pour les individus des groupes CTL et RC au cours des apprentissages 1 et 2 et du test de mémoire.

Figure 43 : Corrélation entre perte de masse corporelle normalisée au jour du test et taux de réussite lors de tests de discrimination visuelle pour les individus RC.

Figure 44 : Taux de réussite lors de tests de discrimination visuelle pour les individus CTL et AGPI n-3 au cours des 18 mois de traitement alimentaire.

Figure 45 : Nombre de refus lors de tests de discrimination visuelle pour les individus CTL et AGPI n-3 au cours des 18 mois de traitement alimentaire.

Figure 46 : Distance parcourue et temps en mouvement dans le dispositif du test d'openfield des individus CTL et AGPI n-3 avant, après 6 mois et après 18 mois de traitement alimentaire.

Figure 47 : Latence au premier mouvement dans le dispositif du test d'openfield des individus CTL et AGPI n-3 avant, après 6 mois et après 18 mois de traitement alimentaire.

Figure 48 : Exemples caractéristiques d'image d'immunohistochimie réalisées sur les différentes zones cérébrales (amygdale, bulbe olfactif, gyrus denté et zone sous-ventriculaire).

Figure 49 : Rapport neurones en division sur neurones totaux dans différentes zones du cerveau chez des individus CTL et AGPI n-3.

Figure 50 : Temps passé sur le Rotarod pour les individus CTL et AGPI n-3 avant et après 6 mois de traitement alimentaire.

Figure 51 : Corrélations entre perte de masse normalisée et Onset d'activité locomotrice après un décalage horaire/Taux de réussite à un test de mémoire de discrimination visuelle présentant le seuil de perte de masse de 20% discriminant dans le classement des individus RC suivant leur réponse à la restriction.

Figure 52 : Quotient respiratoire moyen d'individus CTL et RC au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité et une phase de lumière et présentant les seuils correspondants à l'utilisation de différents substrats.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition du régime expérimental.

Tableau 2 : Masse corporelle normalisée moyenne des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire.

Tableau 3 : Onset moyen des individus CTL et RC durant les 14 jours de traitement alimentaire.

Tableau 4 : Température minimale moyenne des individus CTL et RC durant les 14 jours de traitement alimentaire.

Tableau 5 : Masse corporelle normalisée moyenne des individus CTL et RC au cours des 19 jours de traitement.

Tableau 6 : Mesures de glycémie pour les individus CTL et RC.

Tableau 7 : Composition détaillée des phospholipides plasmatiques des individus CTL et AGPI n-3 après 18 mois de supplémentation.

Sommaire

I. Introduction générale	1
I.A. Cerveau et comportement	2
I.A.1. Structure, rôle et fonctionnement du système nerveux central	2
I.A.2. Coûts énergétiques et métabolisme cérébral	3
I.B. Adaptation à l'environnement par le comportement	4
I.B.1. Plasticité comportementale	5
I.B.2. Horloge biologique et rythmes circadiens	10
I.B.3. Fonctions cognitives, apprentissage et mémoire	12
I.C. Modifications alimentaires	17
I.C.1. Restriction calorique	18
I.C.1.a. Effets physiologiques et cellulaires de la RC	18
I.C.1.b. Effets de la RC sur l'horloge biologique	20
I.C.1.c. Effets de la RC sur les capacités cognitives	22
I.C.2. Les AGPI n-3	24
I.C.2.a. Description et rôles des AGPI n-3	24
I.C.2.b. Effets physiologiques et cellulaires des AGPI n-3	27
I.C.2.c. Effets cognitifs et comportementaux des AGPI n-3	29
I.E. Modèle d'étude : le microcèbe gris	31
I.E.1. Phylogénie et classification	32
I.E.2. Caractéristiques morphologiques	32
I.E.3. Distribution spatiale et caractéristiques de l'habitat	33
I.E.4. Ecologie	35
I.E.4.a. Ressources alimentaires	35
I.E.4.b. Organisation sociale et reproduction	36
I.E.4.c. Rythmes circadiens et saisonniers	37
I.E.4.d. Importances des capacités cognitives en nature	41
II. Objectif et démarche expérimentale	43
III. Matériel et méthodes	46
III.A. Remarque éthique	47

III.B. L'Elevage de microcèbes de Brunoy	47
III.C. Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale	47
III.C.1. Protocole alimentaire	47
III.C.2. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (Etude RC-Chrono)	48
III.C.2.a. Démarche expérimentale	48
III.C.2.b. Mesure de l'activité locomotrice et de la température : Télémétrie	50
III.C.2.c. Suivi métabolique continu	51
III.C.2.d. Méthodes statistiques	51
III.C.3. Etude 2 : Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)	52
III.C.3.a. Démarche expérimentale	52
III.C.3.b. Test de discrimination visuelle	54
III.C.3.c. Mesure de coordination motrice et d'endurance : Rotarod®	58
III.C.3.d. Mesure du métabolisme basal	59
III.C.3.e. Mesure de la glycémie	59
III.C.3.f. Méthodes statistiques	59
III.D. Changement qualitatifs de l'alimentation à long terme et plasticité comportementale acquise - Supplémentation en AGPI n-3 et comportement	61
III.D.1. Sujets et conditions expérimentales	61
III.D.2. Intervention alimentaire	61
III.D.3. Démarche expérimentale	61
III.D.4. Test d'openfield	62
III.D.5. Analyse des lipides sanguins circulants	63
III.D.6. Mesure de la neurogenèse	64
III.D.6.a. Préparation des coupes et coloration	64
III.D.6.b. Analyse des lames	65
III.D.7. Méthodes statistiques	65
I.V. Résultats	67
IV.A. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (RC-Chrono)	68
IV.A.1. Evolution de la masse corporelle	68
IV.A.2. Suivi télémétrique	69
IV.A.2.a. Evolution du comportement locomoteur spontané	69
IV.A.2.b. Evolution de la température corporelle	72
IV.A.3. Corrélations	76

IV.A.4. Suivi du métabolisme aérobie en continu	78
IV.B. Etude 2 : Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)	80
IV.B.1. Evolution de la masse corporelle	80
IV.B.2. Aptitudes physiques et métabolisme	81
IV.B.2.a. Coordination et endurance sur le test du Rotarod	81
IV.B.2.b. Suivi du métabolisme basal	82
IV.B.2.c. Suivi de la glycémie à jeun	83
IV.B.3. Evaluation et suivi des capacités cognitives	83
IV.C. Changement qualitatifs de l'alimentation à long terme et plasticité comportementale acquise - Supplémentation en AGPI n-3 et comportement	86
IV.C.1. Analyse des lipides sanguins circulants	86
IV.C.2. Tests comportementaux	88
IV.C.2.a. Evaluation et suivi des capacités cognitives	88
IV.C.2.b. Suivi des l'anxiété des individus	90
IV.C.3. Neurogenèse	92
IV.C.4. Rotarod	94
V. Discussion	96
V.A. Effets d'une restriction calorique sur la plasticité du comportement chez le microcèbe	97
V.A.1. Perte de masse corporelle et intensité de la restriction	97
V.A.2. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (RC-Chrono)	99
V.A.3. Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)	102
V.A.4. Perte de masse limite et perturbations du fonctionnement cérébral	106
V.B. Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la plasticité comportementale acquise du microcèbe	107
V.C. Capacités physiques, métabolisme et modifications alimentaires	112
V.D. Variation inter-individuelle, aspect motivationnel et autres biais lors des tests physiques et cognitifs	115
VI. Conclusion générale et Perspectives	118

Références bibliographiques	121
Annexes	150
Annexe 1 : Article sur l'étude RC-Cog publié dans la revue "Behavioural Brain Research".....	151
Annexe 2 : Article sur la méthode du test de discrimination visuelle publié dans la revue "PLOS One"	159

Introduction générale

I.A. Cerveau et comportement

I.A.1. Structure, rôle et fonctionnement du système nerveux central

Le système nerveux central est constitué de différents tissus mous protégés par des structures osseuses. Le cerveau est situé le plus en avant du système nerveux central. Il présente une structure similaire chez tous les vertébrés. Il est divisé en deux hémisphères cérébraux. De manière générale, les hémisphères cérébraux reçoivent des informations et contrôlent la partie controlatérale du corps. Le cerveau est organisé en différentes aires spécifiques dédiées spécifiquement au traitement d'informations motrices, sensorielles, visuelles ou auditives et d'aires associatives permettant le traitement d'informations de nature différente. Le système nerveux central est composé principalement de deux types de cellules. Les premières sont des cellules excitables qui permettent le traitement et la transmission de l'information. Ces cellules appelées neurones, sont composées d'un corps cellulaire permettant la survie de la cellule et l'intégration des messages reçus et d'extensions cellulaires permettant les communications avec les autres cellules au niveau de structures appelées synapses. Ces extensions cytoplasmiques sont de tailles et de structures différentes. Une de ces extensions, l'axone, est particulièrement longue. Elle est recouverte de gaines lipidiques isolantes formées par enroulement du cytoplasme de cellules gliales autour de cette structure. Cette caractéristique, qui permet la transmission du message nerveux, rend le cerveau extrêmement riche en lipides ce qui fait de lui l'organe avec la plus grande concentration lipidique après le tissu adipeux (30% du poids sec en lipides dans le cerveau). Les autres extensions, plus petites sont appelées dendrites. Les autres cellules constitutives du système nerveux central sont les cellules gliales. Elles assurent un rôle de soutien pour les neurones en participant notamment à la production de myéline, la régulation de l'homéostasie, l'approvisionnement du système nerveux en nutriments ou encore à la transmission du message nerveux [1].

Le traitement des informations dans le cerveau est permis par les neurones. Le neurone est une cellule excitable qui présente un potentiel de repos négatif de -65 mV dû à une concentration différentielle d'ions de part et d'autre de la membrane.

Pour maintenir ce potentiel, le neurone doit excréter activement certains ions et en absorber activement d'autres. Ces caractéristiques permettent la transmission de l'information au sein du neurone par voie électrochimique. Lorsqu'un neurone reçoit des informations, la membrane se dépolarise. Si la dépolarisation du corps cellulaire du neurone est suffisamment importante, il y a transmission de la dépolarisation le long de l'axone, de manière saltatoire entre les nœuds des gaines de myéline pour arriver à une synapse assurant la jonction entre le neurone et une cellule excitable réceptrice de l'information. Le potentiel de repos est maintenu par l'action de d'une pompe ionique nécessitant une dépense énergétique. Lorsque le potentiel d'action atteint la synapse, il provoque la libération des neurotransmetteurs au niveau de la synapse à destination de la cellule réceptrice [1].

I.A.2. Coûts énergétiques et métabolisme cérébral

Chez les mammifères, les fonctions cérébrales sont fortement consommatrices d'énergie [2,3]. Le cerveau représente seulement 2% du poids total du corps humain mais 20 à 25% de l'oxygène et du glucose consommés par l'organisme le sont par cet organe [4,5]. Cette demande métabolique est principalement nécessaire à la restauration des potentiels de repos membranaires du neurone après un potentiel d'action [6]. Ce phénomène met en jeu, comme nous l'avons vu précédemment, une pompe luttant contre les gradients ioniques par l'utilisation d'ATP. Le principal substrat énergétique cérébral est le glucose et la majorité de l'ATP cérébral est produit par la voie de la glycolyse produisant du pyruvate puis de l'acétyl-CoA utilisé dans la chaîne respiratoire. Le glucose provient principalement de la circulation sanguine à l'aide des transporteurs GLUT car les réserves en glycogène sont extrêmement faibles [7–10]. De plus cet apport est effectué par transport passif selon le gradient de la concentration en glucose sanguin rendant le fonctionnement optimal du cerveau très dépendant de cette dernière. L'utilisation des lipides par le cerveau est, quant à elle, un processus lent et restreint aux situations de régimes hyperlipidiques, d'hypoglycémies ou de situations de jeûne prolongé [11]. Elle se fait par utilisation des corps cétoniques produits par le foie à partir des lipides présents dans l'organisme.

Ce qu'il faut retenir :

Le cerveau, centre de traitement de l'information et de réponse aux stimuli sensoriels, est donc une structure complexe composée de cellules excitables. Son rôle est central dans le fonctionnement optimal de l'organisme. Le cerveau peut traiter et répondre aux stimulations sensorielles de manière consciente ou inconsciente. Il contient une importante quantité de lipides jouant un rôle primordial dans la transmission du message nerveux. Pour assurer un fonctionnement optimal de cet organe, l'individu doit fournir une importante quantité d'énergie majoritairement utilisée dans la transmission des informations. Cette demande importante en énergie rend le fonctionnement optimal du cerveau très dépendant de l'apport énergétique. Le glucose étant la source majoritaire d'apport énergétique du cerveau et les réserves étant très faibles, une diminution prolongée de l'apport énergétique pourrait donc entraîner des perturbations dans le fonctionnement optimal de cet organe.

I.B. Adaptation à l'environnement par le comportement

Les changements globaux actuels induisent des modifications environnementales importantes. Ces modifications peuvent conduire à une diminution soudaine de la quantité de ressource alimentaire disponible [12]. Les changements globaux peuvent également affecter des phénomènes de type El-Nino [13] conduisant à des phénomènes climatiques imprédictibles (ouragan, sécheresse) qui affectent directement les sources de nourriture des individus à la fois temporellement et quantitativement. Par exemple, des données préliminaires, relevées sur plusieurs années, dans les forêts tropicales sèches du Mexique, montrent une diminution des précipitations durant la saison humide lors d'épisodes climatiques de type El-Nino conduisant à une moins grande diversité de plantes consommables par les grands herbivores [14]. Ces modifications, nécessitent une adaptation temporaire, voire permanente des individus afin de survivre et se reproduire. La question de cette adaptation est centrale dans la recherche actuelle sur les modifications comportementales [15,16] d'autant que de nombreuses études montrent que les changements environnementaux se produisent à un rythme plus rapide que celui

permettant l'adaptation de différentes populations, ce qui peut entraîner des difficultés à être performant dans le nouvel environnement [17–20].

I.B.1. Plasticité comportementale

Afin de se maintenir au sein d'un environnement changeant, les individus doivent mettre en place une réponse adéquate. La plasticité comportementale est un type de plasticité phénotypique définie comme la capacité pour un individu à modifier son comportement en fonction des variations de l'environnement, permettant ainsi le maintien d'une haute performance le long de ce gradient environnemental [21]. Cette plasticité comportementale permet une réponse adaptée et relativement rapide aux variations de l'environnement, maximisant ainsi les chances de survie et de transmission des gènes. On distingue deux types de plasticité comportementale. Les réponses innées, qui sont mises en place sur plusieurs générations, correspondent à des réponses préprogrammées de l'organisme à un stimulus, mettant en jeu des réseaux neuronaux préexistants [21,22] (Figure 1). A ces réponses innées sont opposés les comportements d'apprentissage. Ces comportements se mettent en place au long de la vie d'un individu et nécessitent la création de nouveaux réseaux neuronaux [21,22] (Figure 1).

Deux mécanismes permettent la création de ces réseaux. La neurogenèse est un processus de création de nouveaux neurones à partir de cellules souches neurales. Ce mécanisme, mis en évidence chez de nombreuses espèces à l'état adulte, se déroule principalement au sein du gyrus denté de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire chez le mammifère adulte. Alors que les neuroblastes issus du gyrus denté restent au sein de cette structure pour se différencier en neurones excitateurs (cellules granulaires), ceux issus de la zone sous-ventriculaire migrent par chaîne vers le bulbe olfactif et se distribuent radialement avant de se différencier en interneurones. Cependant ce processus serait minoritaire chez l'individu adulte [23–25] (Figure 2). La création de nouveaux réseaux dépend également de la création de nouvelles synapses entre neurones déjà présents et nouveaux neurones.

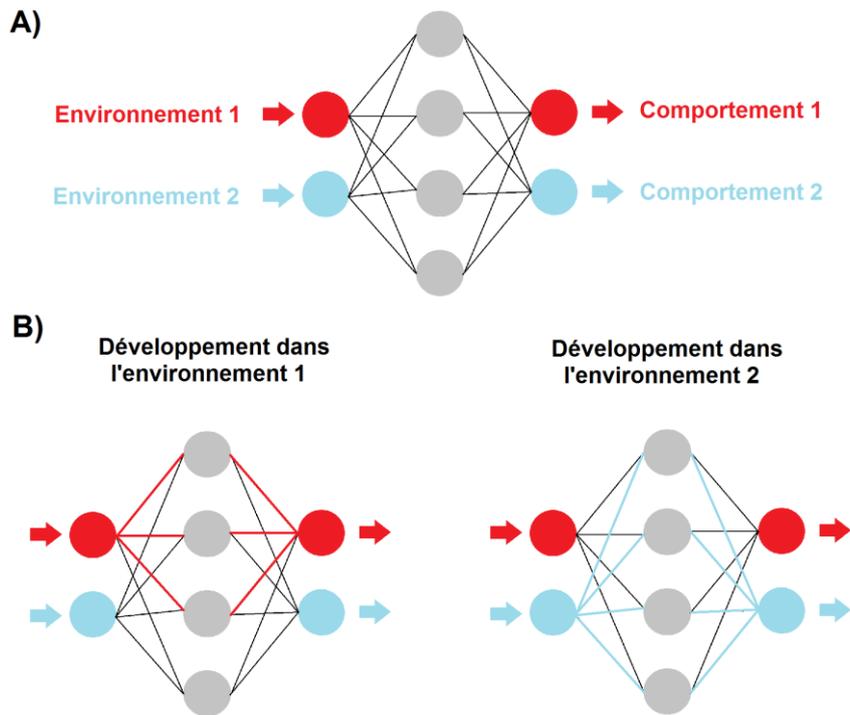


Figure 1 : Organisation des réseaux neuronaux pour les deux types de plasticité comportementale. (A) La plasticité innée correspond à l'activation de réseaux neuronaux existants en fonction de l'environnement. Un environnement 1 conduira alors à la mise en place d'une réponse comportementale 1 par mise en action de réseaux existants. (B) La plasticité acquise correspond au développement de nouveaux réseaux neuronaux conduisant à des comportements différents. Un environnement 1 conduira à la mise en place d'une réponse comportementale 1 par création de nouveaux neurones et/ou de nouvelles connexions entre les neurones (d'après [21]).

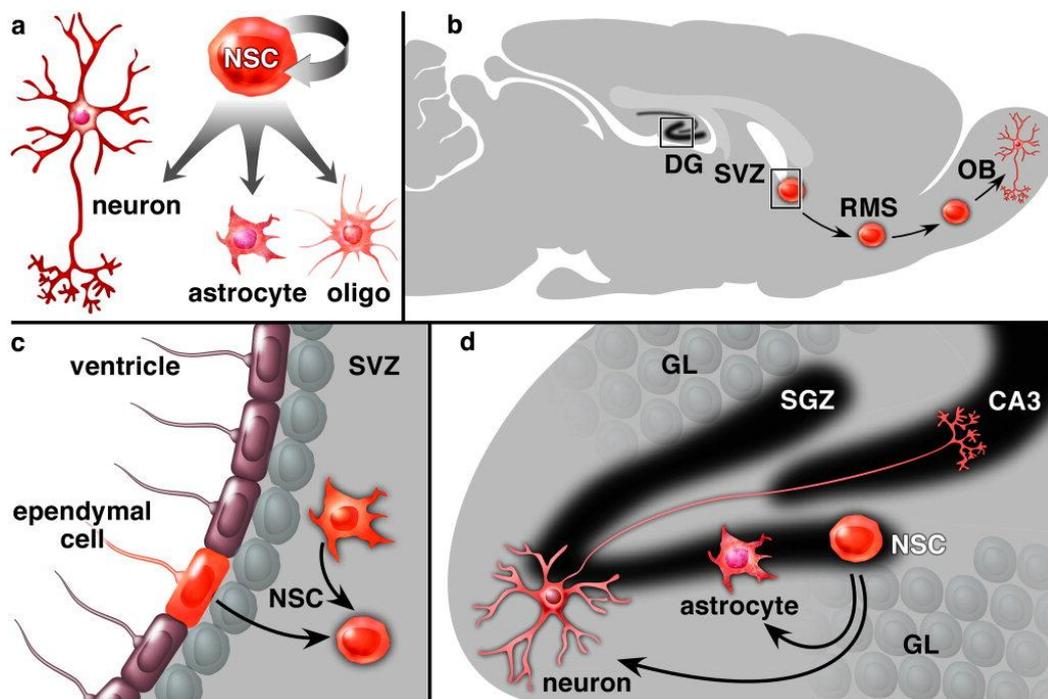


Figure 2 : Mécanismes et zones principales de la neurogenèse chez le mammifère adulte. (a) Les cellules souches neurales (NSC) sont des cellules auto-régénératrices, et multipotentes qui génèrent les différentes cellules neurales: les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. (b) Représentation d'un cerveau de mammifère adulte en coupe sagittale montrant les deux zones principales de neurogenèse : le gyrus denté de l'hippocampe (DG) et la zone sous-ventriculaire (SVZ), ainsi que la migration des neuroblastes de la zone sous-ventriculaire (SVZ) au bulbe olfactif (OB) par un mécanisme migratoire (Rostro-migratory stream, RMS). (c) Mécanisme de formation de nouveaux neurones au sein de la zone sous-ventriculaire. (d) de formation de nouveaux neurones au sein du gyrus denté de l'hippocampe [25].

Ces différences dans les bases neurales de la plasticité conduisent à des différences dans le temps de réponse. La plasticité innée permet la mise en place de réponses immédiates du fait de l'existence des réseaux. Au contraire la nécessité de création de réseaux neuronaux dans le cas de la plasticité par apprentissage conduit à une réponse plus lente. Cependant, les réponses issues de la plasticité par apprentissage sont généralement plus fines et permettent d'atteindre une optimalité ce qui n'est pas toujours le cas de la plasticité innée qui produit un comportement stéréotypé. Pour les deux types de plasticité, la mise en place et le maintien d'appareils sensoriels performants permettant un échantillonnage fin de l'environnement sont extrêmement coûteux. De plus ces structures correspondent à des aires cérébrales qui se développent d'autant plus que l'appareillage est sensible, entraînant des coûts cérébraux importants. En plus de ces coûts communs aux deux types de plasticités, chacune présente des coûts spécifiques. Pour la plasticité innée, les coûts correspondent au maintien des différents réseaux neuronaux existants, qui doivent, dans le cas d'une plasticité importante, se trouver en grand nombre. Pour l'apprentissage, ils correspondent à ceux de la plasticité neuronale ainsi que ceux relatifs aux erreurs, faisant perdre temps et énergie aux individus. L'importance de la plasticité comportementale est donc le fruit de compromis entre coûts et bénéfices [21,22]. En effet, dans un environnement stable, une importante plasticité ne présentera que peu d'avantage alors que les coûts de maintien de celle-ci seront importants. Au contraire, dans un environnement instable et dont la prédictibilité est réduite, les individus gagneront à maintenir une importante plasticité leur permettant de faire face aux nombreux changements. De même, la part relative de ces deux types de plasticité (innée et par apprentissage) dans les réponses exprimées est également régie par compromis entre coûts et bénéfices [22]. Par exemple, la baisse de ressources disponibles avec la saison défavorable conduit certaines espèces telles que le tamia, le microcèbe ou encore des espèces de taupe et de chauve-souris à réduire leur activité locomotrice et leur métabolisme pour passer cette saison défavorable [26]. Cet exemple de réponse innée, héritée génétiquement et mise en place à chaque diminution des ressources conduit à une rentabilisation des coûts associés à la plasticité. Au contraire lorsqu'un événement imprévisible se déroule pour la première fois dans la vie de l'individu, aucune réponse innée n'est alors associée et l'individu doit s'adapter en modifiant son comportement de façon nouvelle. Ainsi, les différences interindividuelles dans la plasticité comportementale

peuvent être expliquées, du moins en partie, par la génétique de l'individu mais aussi par ses expériences passées [27].

En outre, de plus en plus d'études avancent un lien entre personnalité et plasticité comportementale permettant d'expliquer les variations interindividuelles de la population pour cette plasticité. La plasticité serait alors influencée par les stratégies interindividuelles de gestion de l'incertitude [28,29]. Individus réactifs et proactifs sont ainsi opposés dans la littérature [27], les premiers étant considérés comme plus plastiques car plus sensibles aux variations de l'environnement.

Ce qu'il faut retenir :

La plasticité comportementale des individus leur permet de s'adapter relativement rapidement aux modifications prévisibles et imprévisibles de leur environnement. Cette plasticité du comportement, dont les signes sont visibles à l'échelle de la vie de l'individu, peut être de deux types. Une plasticité existante au sein de chaque individu, fruit de l'évolution, permettant de répondre efficacement à des modifications environnementales déjà vécues par les ancêtres et une plasticité nouvellement créée, fruit de l'expérience de l'individu dans son environnement, permettant de répondre à de nouvelles situations. Cette plasticité s'appuie sur la mise en place et/ou l'exploitation de réseaux neuronaux complexes dont le fonctionnement est coûteux.

Pour illustrer ces deux types de plasticité, nous étudierons le fonctionnement d'un processus caractéristique de chacune d'elle. Pour la plasticité comportementale innée, nous avons choisi l'horloge biologique, fonction permettant l'adéquation des processus physiologiques et comportementaux avec l'environnement, Pour la plasticité comportementale par apprentissage, nous avons choisi l'étude des fonctions cognitives et plus particulièrement l'apprentissage et la mémoire permettant de faire face à des nouvelles situations ou réagir de façon adéquate à des expériences déjà vécues. Ces deux grandes fonctions sont décrites ci-après.

I.B.2. Horloge biologique et rythmes circadiens

Une part importante des processus physiologiques et comportementaux des mammifères est basée sur des rythmes biologiques résultants de l'interaction entre un système interne et des indices environnementaux tels que la lumière, la température ou l'apport énergétique [30] (Figure 3).

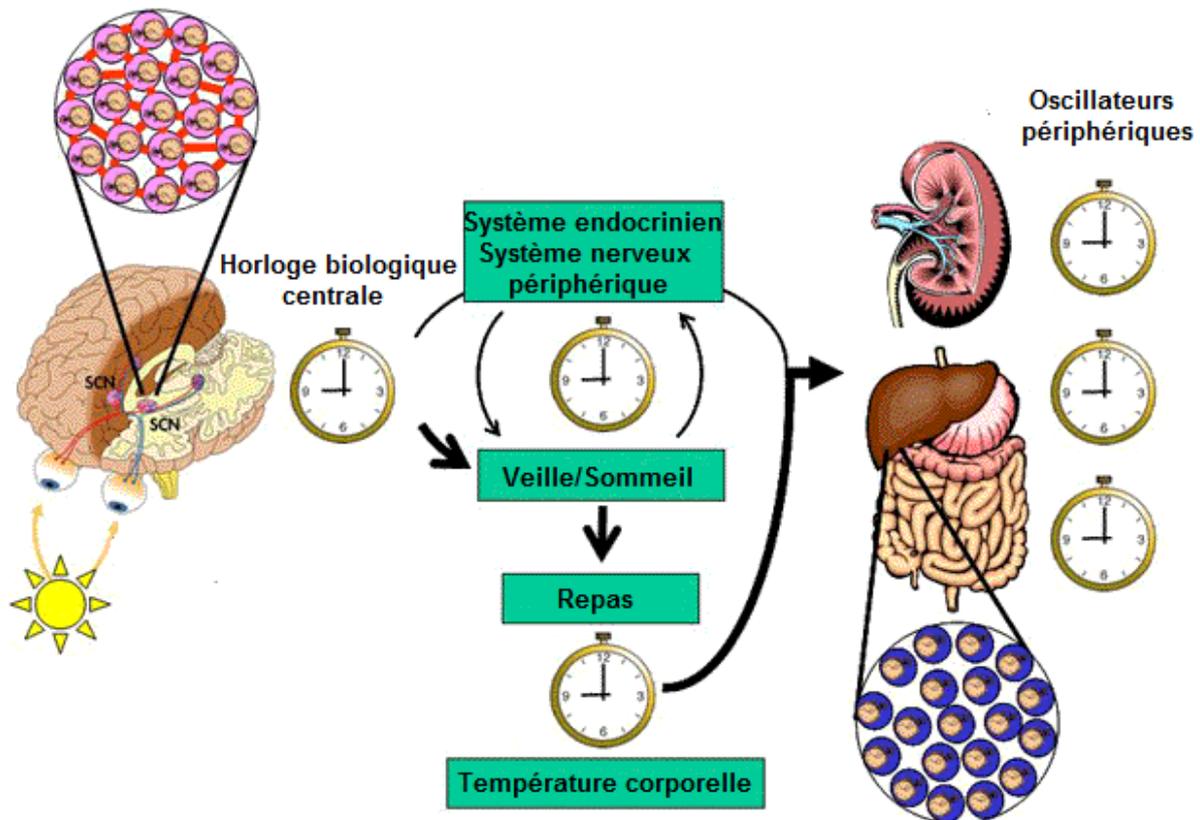


Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'horloge biologique interne chez les mammifères montrant les interactions entre les différents oscillateurs et les indices environnementaux permettant la synchronisation pour une adaptation optimale (D'après [31]).

Le système circadien interne, également appelé horloge biologique, est constitué d'un ensemble d'oscillateurs endogènes permettant la mise en place de processus temporels cycliques. Ce système est constitué d'un oscillateur central situé dans les noyaux suprachiasmatiques et d'oscillateurs périphériques situés dans différents organes [32,33]. Les différents oscillateurs présentent des changements rythmiques persistants dans un environnement stable. La période de ces oscillations, en

l'absence de tout facteur de synchronisation, est appelée période endogène, est proche de 24h [34] et basée sur un ensemble de processus transcriptionnels et posttranscriptionnels interagissant en boucles de régulations [35]. Tous les oscillateurs périphériques sont placés sous contrôle d'un rythme produit par l'oscillateur central situé dans les noyaux suprachiasmatiques. Ce contrôle s'effectue par voie hormonale et métabolique à l'aide de molécules comme la mélatonine ou encore la corticostérone. L'horloge centrale permet également la mise en place des rythmes veille/sommeil contraignant l'activité locomotrice spontanée, les heures de prise alimentaire et l'activité métabolique qui correspondent à autant de signaux entraînant ces rythmes [33].

L'adaptation optimale du système intervient lorsque les processus physiologiques et comportementaux coïncident avec les conditions environnementales. Pour atteindre ce critère, le système circadien interne doit être synchronisé avec des indices environnementaux. De plus, pour permettre des performances maximales à un moment donné, un système circadien doit être à la fois adaptable et régulier. En prenant en compte ces différentes caractéristiques, Hasegawa et Arita [36] ont montré qu'un système circadien fonctionnait de manière optimale lorsqu'il était synchronisé sur les rythmes solaires journaliers. Cette synchronisation a lieu chaque jour par échantillonnage de l'intensité lumineuse par les cellules ganglionnaires de la rétine qui possèdent un photopigment spécifique, la mélanopsine [37,38], et qui transmettent cette information aux noyaux suprachiasmatiques permettant ainsi une resynchronisation de l'horloge biologique centrale [39].

Ce qu'il faut retenir :

Les rythmes circadiens permettent l'adéquation des comportements avec l'environnement par l'interaction entre des indices issus de l'environnement et un système circadien interne. Par ses caractéristiques, ce système est un bon marqueur de la plasticité comportementale innée sous contrôle inconscient.

I.B.3. Fonctions cognitives, apprentissage et mémoire

Le cerveau par ses caractéristiques cellulaires et fonctionnelles sert de base aux capacités cognitives. Les capacités cognitives sont définies comme la capacité d'un organisme à percevoir, mémoriser et utiliser les informations issues des caractéristiques de son environnement [40]. Cette description montre le rôle central des capacités cognitives dans l'adaptation d'un organisme à son environnement lui permettant d'augmenter son succès reproducteur ou d'optimiser sa recherche de nourriture [41]. Les capacités cognitives comportent au sens large la perception de l'environnement, l'apprentissage, la mémorisation et la prise de décision. La perception, stable dans le temps, est utile pour les deux types de plasticité comportementale afin d'échantillonner l'environnement. Nous nous intéresserons principalement à l'apprentissage et à la mémoire qui doivent, quant à eux, être très modulables pour permettre une réponse adéquate, faisant de ces deux fonctions de bons marqueurs de plasticité comportementale par apprentissage.

L'apprentissage est défini comme la capacité pour un individu à acquérir de nouvelles informations et de modifier ses connaissances en codant ces informations avec une représentation neurale [42]. Il en résulte une variation durable du comportement basée sur les expériences permises par la mémoire. La mémoire est définie comme la capacité à stocker une information nouvellement apprise dans la mémoire à court terme ou à la consolider dans la mémoire à long terme par des changements neuronaux [43]. On distingue deux catégories de mémoire suivant les expériences qui y sont associées. La première est la mémoire procédurale et correspond à une forme de mémoire inconsciente portant sur les habiletés motrices et les savoir-faire (mémoire des séquences de contractions musculaires pour un mouvement, mémoire de la syntaxe linguistique). La seconde est la mémoire déclarative et correspond à la mémoire des faits et concepts mais aussi des expériences vécues (mémoire des noms, visages, événements avec leur contexte) [43]. L'acquisition des informations entrant dans ces différentes catégories implique différents systèmes cérébraux. En effet, chez l'Homme, il a déjà été observé une sévère perturbation des apprentissages et de la mémoire déclarative alors que les apprentissages et la mémoire procédurale sont restés intacts [43,44]. Ces systèmes relèvent de structures cérébrales différentes suivant les types d'apprentissage et de

mémoire considérés. Il semblerait que la mémoire déclarative repose principalement sur le cortex et l'hippocampe alors que les circuits de la mémoire procédurale sont très variés et dépendants de l'expérience à encoder [44].

L'acquisition de nouvelles informations par l'apprentissage est permise par des changements physiologiques réversibles dans le système nerveux responsable de la mémoire à court terme. Leur consolidation dans la mémoire à long terme semble se faire principalement par des modifications pérennes de l'intensité du lien entre neurones au sein des synapses. En 1949, Hebb propose que lorsque deux neurones sont actifs en même temps et de façon répétée, des modifications interviennent, de sorte que, après un certain nombre de stimulations, l'activité d'un des neurones entraîne l'activité de l'autre rendant le lien entre les deux neurones puissant [45]. Peu de temps avant, en 1948, Konorski avait déjà proposé que la plasticité neuronale induite par l'association répétitive de stimuli, pouvait être le fruit de la transformation d'un pool de connexions synaptiques potentielles en connexions synaptiques fonctionnelles par des changements morphologiques [46]. Le renforcement pérenne du lien entre neurone pré- et post-synaptique est appelé potentialisation à long terme ou LTP (Long Term Potentiation), et est permis par des modifications structurales des synapses. Il est largement considéré que la LTP est un des mécanismes majoritaires sous-jacent à l'apprentissage et à la mémoire même si, à ce jour, les mécanismes induisant ce phénomène restent encore mal connus [47].

Comme nous l'avons vu précédemment, la LTP est permise par des modifications structurales des synapses. Cette plasticité synaptique est principalement due à des flux d'ion calcium Ca^{2+} au niveau des terminaisons post-synaptiques [48,49]. Cette entrée d'ions Ca^{2+} se fait au niveau de deux types de récepteurs post-synaptiques : les récepteurs au *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) et les canaux calciques voltage dépendants de type L (VGCC). Lorsque la membrane post-synaptique est au repos, le flux de calcium à travers les récepteurs NMDA est empêché par l'action du magnésium. Cependant, si le neurone pré-synaptique libère du glutamate, il se lie ensuite aux récepteurs NMDA et les active au moment de la dépolarisation de la membrane. L'inhibition du magnésium est alors levée et le calcium entre dans le neurone post-synaptique. Ce flux de calcium est un bon indicateur d'activité simultanée des neurones pré- et post-synaptiques. La dépolarisation de la

membrane post-synaptique active également les VGCC laissant entrer les ions calcium Ca^{2+} [47] (Figure 3). Cette entrée d'ions Ca^{2+} active des protéines kinases qui elles même activent des facteurs de transcription qui contribuent à la synthèse protéique (Figure 3). Elle permet également la réorganisation du cytosquelette comme par exemple la polymérisation des filaments d'actine qui induit des réarrangements du cytosquelette permettant la mise en place de nouvelles structures synaptiques [50] (Figure 4).

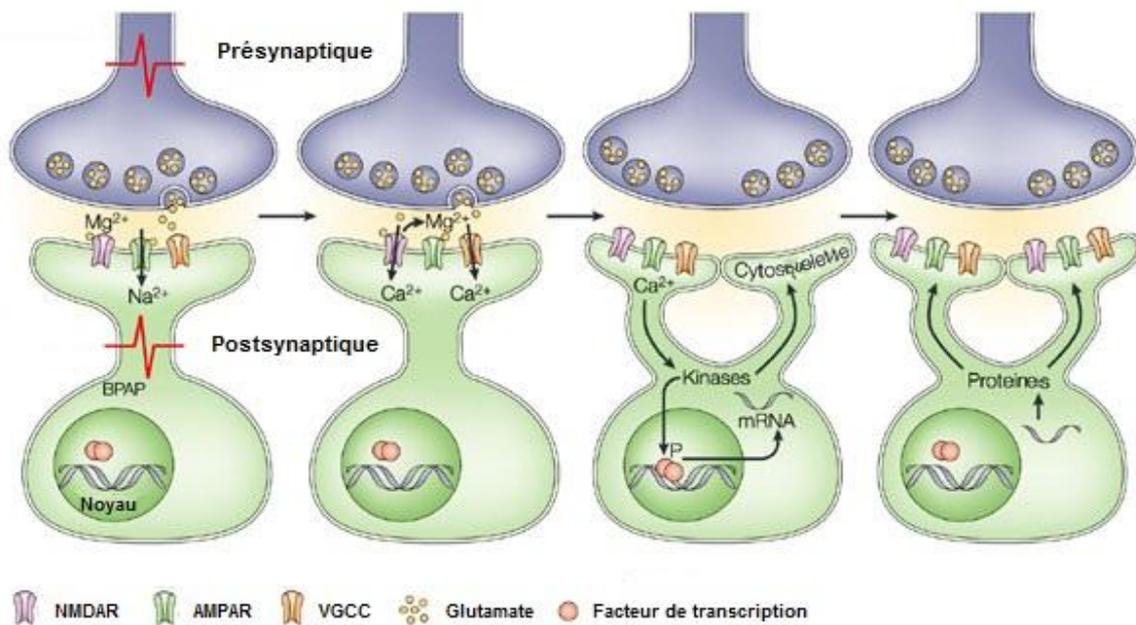


Figure 4 : Mécanismes moléculaires permettant la plasticité synaptique. L'activation du neurone pré-synaptique libère du glutamate dans la fente synaptique. Celui-ci se fixe au récepteur AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique) ce qui entraîne la dépolarisation de la membrane post-synaptique. Cette dépolarisation supprime l'inhibition des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) par le magnésium et ouvre les canaux VGCC (Voltage Gated Calcium Chanel). Cette ouverture des canaux provoque l'entrée d'ions calcium Ca^{2+} qui activent des protéines kinases. Ces protéines activent elles même des facteurs de transcription induisant la production d'ARN messagers et participent à la réorganisation du cytosquelette. Les différents ARN messagers produits sont traduits en protéines permettant la stabilisation des modifications structurales (d'après [47]).

Une fois stockées dans la mémoire à long terme, les informations doivent être accessibles pour une utilisation future. Le rappel d'une information stockée dans la mémoire à long terme est le fruit de l'interaction entre un indice de rappel et une représentation interne permettant la reconstruction de l'information [51]. Dans le cas d'un test de mémoire, un indice est fourni à l'individu qui doit se souvenir de ce qu'il a appris auparavant. L'indice fourni permet alors de déclencher les processus de rappel de l'information apprise. Il semblerait que les réseaux mis en place lors de l'apprentissage soient utilisés lors du rappel [52,53]. Cependant les mécanismes cellulaires sous jacents sont encore peu connus et sont sujets à débat. C'est le cas du rôle des récepteurs au glutamate tels que les récepteurs AMPA et NMDA. En effet une étude a montré que le blocage des récepteurs AMPA de l'hippocampe 10 minutes avant un test perturbe le rappel d'une tâche d'évitement [54]. De même, l'inactivation de ces mêmes récepteurs avant un test de mémoire spatiale dans une piscine de Morris diminue la capacité de rappel des individus [55]. D'autres récepteurs au glutamate, les NMDA, essentiels pour les processus d'apprentissage et de consolidation de la mémoire, ne semblent, quant à eux, pas prendre part au processus de rappel [54,56]. De façon similaire le rôle des protéines kinases dans les processus de rappel est lui aussi débattu dans des études montrant que l'ajout d'un inhibiteur sélectif de ces molécules au sein de l'hippocampe empêche le rappel d'une tâche d'évitement chez le rat [57]. Au contraire, l'ajout d'un inhibiteur sélectif de ces protéines au niveau de l'amygdale ne perturbe pas le rappel de souvenirs associés à un sentiment de peur chez le rat [58]. Dans ce contexte, la neurogénèse adulte pourrait également jouer un rôle important, puisqu'il a été démontré, chez le rongeur adulte, que le recrutement d'une population de neurones hippocampiques nouvellement créés s'organise en un réseau fonctionnel qui s'intègre de manière durable dans les circuits de la mémoire et qui contribue au rappel et au renforcement de la mémoire spatiale précédemment encodée. Le phénomène de neurogénèse pourrait donc être un mécanisme essentiel dans la mise en place de la plasticité comportementale acquise [59].

Ce qu'il faut retenir :

Les fonctions cognitives permettent à l'individu de s'adapter à son environnement. Par l'apprentissage et la mémoire il peut faire face à la fois à

de nouvelles situations ou réagir de façon adéquate à des expériences déjà vécues. L'apprentissage et la mémoire sont des processus complexes basés sur des modifications physiologiques et morphologiques du système nerveux. Lors de l'acquisition de nouvelles informations, des processus physiologiques permettent une rétention de courte durée. Des modifications morphologiques des liens synaptiques entre les neurones stimulés lors de l'apprentissage permettent de consolider cette acquisition et de stocker ces informations pour une durée plus importante dans la mémoire à long terme. Ces informations pourront ensuite être accessibles à l'aide d'indices qui permettront leur rappel.

En conclusion :

Dans des environnements changeants, les individus doivent s'adapter en permanence pour survivre et se reproduire. Cette adaptation est possible grâce à la plasticité comportementale correspondant à un changement de comportement en réponse à des modifications de l'environnement. Il existe deux types de plasticité comportementale, ayant chacune des coûts et bénéfices propres et étant chacune adaptée à un contexte particulier de changement environnemental. Dans le cadre actuel des changements globaux, les variations de l'environnement sont plus fréquentes et imprévisibles, poussant les individus à s'adapter en permanence. Ces dernières peuvent entraîner des modifications dans la quantité et la qualité des ressources alimentaires disponibles qui pourront contraindre ou favoriser l'adaptation des individus. Cette influence de l'alimentation provoquera alors des effets visibles sur le comportement dont les bases seront vraisemblablement neurales. Des marqueurs de plasticité comme l'horloge biologique ou les fonctions cognitives représentent de bons systèmes permettant d'étudier l'impact des variations alimentaires. Ces systèmes sont, en effet, particulièrement importants dans l'adaptation de l'individu à son environnement et semblent coûteux. Ils seraient donc particulièrement sensibles à des modifications de l'alimentation, en particulier celles modifiant l'apport énergétique cérébral.

I.C Modifications alimentaires

L'étude de l'impact des modifications alimentaires sur le comportement et le fonctionnement du cerveau est un domaine encore peu exploré. La mise en place de ces études est en partie basée sur l'observation d'effets bénéfiques de l'alimentation sur les populations humaines. Ainsi, bien que la première étude sur la restriction calorique exercée sur des rats, et démontrant une augmentation de l'espérance de vie des sujets restreints, ait été conduite en 1935 [60], peu d'études se sont intéressées au sujet avant la découverte de la forte prévalence de personnes âgées en bonne santé ainsi que de centenaires sur l'île d'Okinawa au Japon par les Américains après guerre. En effet, cette population présente une très longue espérance de vie (86 ans pour les femmes et 76 ans pour les hommes) ainsi qu'un fort taux de centenaires (34 pour 100 000 habitants soit trois fois plus que le taux français). Le régime des habitants d'Okinawa est basé sur un précepte traditionnel recommandant de terminer les repas avant satiété et se compose de nombreux macro- et micro-nutriments de grande qualité, issus des produits de la mer (fruits de mer, riches en acides gras polyinsaturés et algues) et de végétaux riches en vitamines et polyphénols [61]. L'observation de cette population a probablement provoqué un regain d'intérêt pour l'étude des effets de la restriction calorique. De plus cette longévité est accompagnée par une faible prévalence des pathologies de type diabète ou cardiopathies et les habitants âgés restent performants physiquement et mentalement plus longtemps [62]. De même, l'observation de la faible prévalence de cardiopathies chez les Esquimaux Groenlandais, dont le régime est riche en graisses de poissons et de mammifères marins, correspond à une des premières études sur les effets des acides gras polyinsaturés de type n-3 (AGPI n-3) [63]. L'expansion des travaux dans ce domaine, débutée dans les années 1990 a également mis en avant le rôle majeur des acides gras et plus particulièrement celui des AGPI n-3 dans le développement et le fonctionnement optimal du cerveau [64]. Ainsi l'impact de modifications alimentaires à la fois quantitatives et qualitatives sur la plasticité comportementale est particulièrement intéressant à étudier car il peut affecter directement le cerveau.

I.C.1 Restriction calorique

Comme nous l'avons vu précédemment, la première étude sur la restriction calorique a été mise en place en 1935 chez le rat [60]. Cette étude montre une augmentation de la longévité chez des rats restreints à 40% à partir du sevrage par rapport à ceux maintenus avec une alimentation ad-libitum. Depuis, les recherches sur le sujet sont florissantes. La restriction calorique est définie comme une diminution de la quantité alimentaire disponible sans malnutrition. C'est-à-dire que la proportion relative des nutriments présents dans l'alimentation est conservée lors de la baisse de l'apport calorique. Cette définition a entraîné la mise en place de nombreux protocoles permettant d'obtenir une variation de l'apport alimentaire sans malnutrition. Le protocole le plus utilisé correspond à une diminution de l'apport global d'un certain pourcentage (généralement entre 30 et 60%) avec la nourriture disponible jusqu'à épuisement de la ration. Un protocole alternatif consiste à restreindre l'accès à la nourriture dans le temps. Cette restriction correspond à une alternance de périodes de jeûne et de périodes d'alimentation normale permettant une diminution globale de l'apport calorique. Outre les variations dans la quantité, les études font également varier la durée de restriction qui peut durer de quelques jours à la durée de la vie de l'individu. La restriction calorique à court terme a été très peu étudiée. La majorité des études porte sur ses effets physiologiques et comportementaux à long terme. Ces dernières, menées sur de nombreuses espèces, nous permettent cependant de comprendre ce phénomène et seront également développées dans les paragraphes suivants.

I.C.1.a. Effets physiologiques et cellulaires de la RC

Du fait de l'effet de la restriction calorique sur la longévité des organismes qui y étaient soumis, de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées aux mécanismes physiologiques sous-jacents. Chez la levure, la réduction du pourcentage de glucose de 2% à 0,5% dans le substrat entraîne un changement des voies métaboliques, conduisant les levures utilisant la fermentation à utiliser la respiration mitochondriale [65]. Cette utilisation préférentielle conduit à l'activation d'une protéine (Sir2, Silent mating type Information Regulation two protein) de la famille des sirtuines, famille associée à des modifications de longévité dans

différentes études. Cette même famille des sirtuines, lorsqu'elle est surexprimée, conduit à une augmentation de la longévité chez des vers nématodes *Caenorhabditis elegans* [66], augmentation de la longévité que l'on retrouve également lorsque cette espèce est soumise à une restriction calorique [67].

Chez les rongeurs, de nombreuses études se sont également intéressées aux sirtuines. Parmi les sept sirtuines présentes chez les mammifères, il a été montré que l'expression de deux autres protéines de la famille des sirtuines (SIRT1 et SIRT6) était en lien avec les effets bénéfiques de la restriction sur la longévité à la fois chez le rat sous restriction calorique pendant au moins un an et chez des souris après 24h de jeûne [68,69]. Une autre voie d'action de la restriction calorique chez les rongeurs serait la voie de l'insuline. Cette hypothèse est actuellement supportée par différentes études [70–72]. La restriction calorique entraînerait une diminution de l'IGF-1 (insulin like growth factor-1) qui retarderait les effets cellulaires du vieillissement comme l'apoptose, la progression tumorale ou encore les effets métaboliques liés à l'âge [72,73]. Cependant quelques études montrent des effets négatifs de la restriction calorique, comme celle de Hunt et al. (2011) [74] qui montre qu'une diminution des apports à hauteur de 40% depuis le sevrage réduit les capacités de cicatrisation des rats ayant subi une coupure mais que cet effet peut être réduit si les rats retrouvent une alimentation normale 48h avant la blessure.

Chez les primates, les études les plus complètes actuellement sont deux études débutées il y a environ 30 ans à l'institut national du vieillissement à Baltimore et à l'université du Wisconsin à Madison sur des colonies de macaques rhésus soumis ou non à une restriction de 30% sans malnutrition à partir de leur entrée dans l'âge adulte. Bien que les résultats de ces études sur la longévité des individus diffèrent [75], les animaux restreints des deux études présentent des adaptations physiologiques et cellulaires telles qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline [76], une diminution des dommages causés par les radicaux libres [77], une diminution des réactions inflammatoires [78], et un plus faible déclin du système immunitaire avec l'âge [79]. Quelques effets négatifs sont également à noter sachant que la restriction calorique retarde la puberté chez les mâles de cette espèce et freine également la croissance osseuse [80,81]. Chez le microcèbe, on note une augmentation de la longévité des individus soumis à une restriction calorique de 30%

à partir de l'âge adulte (données du projet Restrikal de l'UMR CNRS-MNHN 7179 non publiées). Chez l'Homme, on retrouve des effets similaires d'une restriction calorique modérée sur le long terme avec des pertes d'adiposité, une augmentation de la sensibilité à l'insuline, une diminution du stress oxydatif et un meilleur fonctionnement cardiovasculaire [82].

Au niveau cérébral, de nombreux changements physiologiques et fonctionnels ont également été observés durant une restriction calorique. Par exemple, des neurones de rat nourris avec du sérum de rat prélevé après 12h de jeûne présentent une augmentation de leur métabolisme respiratoire [83]. De même, le métabolisme du glutamate dans l'hippocampe chez le rat est augmenté après une restriction calorique de 12 semaines [84]. Il a également été montré qu'une restriction calorique augmenterait la survie des neurones par une augmentation de la résistance aux résidus métaboliques chez la souris nourrie un jour sur deux pendant 6 à 8 mois [85] ou encore par la production d'inhibiteur de l'apoptose des neurones chez le rat après 22 mois de restriction à 40% [86]. Finalement un moindre apport calorique stimulerait la neurogenèse et faciliterait la plasticité synaptique chez la souris [85,87] ceci pouvant être lié à l'augmentation de l'expression de SIRT1 lors d'une restriction [88]. En effet, cette protéine joue un rôle majeur dans des processus tels que la réparation de l'ADN, la survie cellulaire, la neurogenèse ou le remodelage de la chromatine qui permettent la sauvegarde de l'intégrité cérébrale contribuant au maintien de hautes capacités cognitives et de la plasticité synaptique [89]. Ces effets bénéfiques peuvent même aller jusqu'à la diminution des dépôts amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie d'Alzheimer restreintes progressivement de 10% à 40% sur 4 semaines puis maintenues à 40% pendant 14 semaines [90]. Ceci n'est cependant pas vérifié chez le macaque rhésus, chez qui, la restriction calorique à 30% depuis le sevrage diminue la prolifération d'astrocytes et les dépôts ferriques mais pas les dépôts amyloïdes [91,92].

I.C.1.b. Effets de la RC sur l'horloge biologique

La restriction calorique ayant fait l'objet de nombreuses études, le lien entre celle-ci et le fonctionnement de l'horloge biologique a lui aussi été grandement étudié. Koubi et al. (1991) [93] ont montré que des rats soumis à une période de jeûne total (10 à

20 jours) et gardés sous des cycles lumière/obscurité constants montraient une augmentation de leur activité locomotrice spontanée durant la phase de lumière mais la réduisait lors de la phase d'obscurité suggérant un effet du jeûne sur le fonctionnement et la synchronisation de l'horloge biologique. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par les travaux de Caldelas et al. (2005) [94] montrant qu'une restriction calorique de 50% pendant 4 semaines et où la nourriture était distribuée chaque jour à la même heure synchronisait l'horloge biologique centrale chez le rat par modulation de l'expression rythmique des gènes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge biologique. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris où l'expression rythmique des gènes impliqués dans les rythmes circadiens était également régulée par une alimentation hypocalorique de 30% inférieure à celle des individus contrôle présentée au cours de la nuit sur une durée de deux mois [95]. Cet effet sur les noyaux suprachiasmatiques et les gènes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge biologique entraînent des modifications comportementales visibles de l'activité locomotrice spontanée. Dans différentes études, effectuées sur des mammifères nocturnes comme diurnes, il a été montré un changement comportemental avec utilisation d'une nouvelle niche temporelle pour le nourrissage correspondant à cette nouvelle synchronisation [39]. Cependant, même si la restriction calorique semble impacter la synchronisation de l'horloge biologique centrale, une étude a montré que des souris soumises à une restriction de 60% se resynchronisaient sur un rythme lumière obscurité en deux jours alors que les individus du groupe contrôle ne se resynchronisaient que le troisième jour [96]. La resynchronisation de l'horloge biologique centrale sur les rythmes de lumière peut cependant être perturbée par la restriction calorique par altération des réponses à la lumière et des oscillations dans l'expression des gènes de l'horloge. Dans une étude de Mendoza et al. (2005), des souris restreintes à 34% pendant 3 semaines et nourries 6 heures après le début de la phase de lumière, montraient des modifications de l'expression induite par la lumière des gènes de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques [97].

En parallèle aux restrictions classiques, certaines études ont restreint la présentation de la nourriture temporellement. Il est communément décrit que la restriction calorique entraîne une faim suffisante pour que la nourriture présentée soit consommée rapidement après sa présentation ce qui la rend aussi restreinte dans le

temps. Ainsi, aux effets de la restriction calorique sur l'horloge biologique s'ajouteraient des effets de la restriction temporelle du nourrissage (Figure 5) [39]. En effet, cette restriction temporelle de l'alimentation a également un impact sur les oscillateurs périphériques, les rythmes veille/activité ou les rythmes de température corporelle. Cependant dès que la nourriture n'est plus restreinte temporellement, la resynchronisation sur les rythmes de l'horloge centrale se fait immédiatement [98].

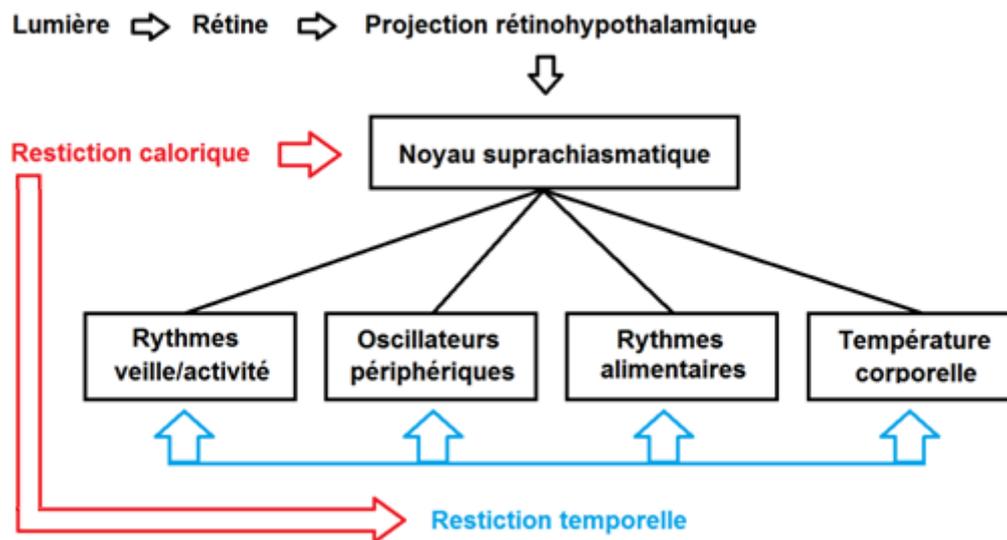


Figure 5 : Schéma des interactions entre modifications alimentaires et oscillateurs de l'horloge biologique interne chez les mammifères (D'après [98]). Les flèches correspondent à un effet direct des restrictions sur les différents paramètres.

I.C.1.c. Effets de la RC sur les capacités cognitives

La grande majorité des études sur la restriction calorique à court terme a été menée sur l'Homme avec des résultats contrastés. Ainsi Tian et al. (2011) [99] ont montré que des athlètes musulmans montraient une diminution de leurs résultats sur différents tests cognitifs (tâches de détection, d'identification et rappel de mémoire) effectués après deux semaines de jeûne intermittent lors du Ramadan. Contrairement aux résultats de cette étude, Green et al. (1995) n'ont observé aucun effet du jeûne occasionné lors de l'omission d'un repas, de deux repas ou de tous les repas dans les 24h précédant les tests sur les fonctions cognitives de sujets féminins (attention, mémoire immédiate, temps de réaction)[100]. Des résultats similaires ont

été obtenus lors d'une étude menée sur des enfants ayant, ou non, pris un petit-déjeuner [101]. Dans cette étude l'omission du petit-déjeuner n'avait aucun effet sur les scores obtenus lors de différents tests cognitifs. Ces différences peuvent s'expliquer notamment par les différentes conditions de test, des sujets et des fonctions testées.

La majorité des études se sont intéressées à l'effet à long terme d'une restriction calorique sur les capacités cognitives avec, une nouvelle fois, des résultats contrastés. Eckles-Smith et al. (2000) ont montré qu'une restriction calorique à vie chez le rat prévenait les déficits liés à l'âge dans la potentialisation à long terme des apprentissages [102]. Un résultat similaire a été obtenu avec un protocole de jeûne intermittent chez la souris nourrie un jour sur deux pendant 6 à 8 mois [85]. Toujours chez la souris, Means et al. (1993) ont mis en avant qu'une restriction calorique débutée au milieu de la vie (20% pendant deux mois puis 40%) améliorait les capacités cognitives à 25 mois des individus restreints par rapport aux individus témoins [103]. Même des intensités de restriction importantes ont permis d'observer des améliorations des capacités cognitives comme l'étude de Kuhla et al. (2013) [104] ou des souris restreintes à 60% pendant 74 semaines montraient une amélioration de leur mémoire de travail. Chez le microcèbe, lors d'un protocole de restriction calorique chronique (étude Restrikal, -30% de calories), il a été observé une amélioration de la mémoire de travail et de la mémoire spatiale après un an de restriction [105] avant une disparition de ces effets positifs à long terme (données non publiées). Cependant, une étude de Yanai et al. (2002) [106] a montré des effets délétères d'une restriction calorique de 2 ans (10g de nourriture par jour ou ad-libitum) sur les résultats d'un tests de mémoire spatiale chez le rat. Dans cette étude, les rats restreints ne parvenaient pas au niveau de performances des individus contrôles lors d'un test de labyrinthe de Morris après 5 à 10 mois de restriction. Les individus restreints présentaient également de mauvais résultats sur un test de mémoire spatiale après 15 mois de restriction et sur un test de discrimination spatiale après 20 à 25 mois de restriction. Les études sur l'Homme présentent le même contraste de résultats montrant que la restriction calorique offre des effets bénéfiques, comme dans le cas de l'étude de Witte et al. (2009) [107] qui montre une amélioration des capacités de mémoire chez des personnes âgées soumises à une restriction calorique de 30% d'une durée de 3 mois, ou délétères comme dans l'étude

de Green et al. (1994) [108] montrant un effet négatif d'une réduction de l'apport calorique sur les performances cognitives (comme la mémoire immédiate ou la vigilance) chez des étudiantes ayant choisi de débiter un régime pour perdre du poids et qui avait perdu plus d'un kilo au moment des tests cognitifs.

Ce qu'il faut retenir :

Bien qu'elle constitue un challenge énergétique, la restriction calorique semble présenter de nombreux avantages physiologiques, conduisant à long terme à un allongement de la longévité. Les effets de la restriction calorique sont aussi importants du point de vue cognitif avec des effets positifs, neutres, ou négatifs selon les protocoles. Au contraire, un consensus se dégage des études sur les effets de la restriction calorique sur l'horloge biologique avec des perturbations des rythmes et notamment une resynchronisation préférentielle sur les heures de nourrissage. De part les coûts du fonctionnement cérébral optimal ainsi que des effets contrastés de la restriction calorique sur le comportement, il semble particulièrement intéressant d'étudier son impact sur la plasticité comportementale innée et acquise à travers l'étude de ces effets sur les fonctions cognitives et le fonctionnement de l'horloge circadienne.

I.C.2. Les AGPI n-3

I.C.2.a. Description et rôles des AGPI n-3

Les AGPI n-3 ou oméga 3 font partie de la famille des acides gras. Les acides gras se composent d'une chaîne carbonée avec un groupement carboxyle (-COOH) à une extrémité et un groupement méthyle (-CH₃) à l'autre extrémité. Ils sont classés suivant la longueur de leur chaîne carbonée et leur nombre de doubles liaisons. Si le nombre de carbones de l'acide gras est supérieur à 12, on le qualifie d'acide gras à longue chaîne. Parmi ces acides gras, ceux présentant plusieurs insaturations sont appelés acides gras polyinsaturés ou AGPI. Les AGPI n-3 sont appelés ainsi car ils comportent leur première double liaison entre le troisième et le quatrième carbone à partir de l'extrémité méthyle. Les AGPI n-3 dérivent d'un précurseur à 18 carbones

appelé acide α -linoléique (ALA) (Figure 6). C'est un acide gras indispensable qui ne peut être synthétisé par l'organisme chez les mammifères contrairement aux acides gras saturés et monoinsaturés. L'ALA est produit chez les végétaux par désaturation à partir de l'acide oléique. L'ALA ingéré par le mammifère sera ensuite métabolisé pour donner les différents acides gras à plus longue chaîne de la famille des AGPI n-3. Les principaux dérivés de la famille des AGPI n-3, car présents en grande quantité dans le cerveau, sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) comportant respectivement 20 et 22 atomes de carbone (Figure 7).

Les AGPI n-3 présentent une grande diversité de rôles dans l'organisme. Comme les autres acides gras, ils ont une fonction énergétique en produisant de l'ATP par la voie de la β -oxydation. Un gramme d'acides gras β -oxydé produit en effet 9 Kcal alors qu'un gramme de glucose n'en produit que 5 rendant les acides gras plus énergétiquement intéressants. La β -oxydation est la voie majoritaire d'utilisation des AGPI n-3. En effet, il a été montré que près de 85% de L'ALA et 60% du DHA consommé par l'organisme est oxydé chez le rat [109]. De plus, L'ALA est préférentiellement oxydé par l'organisme par rapport aux autres acides gras à 18 atomes de carbone [110]. Les AGPI n-3 sont également dégradés par la voie de la cétogenèse dans le foie [111]. Cette voie métabolique est particulièrement importante dans le cas d'un régime hyperlipidique (période post-natale ou régime gras). Elle permet la fourniture d'énergie mais également la synthèse d'acides gras non indispensables par recyclage des atomes de carbone.

La seconde fonction des AGPI n-3 est une fonction structurale. Le DHA est un des principaux constituants fondamentaux des lipides membranaires. Il a un effet similaire à celui du cholestérol en modulant l'activité de différentes protéines membranaires (enzymes, récepteurs, canaux, transporteurs) [112]. En effet les doubles liaisons provoquent des courbures dans la chaîne carbonée des AGPI n-3 entraînant une fluidité accrue de la membrane et permettant des mouvements ou des changements de conformation des protéines membranaires. Le DHA présente une concentration particulièrement élevée dans les membranes des cellules du système nerveux central ou de la rétine [64]. Enfin l'EPA est un des précurseurs des eicosanoïdes, médiateurs lipidiques jouant un rôle de messenger cellulaire et le DHA

de dérivés oxygénés, les docosanoïdes ayant des effets sur le cerveau. Le rôle central des AGPI n-3 a conduit à la mise en place de recommandations nutritionnelles pour cette famille d'acide gras. Ainsi un apport optimal en AGPI n-3, chez l'adulte, doit comprendre du DHA à hauteur de 0,3% de l'énergie totale ingérée et de l'EPA à hauteur de 0,06% de l'énergie totale ingérée [113].

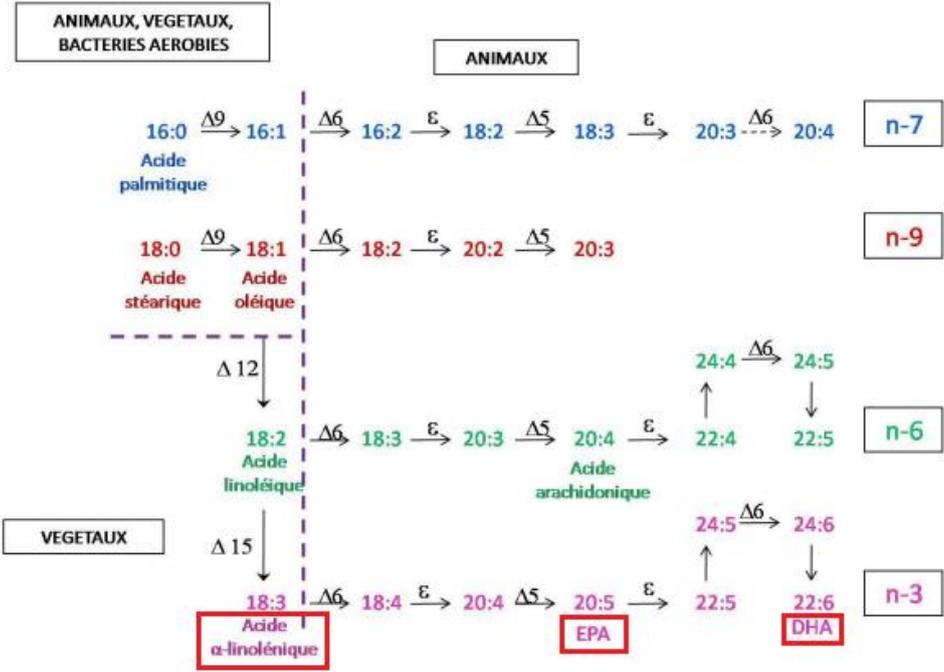


Figure 6 : Voies de synthèse des différents acides gras polyinsaturés à longues chaînes au sein des différents organismes vivants. Les trois principaux acides gras de la famille des AGPI n-3 sont entourés en rouge (D'après [113]).

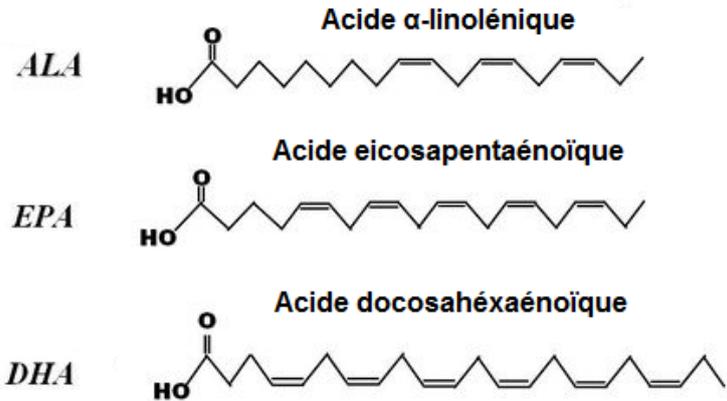


Figure 7 : Les trois principaux acides gras de la famille des AGPI n-3.

I.D.2.b. Effets physiologiques et cellulaires des AGPI n-3

La majeure partie des études sur les AGPI n-3 a porté sur les effets de ces acides gras sur les tissus nerveux et plus particulièrement au niveau du cerveau. Il a ainsi été démontré que ces nutriments jouaient un rôle important dans un développement optimal du système nerveux [64]. Par ailleurs, il a été montré qu'un régime alimentaire ne comprenant pas d'ALA provoquait une diminution de la teneur en DHA dans les phospholipides des membranes cellulaires chez le rat en développement [114]. Cependant, cette diminution est moins importante à l'âge adulte où la quantité de DHA se maintient alors qu'elle chute dans les autres organes comme le foie [114]. De plus, cette diminution affecte différenciellement les différentes zones du cerveau. Par exemple chez le rat une diminution des apports en AGPI n-3 sur deux générations de femelles entraîne une diminution plus importante du DHA dans les phospholipides des membranes du striatum comparées à ceux du cortex frontal [115]. Cependant cet effet est réversible chez le rat comme chez la souris quand bien même les animaux sont carencés sur plusieurs générations [116,117]. Dans ces deux études, les animaux déficients en AGPI n-3 retrouvaient une concentration normale de ces acides gras dans le cerveau après une période de supplémentation. Ceci est en partie dû à des adaptations rendant le renouvellement des acides gras cérébraux plus lents en période de diminution des apports en AGPI n-3 ou encore par la mobilisation des réserves corporelles en AGPI n-3 pour éviter la diminution de ces derniers dans les centres nerveux [118,119]. En tant que constituant des membranes, les AGPI n-3 peuvent également influencer sur les protéines membranaires. Il a été montré qu'une déficience ou un excès d'AGPI n-3 pouvait moduler l'action de la pompe Na/K ATPase qui permet la restauration du potentiel de repos des neurones après stimulation [114]. Dans cette étude, un régime enrichi en huile de tournesol pauvre en AGPI n-3 entraînait une diminution de 20% du fonctionnement de cette pompe chez le rat. Cette étude a aussi montré une moindre activité d'autres protéines membranaires que l'on retrouve dans d'autres études [120]. Une déficience en AGPI n-3 pourrait également être liée à un moindre captage du glucose au niveau cérébral chez le rat, dû notamment à une diminution de la quantité de l'un des principaux transporteurs de glucose du système nerveux central, le transporteur GLUT1 qui peut aller jusque 30% chez le rat [121,122]. Cependant cette diminution pourrait également être réversible comme le suggère l'étude de

Pifferi et al. (2007) qui montre une surexpression de 30% de ce transporteur chez des rats supplémentées en AGPI n-3 [122]. Un déficit énergétique, causé par une déficience en AGPI n-3, peut également provenir d'une diminution de la production d'ATP par phosphorylation oxydative. Dans une étude de Ximenes da Silva et al. (2002) il a été montré qu'un régime carencé en AGPI n-3 provoquait une diminution de 30% à 50% de la concentration en DHA au niveau du cortex fronto-pariétal, de l'hippocampe et du noyau suprachiasmatique provoquant une diminution de 20% à 40% de l'activité de la cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire dans ces 3 régions cérébrales chez le rat [123]. Le déficit d'AGPI n-3 au niveau des membranes entraîne également un changement dans le ratio AGPI n-6/ AGPI n-3. Ce changement peut avoir pour conséquence une moindre sensibilité des membranes à un stimulus. C'est le cas par exemple du nourrisson prématuré chez lequel un changement du ratio AGPI n-6/ AGPI n-3, provoqué par l'ingestion de différents laits expérimentaux riches en AGPI n-6, a provoqué une baisse de sensibilité des cellules photoreceptrices dont la membrane est, en temps normal, riche en DHA [124].

Les AGPI n-3 jouent également un rôle dans la préservation du cerveau. Une étude a montré que la supplémentation en AGPI n-3 à travers l'ingestion d'un régime au ratio AGPI n-6/ AGPI n-3 biaisé en faveur de ces derniers conduisait à une augmentation de la neurogenèse chez le homard [125]. Chez la souris, il a également été montré qu'un régime enrichi en AGPI n-3 prévenait l'inflammation dans l'hippocampe des individus supplémentés et préservait la neurogenèse ainsi que la plasticité synaptique de souris transgéniques [126]. De plus, le DHA est, comme nous l'avons vu un précurseur de molécules comme la neuroprotectine D1 ayant un rôle positif sur la survie neuronale en empêchant, par exemple, la sécrétion trop importante de peptides amyloïdes A β et l'expression de certains gènes impliqués dans l'apoptose de la cellule nerveuse [127]. Finalement, les AGPI n-3 peuvent avoir un effet sur la neurotransmission dans les voies dopaminergiques, sérotoninergiques et cholinergiques. Les études se sont intéressées à cet effet après l'observation d'anomalies comportementales similaires chez des animaux carencés en AGPI n-3 et des animaux lésés expérimentalement dans les voies dopaminergiques. Ainsi, des études chez le rat déficient chronique en ALA ont montré une diminution de la libération de dopamine basale dans le cortex frontal, une augmentation de la libération de dopamine basale dans le noyau accumbens, une

diminution des stocks de dopamine dans ces deux régions et une augmentation de l'activité d'une enzyme de synthèse de dopamine dans le corps cellulaire des neurones [128–134]. Pour le système sérotoninergique, il a été montré une augmentation de récepteurs dans le cortex frontal ainsi qu'une diminution de la sécrétion de sérotonine lors d'une induction pharmacologique [129,135]. Enfin, il a été montré qu'une diminution de l'apport en AGPI n-3 entraînait une augmentation de la libération basale d'acétylcholine et une baisse de l'affinité du récepteur muscarinique à l'acétylcholine de 10% [136]. Ces effets cellulaires et physiologiques sont accompagnés de nombreux effets cognitifs et comportementaux visibles, développés dans le paragraphe suivant.

I.D.2.c. Effets cognitifs et comportementaux des AGPI n-3

Il a été montré qu'une carence alimentaire sévère en AGPI n-3 chez le rat provoque un déficit de 58% de la quantité de DHA cérébral qui se traduit par une diminution de la mémoire spatiale dans un labyrinthe de Barnes, plateforme circulaire percée de 12 trous associés à des repères visuels extérieurs, après 8 semaines de régime [137]. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris avec un déficit de 51% de la quantité de DHA cérébral associée à un nombre d'erreur et un temps de test supérieur dans ce même labyrinthe [138]. De même, pour différents modèles de rongeurs nourris avec un régime carencé en AGPI n-3, il apparaît une augmentation significative de l'anxiété, en situation de stress élevé notamment, comme lors de tests cognitifs [139]. Cependant, cet effet pourrait être inversé lors d'une supplémentation en DHA [140]. La carence en AGPI n-3 semble également provoquer des perturbations des processus d'apprentissage, de mémorisation et de motivation, cependant, ces effets ne sont pas observés dans toutes les études et sont encore soumis à controverse [139]. Enfin, il semble largement admis pour la plupart des modèles de rongeurs (rat, souris, hamster) que la carence alimentaire en AGPI n-3 s'accompagne d'une hyperactivité, qui se traduit notamment par une augmentation significative de l'activité locomotrice spontanée [116,141]. L'altération des performances cognitives chez l'animal déficient en AGPI n-3 a été reliée à la diminution de la teneur en DHA dans les phospholipides des membranes cérébrales. En effet, le DHA intervient en modulant l'activité et l'expression des protéines membranaires (récepteurs, transporteurs, pompes, canaux ioniques) ainsi que sur

plusieurs étapes du processus de neurotransmission [135]. De plus, des études portant sur différentes espèces du rongeur au primate, montrent qu'une moindre accumulation de DHA au niveau du cerveau dans la période de développement de ce dernier entraînait des déficiences cognitives liées à des troubles de l'attention [142]. Chez le microcèbe, un régime supplémenté en AGPI n-3 comprenant 0,06% de l'énergie totale consommée en EPA et 0,3% de l'énergie totale consommée en DHA chez l'adulte entraîne une diminution de l'anxiété et une augmentation des capacités cognitives après 5 mois de traitement, qu'on ne retrouve pas chez des femelles âgées après 14 semaines de traitement [143,144]. Chez l'humain, des études épidémiologiques et cliniques ont permis de montrer que la consommation régulière d'AGPI n-3 pouvait avoir un effet positif sur le déclin cognitif lié à l'âge en maintenant la fluidité membranaire ainsi que le fonctionnement synaptique [145]. Enfin, de nombreuses études renforcent l'argumentaire en faveur d'un effet bénéfiques des AGPI n-3 sur la prévalence et le développement de différents maladies neurodégénératives ou neuropsychiatriques [146–148].

Ce qu'il faut retenir :

Les AGPI n-3 sont des acides gras essentiels qui ne peuvent être synthétisés *de novo* par les mammifères. Ils possèdent plusieurs rôles : un rôle énergétique, un rôle structural et un rôle de signalisation. Les AGPI n-3 jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement cellulaire et moléculaire du cerveau. Par leur conformation spatiale ils participent à la fluidité des membranes cérébrales, au meilleur fonctionnement des protéines membranaires et à la transmission optimale des messages nerveux. Cette importance dans le bon fonctionnement du cerveau a des répercussions sur le comportement des individus. Des carences en AGPI n-3 conduisent à des déficiences dans les fonctions cognitives. Au contraire une supplémentation en AGPI n-3 pourrait permettre de prévenir certaines maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques. Ainsi les AGPI n-3 semblent de première importance dans le fonctionnement optimal du cerveau et une supplémentation alimentaire de ces micronutriments pourrait avoir un impact important sur les capacités cognitives et le comportement des individus.

En conclusion :

Dans un environnement changeant, les individus doivent en permanence s'adapter pour survivre et se reproduire. Une adaptation rapide à ces changements consiste à modifier son comportement afin d'augmenter ses performances. Cette plasticité du comportement est fortement liée à un fonctionnement optimal du cerveau. Or chez les mammifères, les fonctions cérébrales et notamment l'activité neuronale (à travers le fonctionnement des synapses) sont fortement consommatrices d'énergie. La principale source d'énergie du cerveau est le glucose (plus 95% de l'apport énergétique total chez un adulte en bonne santé), et le stock de glycogène cérébral est pratiquement inexistant. Il est donc important que le cerveau dispose d'un apport soutenu et régulier en glucose via la circulation sanguine. Un apport en énergie suffisant par l'alimentation est donc indispensable pour un fonctionnement optimal des structures cérébrales, dont celles liées à la plasticité. De plus le cerveau est constitué en grande partie de lipides dont les AGPI n-3. Des changements qualitatifs dans l'apport lipidique, peuvent modifier la part relative des différents lipides cérébraux modifiant le fonctionnement cérébral et conduisant ainsi à des modifications de la plasticité comportementale. Ainsi des modifications alimentaires telles que la restriction calorique et la supplémentation en AGPI n-3 pourraient contraindre l'adaptation des individus en modifiant le fonctionnement cérébral et physiologique de l'organisme.

I.E. Modèle d'étude : le microcèbe gris

Le microcèbe gris (*Microcebus murinus*) a été décrit pour la première fois par John Frederik Miller en 1777. C'est un primate malgache dont le nom de genre vient du grec *mikros* signifiant petit et du latin *cebus* signifiant singe et du latin *mus* signifiant souris pour le nom de l'espèce.

I.E.1. Phylogénie et classification

Le microcèbe gris est un primate appartenant au sous-ordre des Strepsirrhiniens et à l'infra-ordre des Lemuriformes. Il fait partie de la famille des Cheirogaleidés qui regroupe les lémuriens de petite taille. Comme tous les primates malgaches, il descend d'un ancêtre commun ayant colonisé l'île entre 45 et 54 millions d'années avant notre ère [149]. Le microcèbe murin appartient au genre *Microcebus* comprenant actuellement 12 espèces et sous-espèces même si les résultats sont encore débattus selon les études [150–153] (Figure 8). Par souci de simplification c'est le terme microcèbe qui sera utilisé dans le présent manuscrit, bien que ce genre regroupe en nature plusieurs espèces et sous-espèces.

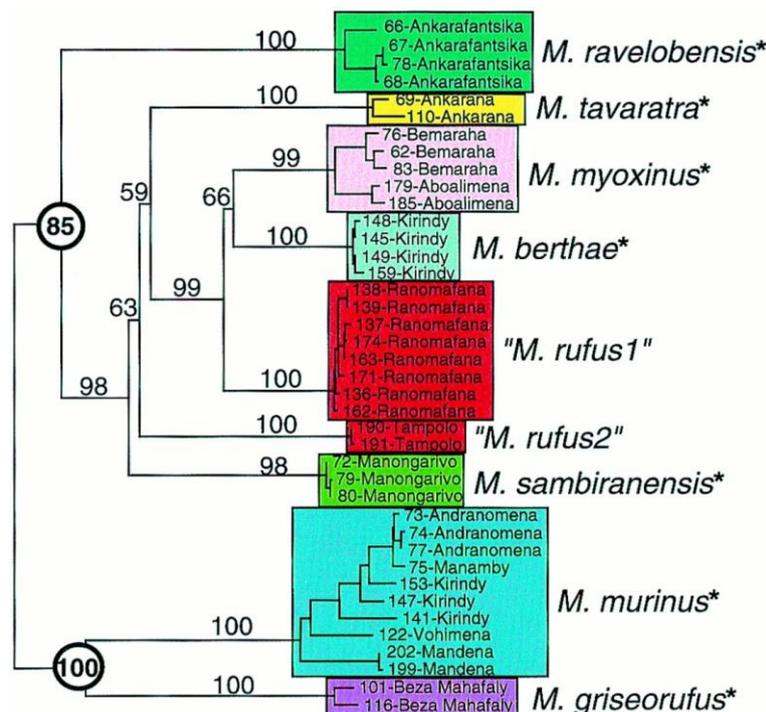


Figure 8 : Arbre phylogénétique du genre *Microcebus* obtenu par analyse d'ADN mitochondrial (d'après [150]).

I.E.2. Caractéristiques morphologiques (Figure 9)

Le microcèbe gris est le plus gros des microcèbes. Les individus adultes ont une taille d'environ 25 centimètres avec la queue. La taille de la queue est de longueur équivalente à celle du corps. Le microcèbe pèse entre 60 et 100 grammes suivant

les saisons, les individus étant plus gros en hiver. Il existe un léger dimorphisme sexuel avec un poids supérieur des femelles quelle que soit la saison. Le microcèbe murin présente une fourrure grise et brune sur le dos avec un ventre plus clair. La fourrure s'éclaircit avec l'âge pour devenir plus blanche.

De par son mode de vie arboricole, le microcèbe murin possède des membres antérieurs et postérieurs puissants lui autorisant des sauts sur de longues distances. Il possède également des pouces opposables et des replis cutanés appelés dermatoglyphes lui permettant une bonne accroche sur les branches. Le microcèbe murin possède de grands yeux, représentant 1,5 % de sa masse corporelle totale, positionnés frontalement et pourvus d'un tapis choroïdien (le *tapetum lucidum*) lui permettant d'avoir un champ visuel élargi de 230° ainsi qu'une vision nocturne performante. Son adaptation à la vie nocturne est également visible par ses grandes oreilles membraneuses présentant une importante mobilité.



Figure 9 : Microcèbes adulte (environ 2 ans) et âgé (>10 ans) montrant les caractéristiques morphologiques typiques de l'espèce (photos Eric Gueton).

I.E.3. Distribution spatiale et caractéristiques de l'habitat

L'île de Madagascar s'étend sur 587 041 km² ce qui en fait l'une des 5 plus grandes îles du monde. Elle a été séparée de l'Afrique il y a 160 millions d'années et de l'Inde il y a 80 millions d'années. De par sa géographie, elle comprend un nombre important d'environnements différents. Les côtes Est et Ouest sont séparées par un plateau central et représentent deux zones biogéographiques différentes. La côte Est

comprend un couvert de forêts tropicales alors que la cote Ouest est couverte de forêts de feuillus tropicaux. Le Sud de l'île correspond à un environnement désertique entrecoupé de portions de forêts épineuses sèches. De part sa géographie, le climat de Madagascar diffère suivant la latitude, les reliefs, l'océan ou encore l'impact de la mousson [154,155]. La principale caractéristique de ce climat est la succession de deux saisons marquées. L'île de Madagascar se caractérise par un hiver froid et sec et un été chaud et humide. Suivant la partie de l'île, l'hiver dure entre 4 et 10 mois. Les précipitations moyennes varient de 500 mm dans le Sud sec à 3000 mm dans la forêt humide située à l'Est de l'île. De même les températures journalières varient de 26°C à 29°C dans les régions humides et entre 20°C et 27°C dans les régions plus sèches. Ces températures varient également au cours de la journée avec des nuits froides ou les températures peuvent être négatives en hiver. En plus de ces saisons marquées, il existe des phénomènes climatiques exceptionnels intra-saisonniers impliquant des phénomènes de type El-Niño [156].



Figure 10 : Aire de répartition du microcèbe gris sur l'île de Madagascar (source IUCN).

La zone de répartition du microcèbe murin s'étend le long de la cote Ouest de l'île ainsi que quelques zones situées dans la partie Sud de l'île. Il exploite les arbres et les buissons du sol jusqu'à une hauteur d'environ 10 m dans les forêts secondaires voire 30m dans les forêts primaires (Figure 10). Il se déplace le plus souvent sur les

branches et rarement au sol sur de longues distances. Il apprécie particulièrement les feuillages denses les lianes et les branches fines où il peut facilement se déplacer et se dissimuler. Il niche généralement dans des arbres creux où il apporte des feuilles afin de former des nids.

I.E.4. Ecologie

I.E.4.a. Ressources alimentaires

Le microcèbe est un généraliste de la forêt malgache se nourrissant de fruits, d'insectes, de gomme ou encore de sécrétions d'insectes [157–161]. Il cherche et exploite seul sa nourriture sur un territoire d'environ 0.032 km² [159,162,163]. Cependant, son régime alimentaire varie au cours de l'année [158,161] du fait de la variation importante de la disponibilité alimentaire directement liée aux variations saisonnières de climat (Figure 12). Les femelles ont un accès privilégié à la ressource alimentaire par rapport au mâle du fait de leur taille plus importante qui les rend dominantes [164].

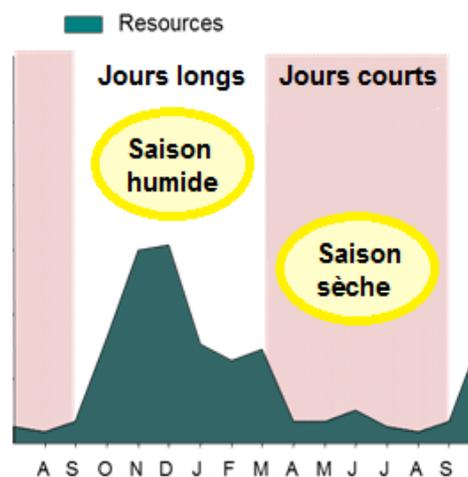


Figure 11 : Evolution de la disponibilité alimentaire au cours de l'année à Madagascar.

I.E.4.b. Organisation sociale et reproduction

L'aspect social de la vie de cette espèce reste relativement peu étudié, cependant il semblerait que l'espèce soit organisée en voisinage dispersé multimâles / multifemelles avec des groupes de sommeil [165]. Les femelles forment la base du groupe auquel s'associent un ou plusieurs mâles dominants dont les domaines vitaux peuvent se superposer à celui des femelles. Les mâles dominés sont contraints de rester en périphérie. La proximité des individus et la superposition des domaines vitaux (Figure 12) seraient propices à des interactions sociales stables entre les voisins [165,166]. De plus on sait que la plupart des femelles forment des groupes de sommeil stables alors que les mâles nichent généralement seuls (Figure 13) [165].

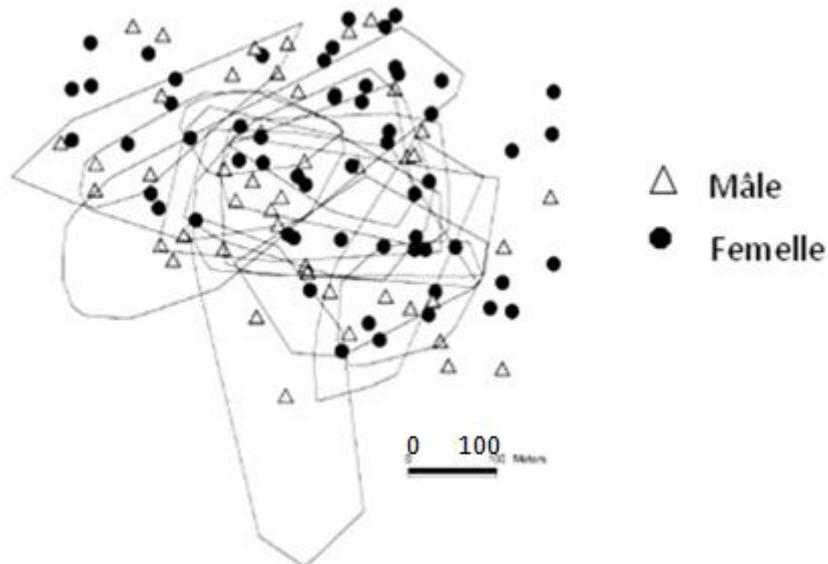


Figure 12 : Taille et superposition des domaines vitaux de différents individus adultes des deux sexes. Les lignes représentent les domaines vitaux de 14 mâles. Les triangles correspondent aux centres d'activités des mâles, les points à ceux des femelles. Les triangles blancs correspondent aux centres d'activité des mâles dont le domaine vital est représenté [166].



Figure 13 : Photographie d'un groupe de sommeil regroupé au sein d'un nichoir dans la colonie de Brunoy (photo Eric Gueton).

La reproduction se déroule durant l'été, période favorable présentant une forte disponibilité en ressources. Le microcèbe murin peut se reproduire durant toute sa vie. Les mâles voient leurs testicules se développer à l'approche de la saison de reproduction. Ils établissent alors une hiérarchie lors d'intenses compétitions. Il arrive que les mâles visitent les sites de nidification des femelles en attendant l'œstrus de ces dernières [165]. Les mâles en meilleure condition corporelle après la saison difficile sont préférentiellement choisis par les femelles qui acceptent l'accouplement. Les femelles peuvent avoir jusqu'à 3 œstrus durant l'été qui durent chacun entre 1 et 5 jours permettant une grande variété d'accouplements. Après une période de gestation d'environ 60 jours, la femelle donne naissance à 2 petits en moyenne dans un nid formé de feuilles et proche de sources de nourriture [167]. Après deux mois, les petits sont complètement indépendants. Les femelles restent au sein du groupe alors que les mâles dispersent.

I.E.4.c. Rythmes circadiens et saisonniers

Le microcèbe murin est un primate nocturne présentant des rythmes journaliers et circadiens marqués. Le rythme circadien du microcèbe murin (Figure 14) se caractérise par une forte activité locomotrice spontanée lors de la phase d'obscurité. Cette haute activité s'accompagne d'une température corporelle élevée liée aux

différentes activités comportementales des individus. Cette phase d'activité est suivie par une baisse de température corporelle qui intervient un peu avant ou au début de la phase de lumière suivant la saison [168,169]. Cette baisse de la température corporelle entraîne une phase d'hypothermie qui peut aller jusqu'à un épisode de torpeur journalière si la température corporelle de l'animal descend sous un seuil fixé à 33°C [168]. Lors de cette phase d'hypothermie l'animal est inactif.

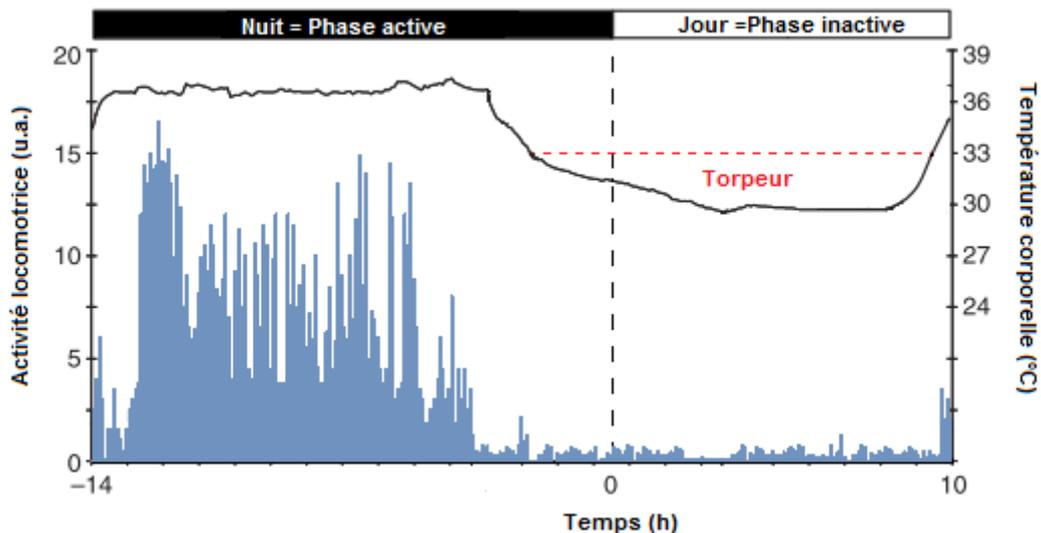


Figure 14 : Représentation du rythme circadien de la température corporelle (en degrés Celsius) et de l'activité locomotrice spontanée (en unités arbitraires) d'un microcèbe en période de jours courts (hiver) (Adapté de [170]).

Comme pour les rythmes circadiens, les rythmes saisonniers sont extrêmement marqués chez le microcèbe gris. Les changements saisonniers dans le comportement et la physiologie des animaux sont dépendants de la photopériode. Cette dernière varie de 11 à 13 heures à Madagascar mais peut être reproduite artificiellement en captivité. Il a d'ailleurs été montré que les microcèbes captifs exposés à la photopériode de Paris ou à des photopériodes recrées en bâtiment par de la lumière artificielle présentaient les mêmes changements saisonniers que les individus sauvages [171,172]. Chez le microcèbe gris, les informations photopériodiques saisonnières permettent le contrôle de la reproduction. Chez le mâle, la taille des testicules régresse lors de la période défavorable des jours courts pour augmenter avec l'allongement des journées. De même chez les femelles, il existe une régression complète des organes génitaux pendant la période de jours

courts et une restauration avec induction d'un cycle ovarien lors de la période de jours longs [173]. L'importance de l'information lumineuse a également été mise en évidence par des travaux récents sur la pollution lumineuse où les animaux soumis à des éclairages nocturnes développaient des caractéristiques sexuelles d'animaux en saison de jours longs [174,175]. Une autre modification marquée de la morphologie du microcèbe murin est un engraissement saisonnier (Figure 15). Les individus des deux sexes constituent des réserves de graisse dans l'abdomen, les pattes et la queue pouvant atteindre 35% de la masse corporelle [173].



Figure 15 : Photographie de deux individus mâles en hiver (gauche) et en été (droite) présentant un phénotype typique saisonnier avec des réserves de graisse et des testicules atrophiés pour l'individu en hiver (photos Martine Perret).

Cet engraissement est réalisé en fin de période favorable en prévision de la baisse des ressources alimentaires et de l'utilisation de la torpeur journalière comme mécanisme comportemental. Lors de l'utilisation de la torpeur un individu réduit sa dépense énergétique en supprimant toute activité locomotrice spontanée et en ralentissant les processus métaboliques par une diminution de la température corporelle. Ce mécanisme permet de diminuer le métabolisme jusque 80% [176] et permettrait une économie d'énergie d'environ 10% [177]. Cependant, les réveils sont coûteux du fait de l'élévation nécessaire de la température corporelle pour un retour

à la normothermie [178]. Ce retour à la normothermie est régulé de façon endogène et met en œuvre des processus de thermogénèse par frissons ou métabolisme du tissu adipeux brun [179]. Bien qu'utilisée naturellement, cette stratégie comportementale comprend de nombreux coûts métaboliques mais également en terme de reproduction et de prédation [180–182]. Il existe également des adaptations comportementales saisonnières qui varient en fonction du sexe de l'individu. La majorité des femelles économisent leur énergie en entrant en torpeur saisonnière, alors que les mâles semblent rester plus ou moins actifs durant cette période difficile [173,183,184] (Figure 16)

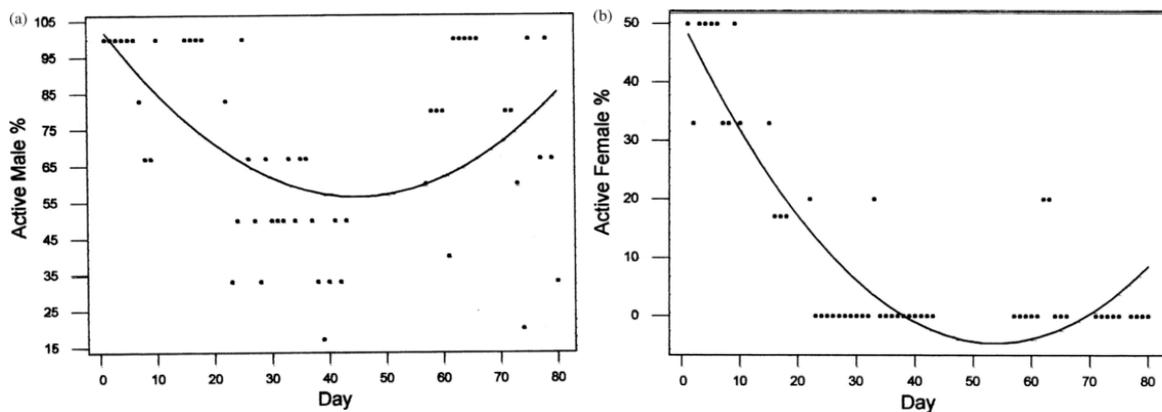


Figure 16 : *Activité des individus lors de la saison sèche. (a) Evolution du pourcentage de mâles actifs au cours de l'hiver. (b) Evolution du pourcentage de femelles actives au cours de l'hiver* [184].

Du fait de l'économie d'énergie qui en résulte, la torpeur saisonnière semble plus avantageuse pour faire face à cette période défavorable que de rester actif, même si une étude sur la population de Kirindy ne montre aucune différence de survie entre les sexes [183]. Une hypothèse voudrait que, en restant actifs, certains mâles bénéficient d'un avantage vis-à-vis de leurs concurrents moins actifs pour la reproduction dont la période coïncide avec la sortie de torpeur saisonnière pour les femelles [162,184].

I.E.4.d. Importance des capacités cognitives en nature

De nombreuses expérimentations menées dans le cadre d'études sur le vieillissement cognitif du microcèbe ont démontré des capacités cognitives importantes en laboratoire [185–188]. Dans un environnement présentant de fortes pressions de sélection comme l'île de Madagascar, ces capacités cognitives jouent un rôle prépondérant même si peu d'études sont disponibles, à ce jour, sur le sujet. Une étude de Kappel et al. [189] a montré que les microcèbes gris arrivaient à discriminer des odeurs d'animaux prédateurs et non prédateurs. Lorsqu'un choix entre deux odeurs dont celle de fosa, un de leur prédateur naturel, leur était présenté, les animaux montraient un évitement total de cette odeur. Une des capacités cognitives les plus étudiée a été la capacité de mémoire spatiale. A travers une série d'études sur le sujet, il a récemment été mis en évidence une préférence des sites alimentaires stables par les individus qui les exploitent plusieurs jours durant [190,191] (Figure 17). Dans une de ces études, les animaux montraient également une direction préférentielle de sortie du nid vers ces sites indiquant une capacité de mémoire de la position de la source de nourriture.

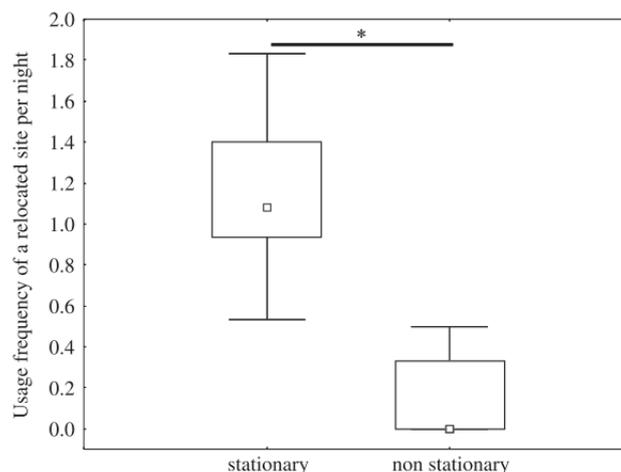


Figure 17 : Fréquence d'utilisation des sites relocalisés d'une nuit à l'autre en fonction du fait que la ressource consommée sur le site soit stationnaire ou non [190].

Il a également été noté que les microcèbes murins ne se déplaçaient pas de manière aléatoire lors de leur exploitation des ressources stables dans l'espace. Les individus étudiés montraient une planification d'itinéraires pour les exploiter (Figure 18) basée sur des indices visuels lorsque d'autres indices sensoriels étaient indisponibles [158,192].

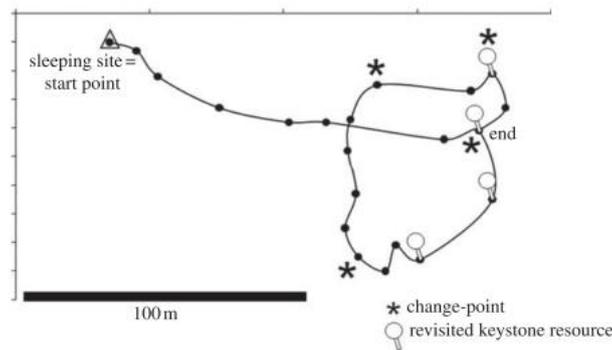


Figure 18 : Exemple d'itinéraire pour un individu lors de sa recherche de ressource alimentaire. Les étoiles correspondent à un changement de direction suffisamment important pour être considéré comme intentionnel [158].

Ce qu'il faut retenir :

Le microcèbe est un primate malgache soumis à de fortes pressions de sélection. Au cours de son évolution il a développé différentes adaptations comportementales afin de se maintenir dans un environnement changeant de façon prévisible mais également imprévisible. Son adaptation journalière et saisonnière ou encore ses capacités cognitives importantes permettent une étude portant sur les plasticités comportementales innées et acquises. Les variations climatiques importantes à Madagascar amènent des épisodes imprévisibles ayant pour conséquences des variations importantes dans la quantité ou la qualité de la nourriture disponible. Les changements alimentaires tels que la restriction calorique ou la supplémentation en AGPI n-3 peuvent impacter fortement le fonctionnement cérébral optimal ainsi que la plasticité des comportements.

Objectif et démarche expérimentale

L'objectif du présent travail est de mieux comprendre l'influence de variations alimentaires sur la plasticité comportementale, qu'elle soit innée ou acquise. Il s'articule autour de deux types de modifications de l'alimentation : des variations quantitatives (restriction calorique) ou des variations qualitatives (supplémentation en AGPI n-3). L'influence des variations quantitatives, a été étudiée sur la plasticité comportementale innée puis acquise, et l'influence de variation qualitatives à, quant à elle, a été étudiée sur la plasticité comportementale acquise. Ces trois études sont détaillées ci-après :

- La première partie de ce travail s'est intéressée aux effets à court terme d'une restriction alimentaire sans malnutrition à travers deux études. Un pourcentage de restriction de 60%, basé sur les précédentes études menées sur les individus de la colonie de Brunoy [193,194], a été choisi pour ces deux études. La première étude s'est intéressée aux effets de la restriction sur la plasticité comportementale innée. L'adaptabilité de l'horloge biologique à un changement brutal de la photopériode sous la forme d'un décalage horaire chez des individus en restriction alimentaire a été étudiée à l'aide d'un suivi télémétrique de leur activité locomotrice et de leur température corporelle. Par souci de simplification cette étude est dénommée « RC-Chrono » dans la suite du présent manuscrit.

- La deuxième s'est, quant à elle, intéressée aux effets d'une restriction alimentaire sans malnutrition sur les capacités cognitives et plus précisément sur la mémoire et l'apprentissage, mécanismes permettant des modifications du comportement basées sur l'expérience de l'individu et mises en place au cours de sa vie. Pour cette étude, le pourcentage de restriction défini a priori s'est révélé trop élevé sur une durée plus longue pour que les individus restent au dessus du poids limite, fixé à 55g, lors de la seconde session de tests. Il a donc été décidé de l'abaisser à 40%, pourcentage de restriction maximum estimé permettant un challenge énergétique suffisant et le maintien des individus dans l'étude sur la totalité de sa durée et sans atteinte du minimum de masse corporelle synonyme de mise en danger pour l'animal. Durant cette étude, l'apprentissage et la mémoire ont été testés avant et après une période de restriction alimentaire à l'aide d'un test de discrimination visuelle. Un suivi du métabolisme basal, de la glycémie et de la cétonémie ainsi qu'un suivi des performances physiques a permis une meilleure compréhension des résultats des

tests cognitifs. Par soucis de simplification cette étude est dénommée « RC-Cog » dans la suite du présent manuscrit.

- Enfin, la troisième partie de ce travail a consisté à étudier l'effet de modifications pérennes de l'alimentation sur la plasticité comportementale acquise à travers une supplémentation à long terme en AGPI n-3. Pour cette étude, il a été choisi de travailler à un niveau de supplémentation correspondant aux recommandations européennes en matière d'apport optimal en AGPI n-3 chez l'Homme. Des tests comportementaux de discrimination visuelle, de mémoire spatiale ou encore d'anxiété ont permis un suivi régulier à long terme (18 mois) des performances d'apprentissage et de mémoire des individus ainsi que de leur état émotionnel. Une première évaluation du processus de neurogénèse cérébrale, processus permettant une plus grande plasticité comportementale, ainsi qu'un suivi des capacités physiques a complété ces données pour une compréhension plus approfondie des effets de cette supplémentation sur l'organisme.

Matériel et méthodes

III.A. Remarque éthique

Tous les microcèbes utilisés pour ce travail de thèse sont issus de la colonie de Brunoy (MNHN, France, agrément N° A91.114.1). Les différentes expérimentations constituant cette étude ont été acceptées par le "Comité d'Ethique Cuvier" du Muséum National d'Histoire Naturelle sous l'autorisation n°68-018.

III.B. L'Élevage de microcèbes de Brunoy

L'élevage de microcèbes du Muséum National d'Histoire Naturelle situé sur le site de Brunoy constitue la plus grande colonie captive de microcèbe au monde avec près de 450 individus. Cette colonie a été constituée après import d'individus sauvages de Madagascar entre 1967 et 1972. Les animaux sont maintenus dans des pièces à température et humidité constante de $T=25^{\circ}\text{C}$ et $H=55\%$. Ils sont regroupés par sexe au sein de groupes sociaux de 2 à 10 individus suivant la taille de la cage. Les animaux sont soumis à une alternance de deux régimes photopériodiques de six mois chacun mimant les saisons. L'été est mimé par une succession de jours longs avec 14h de lumière et 10h d'obscurité et l'hiver par une succession de jours courts avec 10h de lumière et 14h d'obscurité.

Lorsqu'ils ne sont pas intégrés à un protocole expérimental particulier, les microcèbes sont nourris à partir d'une bouillie composée de pain d'épice, de lait concentré non sucré, de fromage blanc, de jaune d'œuf, de poudre de céréales et d'eau. Ils sont nourris *ad libitum* et la ration est accompagnée de morceaux de pommes et de bananes.

III.C. Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale.

III.C.1. Protocole alimentaire

La bouillie expérimentale est préparée en petite quantité chaque jour et pesée avec précision pour le nourrissage des animaux. Elle contient 61% de glucides, 23% de protéines et 16% de lipides [105]. La banane complétant la ration est mixée avec la

bouillie pour le contrôle des restes de nourriture. La quantité couvrant les besoins journaliers des individus est de 21g au total, soit un total de 105kJ [105].

Eau	216 g
Lait concentré non sucré	151 g
Pain d'épice	21 g
Mélange de céréales (Blédine®)	36 g
Fromage blanc	110 g
Jaune d'œuf	16 g
Banane	220 g
Total	770 g

Tableau 1 : Composition du régime expérimental.

III.C.2. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (Etude RC-Chrono)

III.C.2.a. Démarche expérimentale

16 mâles adultes issus de la colonie de Brunoy ont été utilisés pour cette étude. Leur âge, au moment de l'expérimentation, variait de 1 à 5 ans (3.9 ± 1.3). Durant toute la durée de l'expérience, les individus ont été isolés en cage individuelle et soumis à une photopériode estivale (jours longs avec 14h de lumière et 10h d'obscurité). La température et l'humidité ont été maintenues constantes à $T=25^{\circ}\text{C}$ et $H=55\%$. Dans la nature, ces conditions favorisent un haut niveau d'activité des individus.

L'étude a duré au total 2 semaines (Figure 19). Les animaux ont été séparés en deux groupes : un groupe contrôle (CTL) nourri avec 21 g du régime expérimental décrit dans le tableau 1 pour un total de 105kJ/jour et un groupe restreint (RC) recevant 60% de calories en moins que le groupe CTL soit 8.4 g du régime expérimental décrit dans le tableau 1 pour un total de 42kJ/jour. Durant la période d'intervention alimentaire, les animaux ont été pesés tous les deux jours afin de s'assurer que leur masse corporelle ne descende pas sous les 55g (masse corporelle en dessous de

laquelle ils doivent être exclus de l'expérience pour ne pas leur faire courir de risques de santé). Les animaux ont été nourris tous les jours à une heure aléatoire pendant laquelle tous étaient actifs (en observant les données d'activité en temps réel), dans le but de ne pas perturber leurs rythmes en les réveillant.

L'activité locomotrice spontanée ainsi que le température corporelle des individus est suivie par télémétrie L'enregistrement a été lancé au début d'une phase d'obscurité (17h). Du jour 1 au jour 6, la photopériode a été maintenue constante avec 14h de lumière (3h-17h) et 10h d'obscurité (17h-3h). Le septième jour, la phase de lumière a été allongée de 6h (3h-23h). La deuxième semaine (jours 8 à 14), la photopériode a été maintenue constante avec le décalage engendré par l'ajout des 6h de lumière avec une phase de lumière de 14h (9h-23h) et phase d'obscurité de 10h (23h-9h). De plus, certains animaux (n=4, 2 CTL, 2 RC) ont été suivis à l'aide d'un système de respirométrie, permettant de suivre leur métabolisme aérobie en continu pendant les 2 semaines d'expérimentation.

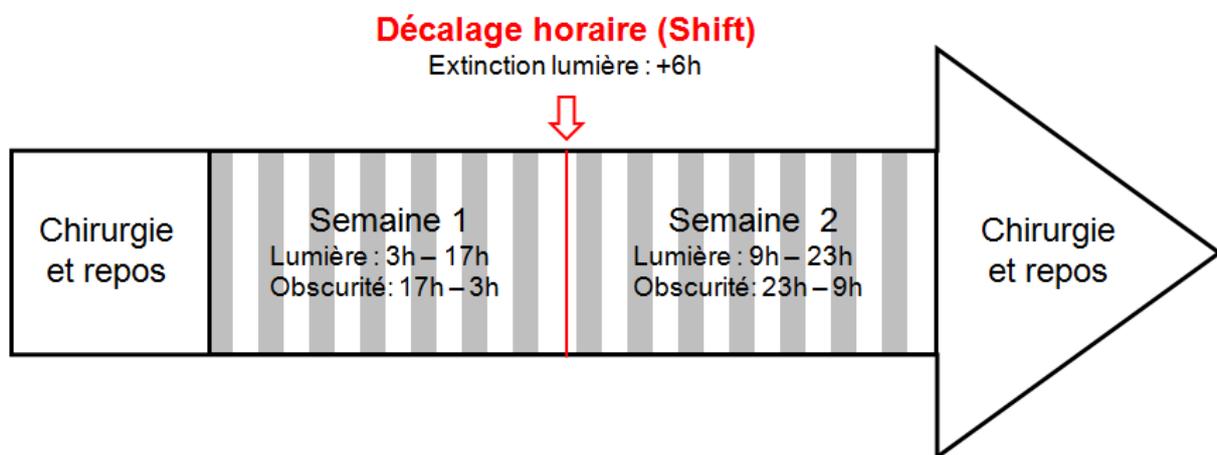


Figure 19 : *Calendrier expérimental de la manipulation expérimentale : Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale innée.*

III.C.2.b. Mesure de l'activité locomotrice et de la température :

Télémétrie

L'activité locomotrice et la température corporelle des individus ont pu être suivies à l'aide d'un dispositif de télémétrie. Un transmetteur de 2,5g (modèle TA10TA-F20, DataScience Co. Ltd, Minnesota, USA) est implanté sous anesthésie gazeuse par isoflurane (Iso-vet, Isoflurane 100mg/g, Piramal | Healthcare UK Limited, Morpeth, Northumberland, United Kingdom) dans la cavité péritonéale de l'animal. Une période de repos de 2 semaines avec suivi quotidien du processus de cicatrisation suit chaque implantation. Les animaux sont isolés lors de cette période de repos pour éviter qu'un animal affaibli soit attaqué par ses congénères. La même procédure est employée lors du retrait des implants. L'animal rejoint son groupe social après cicatrisation complète.

Le système de télémétrie comprend le transmetteur implanté ainsi qu'une plaque réceptrice placée sous la cage de l'animal. Cette plaque réceptrice capte les mouvements verticaux et horizontaux de l'animal (système de coordonnées X-Y, Dataquest Lab Pro v. 3.0, Data Science Co. Ltd, Minnesota, USA) qui sont ensuite sommés par période de 5 minutes. L'activité locomotrice est exprimée en unités arbitraires (u.a.) et la température corporelle en degrés Celsius (°C). Plusieurs paramètres sont extraits manuellement des enregistrements : l'activité locomotrice moyenne pendant les phases de lumière et d'obscurité, l'activité locomotrice moyenne par jour complet. Ces mêmes données sont également extraites sur des événements ponctuels (changement de photopériode). L'onset d'activité, exprimé en minutes, est défini par la différence entre l'heure de début d'activité de l'animal (six premiers intervalles de 5 minutes au cours desquels l'activité locomotrice de l'animal est supérieure à l'activité locomotrice moyenne de la phase de lumière) et l'heure d'extinction de la lumière. La température corporelle est enregistrée toutes les 5 minutes. Plusieurs paramètres sont également extraits manuellement des enregistrements : la température moyenne pendant les phases de lumière et d'obscurité, la température minimale sur un jour complet. Les périodes de torpeur sont également déterminées. Un animal est considéré comme entrant en torpeur lorsque sa température corporelle descend sous les 33°C pendant plus de 6 intervalles consécutifs de 5 minutes [194,195]. La durée et la température moyenne

des événements de torpeur ainsi que la température minimale atteinte sont mesurés chaque jour.

III.C.2.c. Suivi métabolique continu

Le suivi, en continu, du métabolisme aérobie des individus a été réalisé à l'aide d'un appareil de calorimétrie indirecte (Colombus Instruments, Columbus, Ohio, Etats-Unis). Il mesure l'oxygène consommé par les animaux par intervalle de 5 minutes.

Pour cela, les animaux sont isolés dans des cages hermétiques (40 cm de longueur, 31 cm de largeur, 28 cm de hauteur) en Plexiglas recevant de l'air frais à un débit de $3\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$. Une sonde placée au fond de la cage permet l'analyse de l'air présent dans la cage. L'air est analysé à l'entrée du système et à la sortie par un analyseur qui mesure les taux d'oxygène et de dioxyde de carbone. Un logiciel (Oxymax v.4.79, Columbus Instruments, Columbus, Ohio, Etats-Unis) calcule alors différents paramètres comme la consommation d'oxygène (VO_2), la production de dioxyde de carbone (VCO_2) ou encore le quotient respiratoire (RER, $\text{RER}=\text{VCO}_2/\text{VO}_2$) qui donne une indication de la source d'énergie utilisée (lipidique ou glucidique). Le système est calibré tous les jours lors des expérimentations à l'aide de diazote pur et d'un mélange de dioxygène et de dioxyde de carbone en proportions connues.

III.C.2.d. Méthodes statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad prism 6 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA). La normalité des données a été vérifiée préalablement à tout test à l'aide de tests de Shapiro-Wilk ainsi que la présence de valeurs aberrantes à l'aide de test de Dixon. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Pour cette étude, la masse moyenne au début de l'intervention alimentaire est de $77,1 \pm 11,4\text{g}$ pour les individus CTL et $85,1 \pm 10,1\text{g}$ pour les individus RC. Du fait de la différence de masse de départ et de grande variabilité inter-individuelle, il a été choisi de travailler avec des masses corporelles normalisées par rapport à la masse corporelle au jour 0 de l'intervention alimentaire.

L'évolution de la masse corporelle normalisée a été étudiée à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs (temps et traitement) et de tests de Bonferroni post-hoc. Des ANOVA à deux facteurs (temps et traitement) ont également été utilisées pour traiter les données extraites de l'activité locomotrice et de la température corporelle (valeurs des phases de lumière/ phases d'obscurité, valeurs moyennes, Onsets). Les comparaisons journalières entre les groupes ont été étudiées à l'aide de tests post-hoc de Bonferroni. Les autres données, nombre d'événements de torpeur pour les semaines 1 et 2 données moyennes de torpeur des individus RC, ont été analysées à l'aide de tests de comparaison de moyenne. Lors d'analyse des mêmes individus à deux moments différents nous avons utilisé des tests de Student appariés si la variance des deux échantillons était égale (Statistique de test : statistique de Student notée t) ou des tests de rangs signés de Wilcoxon si la variance des deux échantillons était différente (Statistique de test : somme des rangs positifs notée W). Lors d'analyse de la différence entre les deux groupes à un moment donné nous avons utilisé des tests de Student non-appariés si la variance des deux échantillons était égale (Statistique de test : statistique de Student notée t) ou des tests de Mann Whitney si la variance des deux échantillons était différente (Statistique de test : statistique de Mann-Whitney notée U). Les corrélations entre paramètres ont été obtenues par application de régressions linéaires aux données expérimentales.

III.C.3. Etude 2 : Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)

III.C.3.a. Démarche expérimentale

28 mâles adultes issus de la colonie de Brunoy ont été utilisés pour cette étude. Leur âge, au moment de l'expérimentation, variait de 1 à 4 ans (2.4 ± 1.1). Durant toute la durée de l'étude, les animaux ont été soumis à une photopériode estivale (jours longs soit 14h de lumière alternant avec 10h d'obscurité). La température et l'humidité ont été maintenues constantes à $T=25^{\circ}\text{C}$ et $H=55\%$. Dans la nature, ces conditions favorisent un haut niveau d'activité des individus. Afin de contrôler leur alimentation, les individus ont été isolés au début du protocole de nourrissage. Cependant, les conditions de captivité autres que l'alimentation (température, humidité, photopériode) sont restées identiques.

L'étude a duré au total 6 semaines (Figure 20). Durant les trois premières semaines, les animaux ont été maintenus au sein de l'élevage et ont été nourris avec de la bouillie, des fruits frais et de l'eau *ad-libitum*. Pour le traitement alimentaire, les animaux ont été séparés en deux groupes : un groupe contrôle (CTL) nourri avec 21g du régime expérimental décrit dans le tableau 1 pour un total de 105kJ/jour et un groupe restreint (RC) recevant 40% de calories en moins que la groupe CTL soit 12,6 g du régime expérimental décrit dans le tableau 1 pour un total de 63kJ/jour. Durant la période d'intervention alimentaire, les animaux sont pesés tous les deux jours afin de s'assurer que leur masse corporelle ne descende pas sous les 55g (masse critique à partir de laquelle les animaux sont exclus de l'expérience pour ne pas les mettre en danger).

La première semaine correspond à une première session de test (session 1) d'une durée de 4 jours. Les animaux sont soumis à une mesure de leur métabolisme basal et de leurs performances physiques (jour 1) et à un test d'apprentissage utilisant le dispositif de discrimination visuelle (jours 2, 3 et 4).Après cette première session de test, les animaux sont laissés au repos pour une durée de 2 semaines. Ils sont ensuite isolés et séparés en deux groupes expérimentaux avec traitement alimentaire correspondant. Les groupes expérimentaux sont constitués de façon à ce que les résultats de la première session de test et les âges soient homogènes entre les deux groupes avec 14 individus CTL et 14 individus RC. Ils sont nourris conformément à leur assignation pour les 19 jours suivants. La seconde session (session 2) de tests se déroule après 16 jours de traitement alimentaire suivant le même ordre que la première. Pour le test de discrimination visuelle, la session d'habituation est remplacée par un test de mémoire de l'apprentissage effectué lors de la première session de tests (session 1). Les stimuli visuels utilisés lors du test de discrimination visuelle sont pour l'apprentissage de la session 1 et le test de mémoire de la session 2 : un triangle en plastique noir de 22 cm² (plateforme fixe) et un rond en carton blanc de 22,5 cm² (plateforme mobile). Pour l'apprentissage de la session 2, un rectangle en gomme verte de 30 cm² présentant des cercles noirs concentriques (plateforme fixe) et une étoile bleue en papier rigide se 22,5 cm² ont été utilisés. Ces deux paires de stimuli ont été décrites comme efficace lors de la validation du test [185]. Des mesures de glycémie et cétonémie ont été ajoutées au

protocole lors d'une augmentation de l'effectif expérimental initial et effectuées sur 10 individus (5 CTL, 5 RC) régulièrement au cours de l'intervention alimentaire.

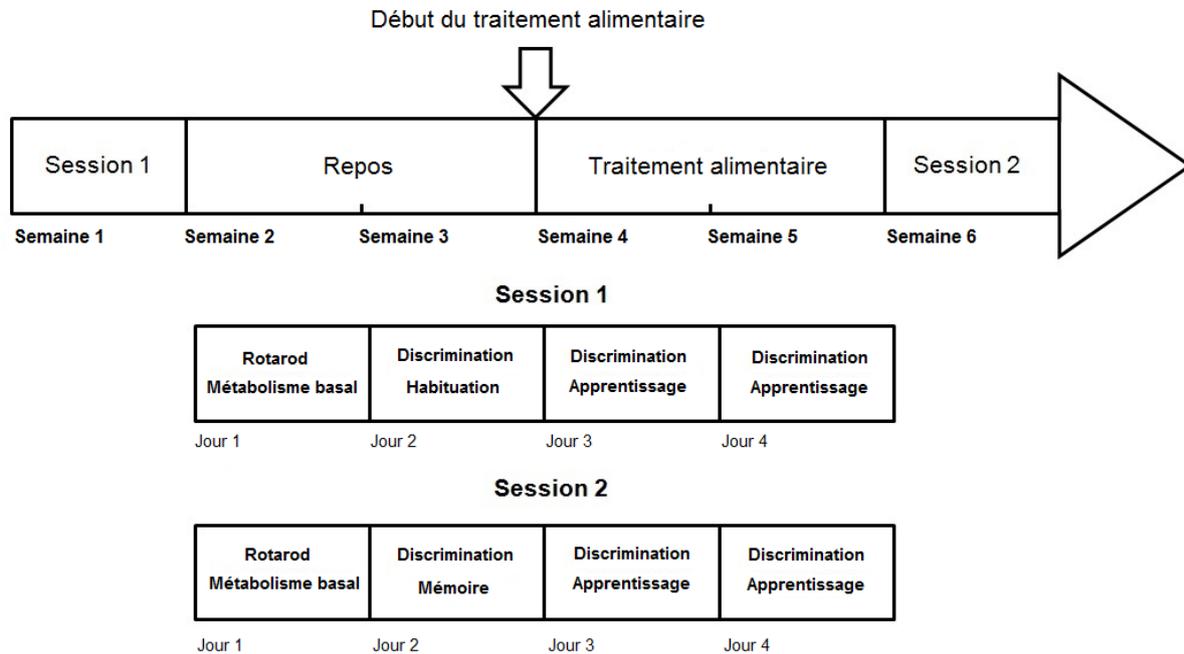


Figure 20 : Calendrier expérimental de la manipulation expérimentale : Changements quantitatifs de l'alimentation à court terme et plasticité comportementale acquise.

III.C.3.b. Test de discrimination visuelle

Ce dispositif adapté de la plate-forme de saut de Lashley [196] permet de tester les facultés d'apprentissage et de mémoire des animaux. Il a la particularité de ne pas nécessiter de renforcement alimentaire, ce qui le rend particulièrement adapté aux études sur la restriction calorique [185].

Le dispositif prend la forme d'une cage verticale d'une hauteur de 150cm composée de trois faces en contre-plaqué et d'une vitre sans tain en plexiglas permettant l'observation des individus (Figure 21). Une lampe de 50W, placée au centre de la face supérieure du dispositif permet l'éclairage de ce dernier.

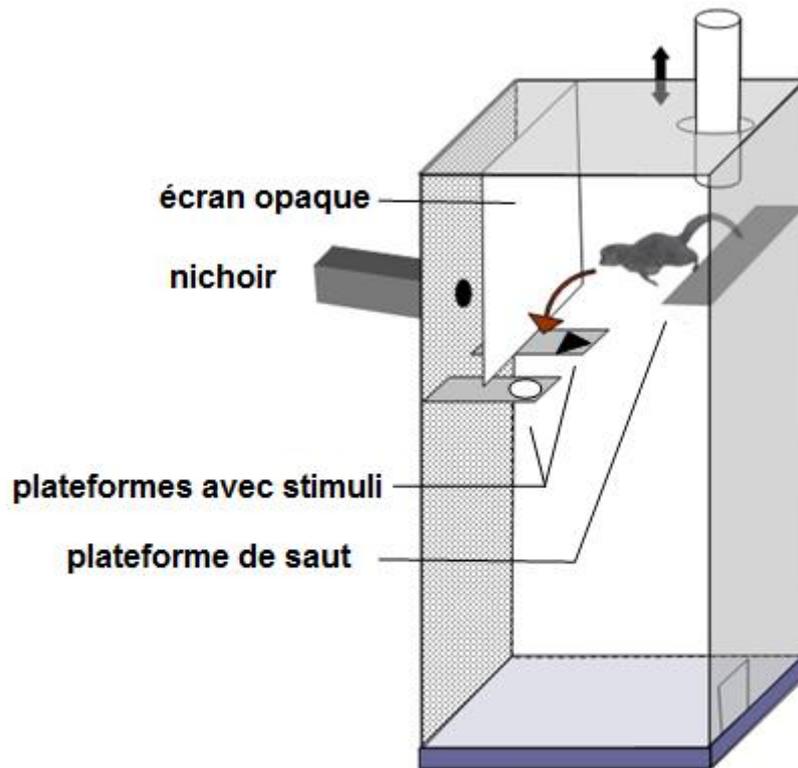


Figure 21 : Dispositif de discrimination visuelle adapté au microcèbe (d'après [185]).

Le dispositif est composé de trois plateformes mobiles. La plateforme de saut est une plateforme en plastique surélevée sur laquelle l'animal débute le test après y avoir été placé à l'aide d'un cylindre noir mobile en plastique dont l'ouverture donne sur la face supérieure du dispositif. Cette plateforme peut être régulièrement inclinée pour inciter l'animal à sauter. Les deux autres plateformes sont situées en contrebas de la plateforme de saut. Ce sont deux planches de bois (15x30cm) espacées par un vide de 35cm. Ces plateformes se maintiennent en équilibre à l'aide d'un système de poulies et de contrepoids. Elles peuvent être laissées mobiles ou être fixées par un crochet. L'animal doit sauter sur une de ces plateformes afin d'avoir accès à la sortie du dispositif. Une plateforme fixe centrale peut être ajoutée au dispositif pour les phases d'habituation. Un écran opaque en Plexiglas[®] est placé et empêche l'animal de sauter directement dans l'ouverture de sortie. Si l'animal saute sur la bonne plateforme, il devra passer par une ouverture de l'écran de Plexiglas[®] et aura accès à son nicheoir situé derrière une des faces du dispositif. Si l'animal saute sur la mauvaise plateforme, celle-ci s'effondrera sous son poids et l'animal tombera sur la

face inférieure du dispositif sur laquelle est placé un oreiller pour éviter toute blessure. Une trappe sur la face droite du dispositif permettra de placer un nichoir sur la face inférieure du dispositif permettant de récupérer l'animal en minimisant son stress. L'individu sera alors replacé directement dans le cylindre de départ. Les deux plateformes d'arrivée se distinguent par un stimulus visuel placé sur chacune. La paire de stimuli utilisée est choisie aléatoirement parmi un ensemble de 20 paires. Pour chaque paire les stimuli sont choisis de manière à être facilement discriminables pour éviter tout biais visuel. Les deux stimuli d'une paire diffèrent par leur forme, leur couleur, leur éclat ainsi que par leur texture.

Chaque session comprend 3 jours. Le premier correspond à une phase d'habituation au dispositif. Elle ne met en jeu aucun stimulus visuel et comprend 7 essais. Lors de cette phase l'animal n'a pas de choix pour la plateforme cible et celle-ci est toujours rendue fixe. Pour chacun des essais, l'animal est placé dans le cylindre de départ pour une durée de 1 minute. Le cylindre est ensuite levé pour que l'animal puisse avoir accès à la totalité de la plateforme de saut. Les deux premiers essais sont menés avec une plateforme cible centrale sans la plaque de Plexiglas[®] opaque permettant ainsi à l'animal de voir l'emplacement de la sortie du test. Les deux essais suivants sont menés avec la même plateforme centrale mais cette fois, la plaque opaque est présente. Les trois derniers essais sont menés avec les plateformes d'arrivée utilisées pendant le test suivant une séquence "droite-gauche-droite" ou "gauche-droite-gauche". Pour ce test chaque essais réussi (l'animal saute sur une plateforme avant de rentrer dans son nichoir), l'animal est récompensé par un temps de repos de 2 minutes avant d'être replacé dans le cylindre de départ. Si l'animal ne saute pas sur une plateforme, il est récupéré à l'aide d'un nichoir placé sur la face inférieure du dispositif. Il est alors remis directement dans le cylindre de départ. Lorsque l'animal reste immobile sur la plateforme de saut, celle-ci est légèrement inclinée afin d'accroître la motivation de l'animal.

Les deux jours suivants sont consacrés au test d'apprentissage. Il consiste en un maximum de 2 sessions de 30 essais maximum chacune. Chaque essai a une durée maximale de 5 minutes. L'animal doit atteindre un critère d'apprentissage fixé à 8 essais réussis sur 10 essais consécutifs pour mettre fin au test. Si l'animal n'atteint pas ce critère la session continue jusqu'à la fin des 30 essais. Si l'animal n'atteint pas

le critère lors de la première session il dispose d'une deuxième session de 30 essais maximum. Pour chaque essai chaque plateforme est associée aléatoirement avec un des stimuli de la paire utilisée. L'animal doit associer un des indices avec la plateforme fixe qui lui permettra de rejoindre son nichoir. L'autre indice indiquera la plateforme mobile qui s'effondrera sous l'effet de son poids en cas de saut sur celle-ci. Si l'animal saute sur la plateforme fixe, il est récompensé par un temps de repos de 2 minutes avant d'être replacé dans le cylindre de départ. L'essai est noté comme un succès. Si l'animal saute sur la plateforme mobile, il est récupéré à l'aide d'un nichoir placé sur la face inférieure du dispositif. Il est alors remis directement dans le cylindre de départ et l'essai est noté comme un échec. Lorsque l'animal évite le test (saut dans le vide, accroché à la vitre ou à une face du test, sauts répétés dans le cylindre de départ, refus de saut pendant 5 minutes), l'essai est noté comme un refus. Si l'animal effectue 5 refus consécutifs, la session prend fin.

Lors des sessions suivantes, la phase d'habituation est remplacée par un test de mémoire. Ce test consiste en une session de 30 essais maximum ou l'animal doit atteindre le critère de 8 essais réussis sur 10 essais consécutifs. La paire de stimuli utilisée correspond à celle utilisée lors du dernier apprentissage de l'animal. Les mêmes critères de notation que pour le test d'apprentissage sont utilisés. Pour les tests de mémoire et d'apprentissage, le nombre total d'essais avant d'atteindre le critère, le nombre total d'essais réussis, le nombre total d'échec et de refus ont été relevés. Le taux de réussite a été défini comme le nombre d'essais réussis sur le nombre d'essais total.

Nous avons récemment décrit et validé l'utilisation de ce dispositif à travers le test d'une cohorte d'individus jeunes et âgés [185]. Les résultats de cette étude n'indiquent pas d'influence de l'âge sur la capacité d'apprentissage des individus lors de deux tests séparés d'un mois. Les individus des deux groupes présentent également des progrès lors du second test qui nécessite moins d'essais de leur part. La rétention de la première discrimination, elle aussi testée un mois après le premier apprentissage, montre, quant à elle, une meilleure performance des individus jeunes qui atteignent directement le critère de rétention. Cette étude a permis de montrer que ce dispositif permettait une évaluation rapide et efficace de la cognition chez le microcèbe.

III.C.3.c. Mesure de coordination motrice et d'endurance : Rotarod®

(Figure 22)

Ce test permet une quantification de la coordination motrice, de l'équilibre mais également de l'endurance des individus. Le résultat du test est obtenu en mesurant le temps maximum durant lequel un individu réussit à se maintenir en équilibre sur un cylindre rotatif présentant une accélération progressive (Rotarod®, modèle 7750, Ugo Basile, Italie). Le cylindre, d'un diamètre de 5 cm, est légèrement cranté pour éviter aux individus de glisser. Il est entraîné par un moteur qui permet sa rotation dont la vitesse augmente progressivement pour atteindre 40 tours par minute au bout de 5 minutes.



Figure 22 : Dispositif expérimental de test de coordination motrice et d'endurance : Rotarod®.

Pour chaque essai, l'animal est placé sur le cylindre entraîné à une vitesse de 20 trs/min. La vitesse est ensuite augmentée régulièrement jusqu'à la fin de l'essai. Un essai est considéré comme terminé lorsque l'individu tombe du cylindre ou s'agrippe à celui-ci durant un minimum de trois tours consécutifs sans arriver à rétablir son équilibre. Le temps avant la perte d'équilibre ou la chute est relevé pour chaque essai. Les animaux doivent réaliser 5 essais maximum dont le meilleur servira de résultat au test. Le système est nettoyé entre chaque essai. Les animaux sautant du dispositif sont exclus des analyses.

III.C.3.d. Mesure du métabolisme basal

Le métabolisme basal des individus est déterminé par la mesure de leur consommation en oxygène dans l'enceinte d'un respiromètre en circuit fermé. La mesure est effectuée pendant la période d'inactivité de l'animal (phase de lumière).

Chaque animal est placé dans une chambre de 2.5l, elle-même placée dans une étuve à une température constante de 25°C. L'animal dispose de 20 minutes afin de s'habituer au dispositif. Durant ce laps de temps, la ventilation est constante avec un débit de 2 l.min⁻¹. A la suite de cette phase d'habituation, la ventilation est coupée pendant une durée de 40 min. La quantité d'oxygène consommée durant cet intervalle de temps est mesurée par différence de concentration initiale et finale en oxygène dans l'enceinte relevée à l'aide d'un analyseur (Servomex 570 A[®]) calibré régulièrement à l'aide de diazote pur. Le métabolisme basal de l'animal est ensuite calculé en fonction de sa masse corporelle.

III.C.3.e. Mesure de la glycémie

La glycémie des individus a été relevée à jeun avant distribution de la nourriture. Les animaux sont capturés dans leur nichoir pour réduire le stress engendré par une capture. Le sang est prélevé sur la veine saphène située à l'arrière du mollet de l'animal. Une goutte suffit par bandelette de test. 3 bandelettes sont utilisées par test de glycémie. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un glucomètre (Glucofix[®] Premium, Menarini Diagnostics S.r.l, Firenze, Italie) et des bandelettes adaptées (Glucofix[®] Sensors, Menarini Diagnostics S.r.l, Firenze, Italie). La valeur moyenne des mesures est utilisée afin de réduire les possibles variations engendrées par les stress.

III.C.3.f. Méthodes statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad prism 6 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA). La normalité des données a été vérifiée préalablement à tout test statistique à l'aide de tests de Shapiro-Wilk ainsi

que la présence de valeurs aberrantes à l'aide de test de Dixon. Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Pour cette étude, les animaux des deux groupes ont une masse moyenne similaire au début de l'intervention alimentaire. Cette masse est de $80 \pm 12,8$ g pour les individus CTL et $80 \pm 11,1$ g pour les individus RC. Cependant, du fait de la variabilité des masses corporelles au départ il a été choisi de travailler avec des masses corporelles normalisées par rapport à la masse corporelle au jour 0 de l'intervention alimentaire.

Les évolutions de la masse corporelle normalisée et de la glycémie ont été étudiées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs (temps et traitement) associée à des tests de Bonferroni post-hoc. L'analyse des données de Rotarod, de métabolisme basal et de discrimination a été effectuée à l'aide de tests de comparaison de moyennes. Lors d'analyse des mêmes individus à deux moments différents nous avons utilisé des tests de Student appariés si la variance des deux échantillons était égale (Statistique de test : statistique de Student notée t) ou des tests de rangs signés de Wilcoxon si la variance des deux échantillons était différente (Statistique de test : somme des rangs positifs notée W). Lors d'analyse de la différence entre les deux groupes à un moment donné nous avons utilisé des tests de Student non-appariés si la variance des deux échantillons était égale (Statistique de test : statistique de Student notée t) ou des tests de Mann Whitney si la variance des deux échantillons était différente (Statistique de test : statistique de Mann-Whitney notée U). Les corrélations entre paramètres ont été obtenues par application de régressions linéaires aux données expérimentales.

Pour l'analyse statistique, les individus refusant de sauter lors du test de discrimination ont été exclus (CTL n = 4, CR n = 7). De même, les individus pour lesquels aucune donnée de test de Rotarod n'a pu être récoltée lors de la seconde session de tests, ont été exclus des analyses (CTL n=1, CR n=3).

III.D. Changement qualitatifs de l'alimentation à long terme et plasticité comportementale acquise - Supplémentation en AGPI n-3 et comportement

III.D.1. Sujets et conditions expérimentales

20 animaux adultes issus de la colonie de Brunoy ont été utilisés pour cette étude. Leur âge, au début de l'expérimentation, variait de 1 à 4 ans ($3 \pm 0,6$). Ces animaux ont été placés à 2 par cage suivant leur masse corporelle et le groupe auquel ils appartenaient (contrôle (CTL) ou supplémentés en AGPI n-3 (AGPI n-3)). Ceci favorise le bien être des animaux en leur permettant des interactions sociales sans compromettre l'expérimentation. Les animaux ont été pesés toutes les semaines et les groupes ont été ajustés en conséquence. L'écart maximal de poids entre deux individus de la même cage ne devait pas dépasser 10g sous peine de conflits sociaux.

III.D.2. Intervention alimentaire

Les animaux ont été nourris *ad libitum* avec le même régime expérimental que dans la première partie (Figure 1) auquel de l'huile a été ajoutée (huile d'olive pour les CTL, huile de thon pour les AGPI n-3) et des fruits frais, une fois par semaine. L'apport en huile dans la bouillie a été calculé en fonction des recommandations européennes [197] qui s'établissent à 0,06% de l'énergie totale ingérée en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et 0,3% en acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3). Pour cette étude, la quantité correspondait à 0,153g d'huile de thon pour 100g de bouillie. La bouillie des animaux CTL a été enrichie de la même quantité d'huile d'olive riche en acides gras monoinsaturés et naturellement pauvre en AGPI n-3.

III.D.3. Démarche expérimentale

Le comportement des animaux a été évalué tous les 6 mois pendant une durée de 18 mois correspondant à 4 sessions de tests. Le test de tous les individus s'est déroulé sur un total de 8 semaines. Comme les animaux provenaient de deux lots d'animalerie décalés d'un mois, la durée maximale entre le test du premier et du

dernier des animaux d'un même lot n'a pas excédé 4 semaines. Ceci a permis de tester les animaux à la même période de l'année. Chaque session de test a duré 5 jours. Le premier jour a permis de tester des aptitudes physiques des individus à l'aide du Rotarod (suivant le même protocole que celui décrit pour l'étude RC-Cog, voir page 58). Le deuxième jour s'est déroulé un test d'émotivité en openfield. Enfin les troisièmes, quatrièmes et cinquièmes jours ont permis de tester les capacités d'apprentissage et de mémoire des individus à l'aide du dispositif de discrimination visuelle (suivant le même protocole que celui décrit pour l'étude RC-Cog, voir page 54).

A l'issue des 18 mois de supplémentation, 6 individus (3 CTL et 3 AGPI n-3) ont été choisis parmi les groupes en fonction de leur réussite aux tests de discrimination (animaux ayant réussi la tâche à T6, T12 et T18 mois). Ces animaux ont été sacrifiés pour mettre en évidence la neurogenèse. Leur sang a également été prélevé pour une analyse des lipides circulants totaux.

III.D.4. Test d'openfield

Le test d'openfield utilisé au cours de ce travail se base sur le test développé par Hall chez le rat [198,199]. Ce test est principalement utilisé pour évaluer l'anxiété des individus [200]. Chez le microcèbe placé dans un nouvel environnement, des comportements tels qu'une immobilité prolongée et une exploration limitée marquent un haut niveau de stress et d'anxiété, rendant ce test particulièrement intéressant pour suivre ces paramètres.

Le système expérimental utilisé est une enceinte en plexiglas opaque et brillante (100x100x20cm) couverte par une plaque de plexiglas transparente empêchant l'animal de s'échapper (Figure 23). Le dispositif est placé dans une pièce sans lumière. Quatre lampes à lumière rouge d'une puissance de 15W chacune sont placées à chaque coin de l'enceinte afin d'obtenir une lumière homogène dans le dispositif. Chaque session est filmée par une caméra et analysée par un système de vidéotracking (VideoTrack, ViewPoint Behavior Technology, Lyon, France).

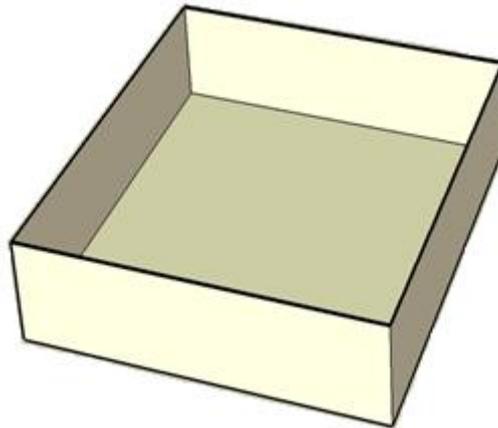


Figure 23 : Schéma simplifié de l'enceinte permettant le test d'openfield.

Chaque session dure 30 minutes au cours desquelles un individu est placé dans un coin de l'enceinte (le même pour tous les animaux) avec la possibilité d'explorer ce nouvel environnement. A la fin de ces 30 minutes, le nichoir de l'animal est placé dans un angle du champ d'étude (le même pour tous les animaux) limitant ainsi le stress de capture en fin de session. Trois paramètres sont mesurés durant chaque session : la latence au premier mouvement d'exploration (exprimée en secondes), la durée de déplacement dans le dispositif (exprimée en secondes) ainsi que la distance totale parcourue par l'individu (exprimée en centimètres). Généralement, la latence au premier mouvement est un bon indicateur de l'état émotionnel de l'animal avec une latence importante en cas d'anxiété. De même, la durée d'exploration ainsi que la distance totale parcourue sont deux mesures reflétant bien le comportement exploratoire de l'individu [201].

III.D.5. Analyse des lipides sanguins circulants

L'analyse de la composition en lipides circulant a été effectuée au sein du laboratoire "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques" de l'Université Aix-Marseille sur des échantillons de sang de 6 individus (CTL n = 3, AGPI n-3 n = 3) prélevés sur héparine après 18 mois de traitement alimentaire centrifugés, et dont le plasma est stocké à - 80 °C. Les lipides totaux ont été extraits du plasma centrifugé à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1) selon la méthode de Folch [202]. Les phospholipides totaux ont ensuite été séparés par chromatographie liquide en phase solide sur des billes de silice, l'élution séquentielle a été faite avec du chloroforme,

puis du méthanol contenant la fraction phospholipidique [203]. Tous les éluants ont été séchés avec de l'azote et les fractions phospholipidiques ont été transmethylées avec 10 % de trifluorure de bore (Fluka, Sokolab) à 90 °C pendant 20 minutes [204]. Les esters méthyliques d'acides gras ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse [205].

III.D.6. Mesure de la neurogenèse

III.D.6.a. Préparation des coupes et coloration

La neurogenèse chez les deux groupes d'animaux a été mise en évidence par immunohistochimie. Le bromodéoxyuridine (BrdU, 10 mg/mL, dissous dans 0.9% NaCl), analogue de la thymidine, a été injecté en intrapéritonéal à une dose de 50 mg/kg, deux fois par jour durant 2 semaines chez 6 animaux (3 animaux CTL et 3 animaux AGPI n-3), qui ont été choisis pour leur performance aux tests cognitifs (animaux ayant réussis la tâche de discrimination visuelle à T6, T12 et T18 mois). Les microcèbes ont été euthanasiés 20h après la dernière injection de BrdU. Pour cela, ils ont été anesthésiés profondément avec 50 mg/mL de phénorbital et perfusés avec du paraformaldéhyde à 4% dans 0.1 mol/L de PBS, suivi par la fixation des cerveaux par immersion dans le même fixateur pendant 24h à 4°C. Ils ont ensuite été placés dans une solution de sucrose/azide/PBS pendant plusieurs jours puis ont été congelés par immersion dans de l'isopentane à -40°C pendant 2-3 min. Des sections en série de 7.5 µm ont été réalisées sur cryostat à -20°C puis ont été montées sur des lames superfrost + et placées à -80°C. Les sections ont ensuite été rincées dans une solution de tampon phosphate (PBS) Tween à 0.1% (3 fois 15 min), puis placées dans du tampon citrate chaud durant 20 min. Les sections ont été de nouveau rincées avec la solution de PBS Tween 0.1% (3 fois 15 min). Chaque section a été ensuite bloquée pendant 20 min avec 500 µL d'une solution de blocage (2% BSA PBS Tween 0,1%) et placée dans une chambre humide. Deux solutions d'anticorps primaires ont été préparées, la première contenant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre BrdU, dilué au 1 : 200 et un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre NeuN, dilué au 1 : 1000, et la seconde contenant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre BrdU et un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre GFAP, dilué au 1 : 1000. Les lames ont été séparées en trois groupes et ont

reçu 250 μ L soit de la solution d'anticorps BrdU/NeuN, soit de la solution d'anticorps BrdU/GFAP, le dernier groupe gardant le tampon de blocage (lames contrôles). Les lames ont été de nouveau mises en chambre humide, toute la nuit, à 4°C puis ont été rincées au PBS Tween 0.1% (3 fois 15 min). 250 μ L d'une solution d'anticorps secondaires contenant un anticorps Alexa Fluor 555, anti-souris, dilué au 1 : 500 et un anticorps Alexa Fluor 488, anti-lapin, dilué au 1 : 500, ont été déposés sur chaque lame. Les lames ont été mises en incubation pendant 1h, dans la chambre humide. Elles ont ensuite été lavées au PBS Tween 0,1% (2 fois 15 min) puis au PBS pendant 15 min. Une goutte de milieu de montage avec du DAPI a été déposée sur la lame et couverte d'une lamelle en verre. Les lames ont été scellées avec du vernis puis mises à sécher pendant 5 min. Les lames montées ont alors été placées à 4°C pendant quelques heures avant observation au microscope à fluorescence.

III.D.6.b. Analyse des lames

Pour cette étude, différentes zones du cerveau du microcèbe ont été analysées afin d'observer l'influence des AGPI n-3 sur la neurogénèse : le bulbe olfactif (OB), l'amygdale, la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (DG) et la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux (SVZ). Ces zones ont été choisies car ce sont des zones dans lesquelles le processus de neurogénèse, ou la présence de nouveaux neurones, a déjà été décrite chez d'autres mammifères et par ailleurs des zones cérébrales impliquées dans la mémoire (hippocampe, avec le gyrus denté) et les émotions (amygdale) [25]. Les cellules co-marquées avec NeuN et BrdU ont été comptées sur chaque zone, à des niveaux de coupes différents.

III.D.7. Méthodes statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad prism 6 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA). La normalité des données a été vérifiée préalablement à tout test à l'aide de tests de Shapiro-Wilk ainsi que la présence de valeurs aberrantes à l'aide de test de Dixon. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

Du fait de l'existence d'un effet d'habituation et du manque de motivation des individus au test, le test de la plateforme circulaire n'a pu être reproduit après le test basal à T0. De même le test d'Openfield n'a pas été reproduit au douzième mois après un test à 6 mois où très peu d'animaux ont exploré le dispositif. Le test des performances physiques sur le dispositif du Rotarod n'a été renouvelé qu'une seule fois après 6 mois de traitement alimentaire. Devant la persistance des performances, il a été décidé de ne pas le reproduire. Enfin 1 individu CTL est mort aux alentours du 10ème mois de traitement (de cause naturelle, non liée à l'expérience). Il a été décidé de ne pas l'inclure dans les analyses comportementales

Pour cette étude, les analyses de l'évolution temporelle du comportement (discrimination visuelle et test d'openfield) ont été réalisées à l'aide d'analyses de variance à deux facteurs (temps et traitement) et de tests de Bonferroni post-hoc. Pour le Rotarod les différences au sein des groupes entre la première et la seconde session de test ont été analysées à l'aide de tests de rangs signés de Wilcoxon. Les différences entre groupe pour chaque session ont été analysées à l'aide de tests de Student non-appariés.

Pour l'analyse des lames de cerveau, les cellules co-marquées avec NeuN et BrdU ont été comptées sur chaque zone, à des niveaux de coupes différents. Pour les différentes zones, une moyenne du nombre de neurones BrdU positifs (BrdU+) par rapport au nombre total de neurones a été calculée à partir de mesures répétées de coupes différentes (entre 3 et 6 coupes en fonctions de la taille de la zone à compter) et ce, pour les 3 animaux de chaque groupe.

Résultats

IV.A. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (RC-Chrono)

IV.A.1. Evolution de la masse corporelle

Les animaux RC présentent une perte de poids importante dès les premiers jours d'intervention alimentaire. A la fin des 14 jours de traitement les animaux RC ont perdu en moyenne $21 \pm 4,7$ g (soit $24,9 \pm 5,4$ % de leur masse corporelle de départ) alors que les individus CTL n'ont pas changé de poids avec une variation de seulement $1,2 \pm 1,1$ g (soit $1,7 \pm 4,0$ % de leur masse corporelle de départ) (Figure 24). La masse corporelle normalisée des individus RC diffère de plus en plus de celle des individus CTL. Cette différence est significativement différente dès le deuxième jour de traitement, les statistiques sont résumées dans le tableau 2.

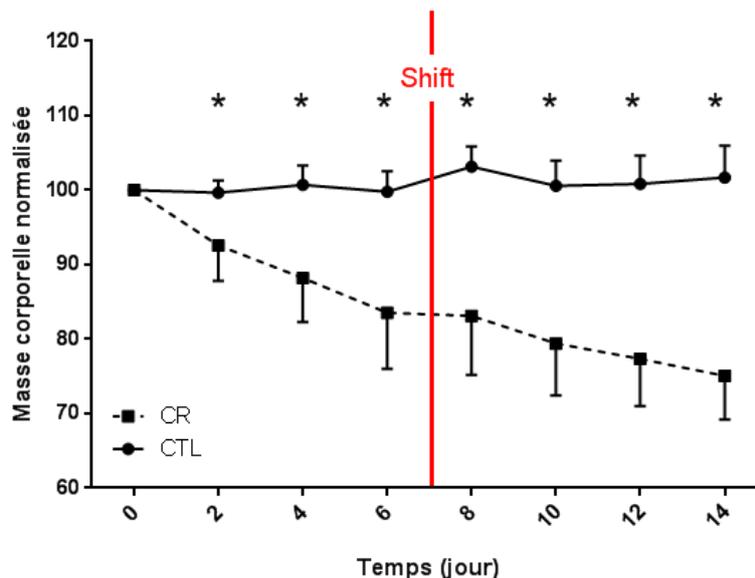


Figure 24 : Evolution de la masse corporelle normalisée (en % de la masse corporelle de départ) des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) au cours des 14 jours de traitement alimentaire. Le décalage horaire de 6 heures est matérialisé par la ligne rouge. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

	CTL	RC
Jour 0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Jour 2	99,6 ± 1,5	92,6 ± 4,5 *
Jour 4	100,7 ± 2,4	88,2 ± 5,5 *
Jour 6	99,8 ± 2,5	83,5 ± 7,0 *
Jour 8	103,2 ± 2,5	83,1 ± 7,4 *
Jour 10	100,6 ± 3,2	79,4 ± 6,5 *
Jour 12	100,8 ± 3,3	77,4 ± 5,9 *
Jour 14	101,7 ± 4,0	75,1 ± 5,4 *

Tableau 2 : Masse corporelle normalisée moyenne des individus CTL et RC au cours des 14 jours de traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative entre les deux groupes ($p < 0,05$).

IV.A.2. Suivi télémétrique

IV.A.2.a. Evolution du comportement locomoteur spontané

Les données de télémétrie ne montrent aucun changement significatif de l'activité locomotrice moyenne au cours du traitement chez les individus RC comme chez les individus CTL (Figure 25).

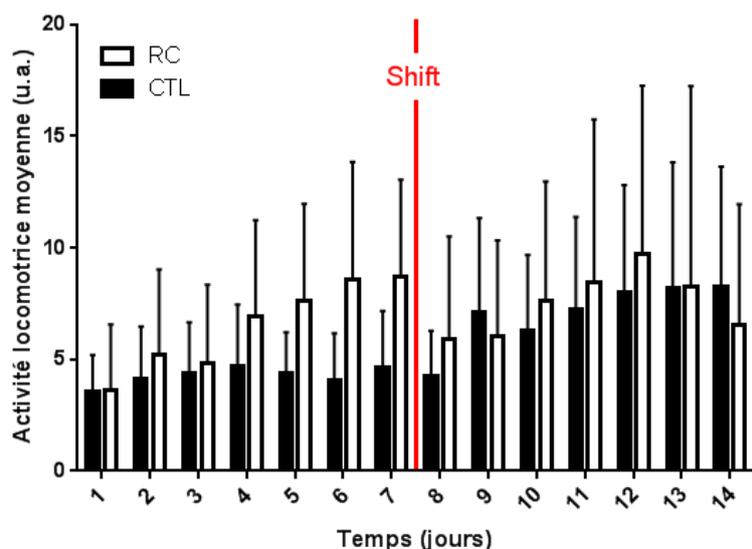


Figure 25 : Activité locomotrice moyenne des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) au cours des 14 jours de traitement alimentaire. Le décalage horaire de 6 heures est matérialisé par la ligne rouge.

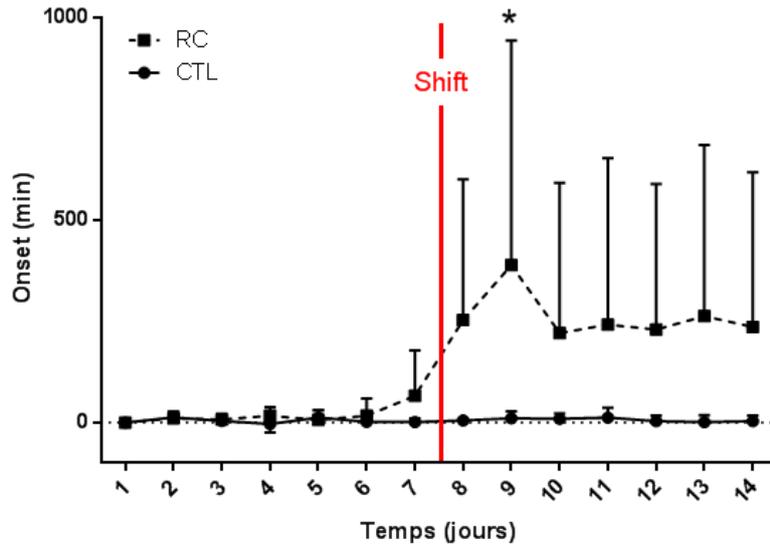


Figure 26 : Onset moyen des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) au cours des 14 jours de traitement alimentaire. Le décalage horaire de 6 heures est matérialisé par la ligne rouge. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

	CTL	RC
Jour 1	$0 \pm 0,0$	$0 \pm 0,0$
Jour 2	$12,5 \pm 13,2$	$10,6 \pm 14,5$
Jour 3	$3,8 \pm 11,1$	$7,5 \pm 12,7$
Jour 4	$-3,8 \pm 20,1$	$16,9 \pm 20,1$
Jour 5	$11,9 \pm 17,3$	$6,3 \pm 22,5$
Jour 6	$1,9 \pm 13,9$	$16,9 \pm 39,2$
Jour 7	$1,3 \pm 8,6$	$65,6 \pm 105,3$
Jour 8	$5,0 \pm 3,5$	$252,5 \pm 327,2$
Jour 9	$10,6 \pm 15,7$	$388,1 \pm 518,5 *$
Jour 10	$9,4 \pm 12,1$	$220,6 \pm 346,4$
Jour 11	$11,9 \pm 23,2$	$241,3 \pm 384,8$
Jour 12	$3,1 \pm 12,7$	$229,4 \pm 335,9$
Jour 13	$1,3 \pm 15,2$	$262,5 \pm 399,3$
Jour 14	$3,1 \pm 12,7$	$235,6 \pm 357,4$

Tableau 3 : Onset moyen (en minutes) des individus CTL et RC durant les 14 jours de traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative entre les deux groupes ($p < 0,05$).

Si aucun changement significatif de l'activité locomotrice n'est apparu au cours de l'expérimentation, les données d'onset montrent un début d'activité locomotrice avancé pour les individus RC par rapport aux individus CTL au 9ème jour de traitement alimentaire soit 2 jours après le décalage horaire (Figure 26, Tableau 3). Les données d'onset des autres jours ne montrent pas de différence significative dans le début d'activité locomotrice des individus des deux groupes qui reste situé à l'heure d'extinction de la lumière (Figure 26, Tableau 3).

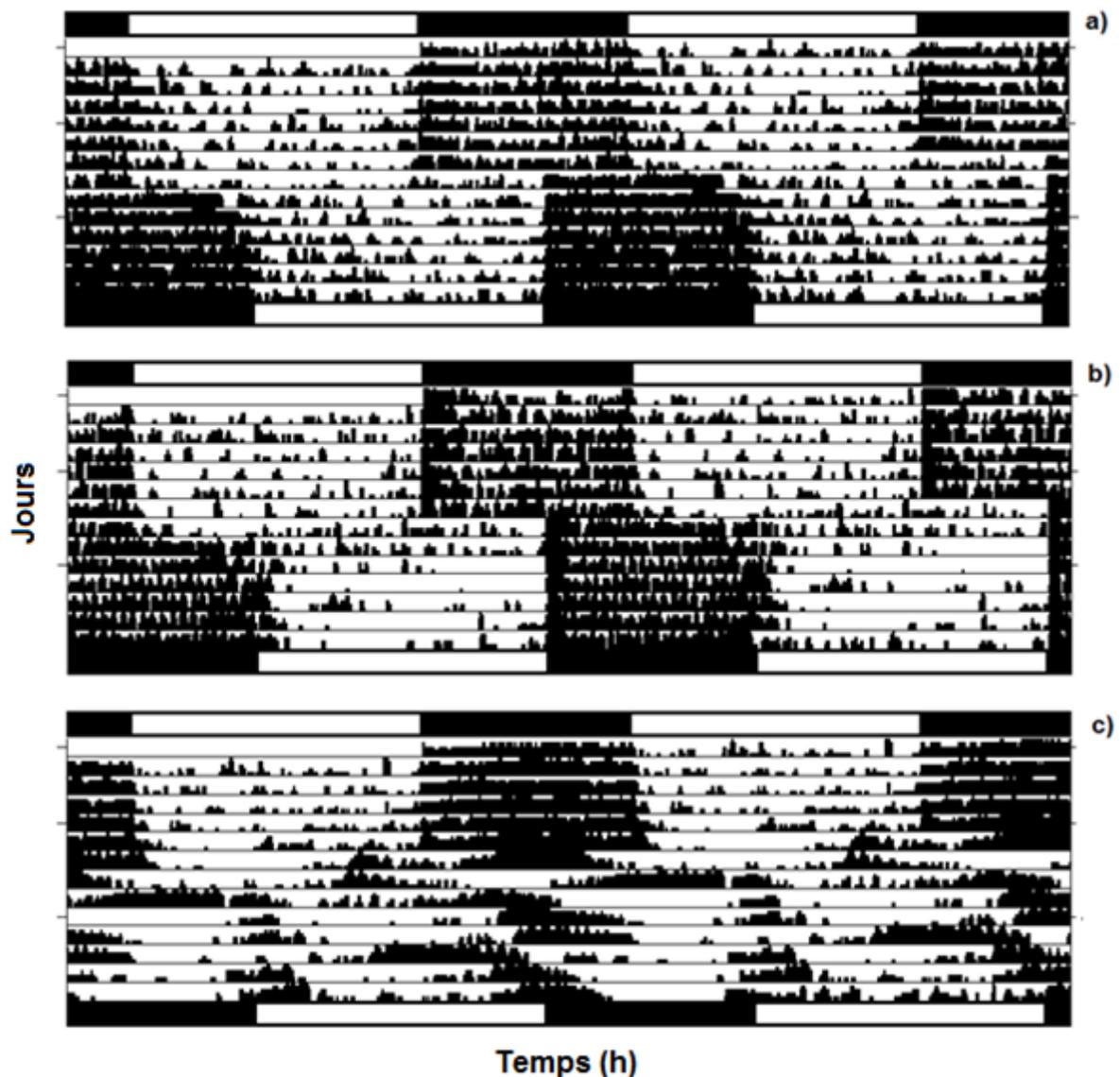


Figure 27 : Actogrammes représentatifs des réactions comportementales (activité locomotrice volontaire) a) des individus CTL ($n = 8$) b) des individus RC synchronisés sur le cycle lumineux ($n = 5$) et c) des individus RC non synchronisés sur le cycle lumineux ($n = 3$).

L'analyse des actogrammes des individus nous montre deux types de comportements locomoteurs au sein du groupe RC après le décalage horaire. Trois individus montrent des rythmes d'activité locomotrice extrêmement perturbés après le décalage horaire. Les 5 individus restants expriment, quant à eux, le même comportement que les individus CTL et synchronisent leur activité locomotrice sur le nouveau cycle lumineux (Figure 27).

IV.A.2.b. Evolution de la température corporelle

L'analyse des données de température nous montre l'utilisation d'une stratégie comportementale pour palier au déficit énergétique dû à la restriction alimentaire. Sept des 8 individus du groupe RC entrent au moins une fois en torpeur au cours du traitement alimentaire alors que l'utilisation de cette stratégie est quasi inexistante chez les individus CTL. Six individus RC l'ont utilisé au moins une fois en première semaine. Les animaux RC entrent significativement plus souvent en torpeur que les animaux CTL que ce soit en première (CTL : 0.5 ± 1.4 événements, RC : 3.1 ± 2.5 événements, $U = 11.5$, $p = 0,024$) ou en deuxième semaine (CTL : 0.4 ± 0.7 événements, RC : 7.8 ± 4.6 événements, $U = 5$, $p = 0,02$) (Figure 28). L'utilisation de cette stratégie s'accroît en deuxième semaine chez les animaux RC qui montrent un plus grand nombre d'événements de torpeur qu'en première semaine ($t = 5,11$, $p = 0,001$) (Figure 28).

Cette augmentation du nombre d'événements s'accompagne d'un allongement de la durée moyenne journalière des épisodes ($W = 28$, $p = 0,016$) qui passe de 164 ± 193 minutes la première semaine à 465 ± 397 minutes la semaine suivante. Compte tenu de l'utilisation presque exclusive de ce mécanisme chez les individus RC, la durée moyenne des événements de torpeur pour ce groupe est significativement supérieure à celle du groupe CTL et ce pour chacune des deux semaines d'expérimentation. (Semaine 1 : $U = 11$, $p = 0,018$, Semaine 2 : $U = 5$, $p = 0,002$) (Figure 29).

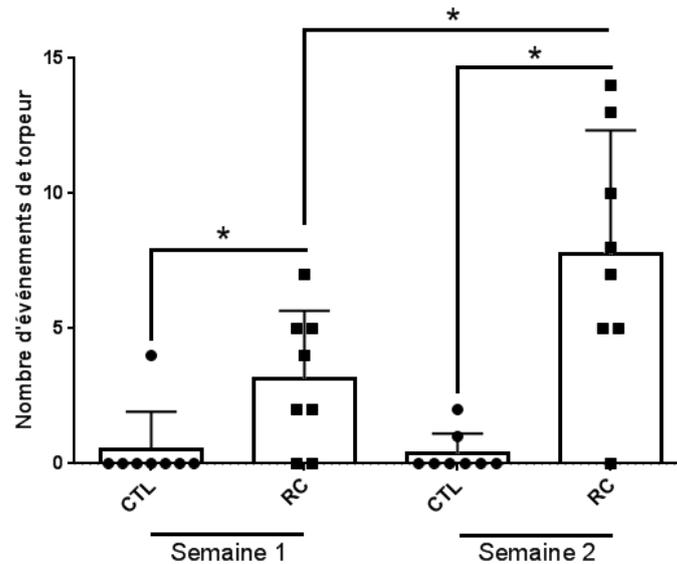


Figure 28 : Nombre d'événements de torpeur des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) avant (semaine 1) et après (semaine 2) le décalage horaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

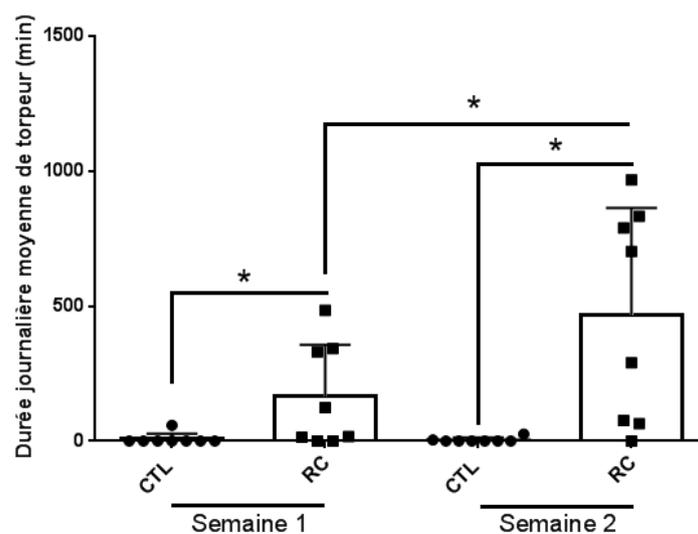


Figure 29 : Durée journalière moyenne (en minutes) des événements de torpeur des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) avant (semaine 1) et après (semaine 2) le décalage horaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative entre les deux groupes ($p < 0,05$).

Les données de températures minimales atteintes nous renseignent également sur la profondeur des épisodes de torpeur. Le suivi de ces données nous indique le maintien d'une température minimale moyenne constante pour le groupe CTL. Le groupe RC montre, quant à lui, une diminution de la température minimale moyenne

au cours du traitement jusqu'à atteindre une différence statistiquement significative avec le groupe CTL à partir du jour 8 et pour le reste jusqu'à la fin de l'expérience (Figure 30, Tableau 4).

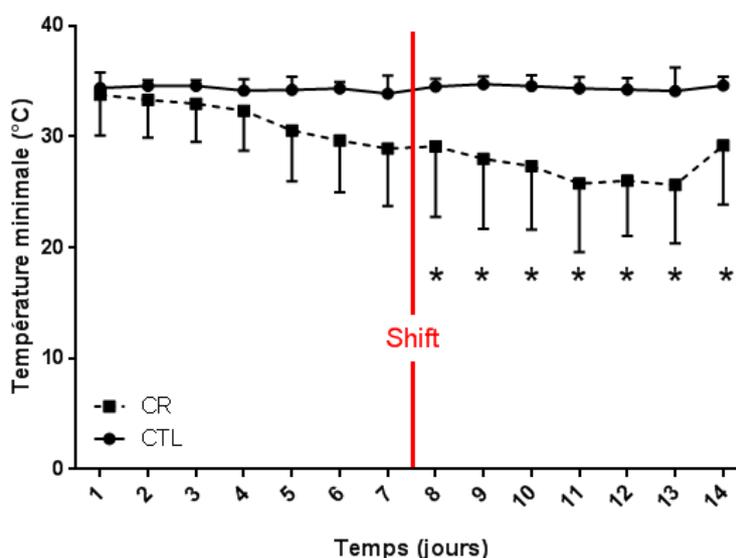


Figure 30 : Evolution de la température corporelle minimale journalière des individus CTL ($n = 8$) et RC ($n = 8$) au cours des 14 jours de traitement alimentaire. Le décalage horaire de 6 heures est matérialisé par la ligne rouge. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

	CTL	RC
Jour 1	34,4 ± 1,4	33,8 ± 3,7
Jour 2	34,6 ± 0,5	33,3 ± 3,4
Jour 3	34,6 ± 0,5	33,0 ± 3,4
Jour 4	34,1 ± 1,0	32,3 ± 3,6
Jour 5	34,2 ± 1,2	30,6 ± 4,6
Jour 6	34,3 ± 0,6	29,6 ± 4,7
Jour 7	33,9 ± 1,6	28,9 ± 5,2
Jour 8	34,5 ± 0,7	29,1 ± 6,3 *
Jour 9	34,7 ± 0,7	28,0 ± 6,3 *
Jour 10	34,5 ± 1,0	27,3 ± 5,7 *
Jour 11	34,3 ± 1,0	25,8 ± 6,2 *
Jour 12	34,2 ± 1,0	26,0 ± 5,0 *
Jour 13	34,1 ± 2,1	25,6 ± 5,2 *
Jour 14	34,6 ± 0,8	29,2 ± 5,3 *

Tableau 4 : Température minimale moyenne (en ° Celsius) des individus CTL et RC durant les 14 jours de traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative entre les deux groupes ($p < 0,05$).

L'analyse des profils de température permet également de noter une utilisation erratique de la torpeur chez les individus du groupe RC qui ne parviennent pas à se resynchroniser sur le cycle lumineux. Ces profils sont semblables aux profils d'activité locomotrice (Figure 31).

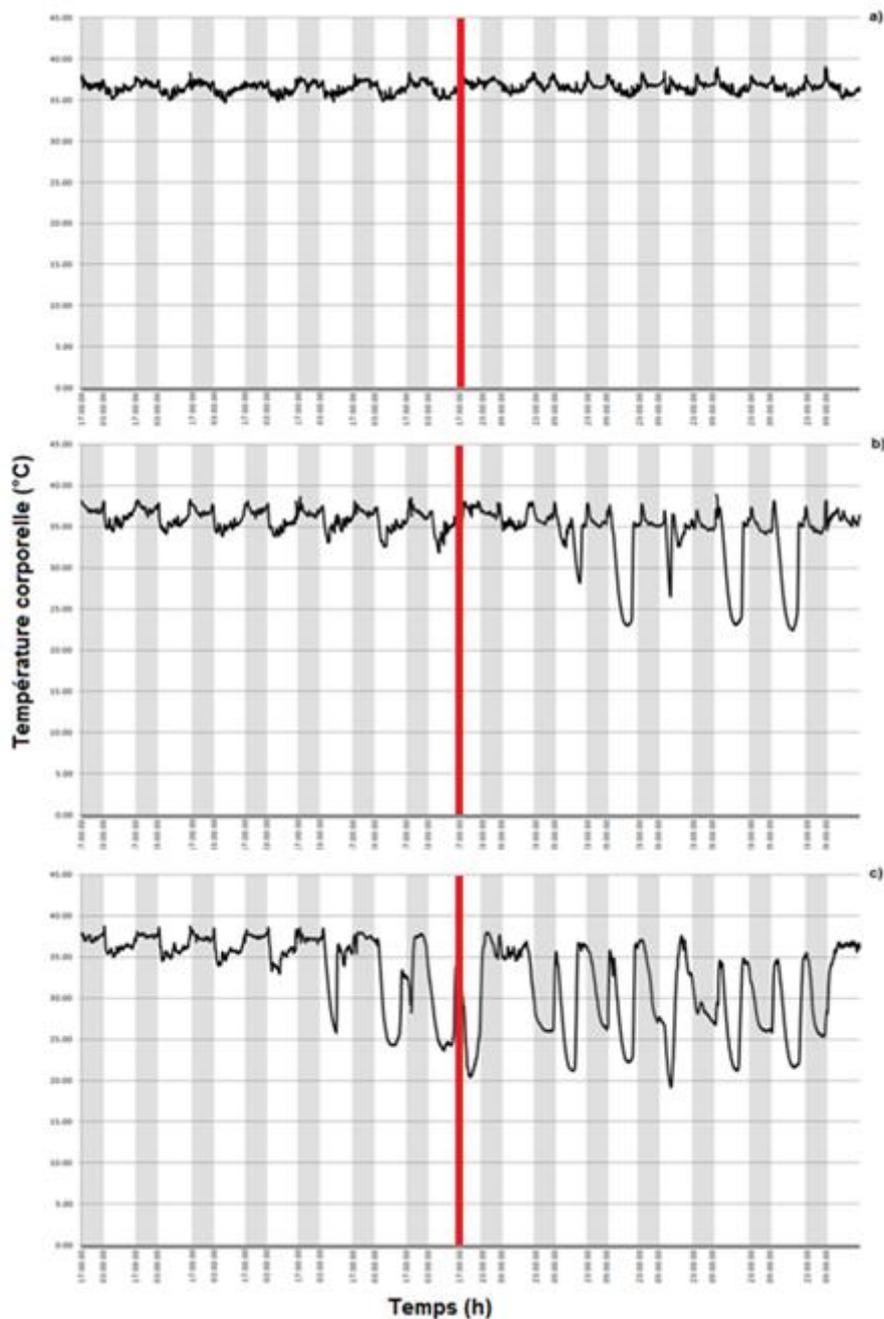


Figure 31 : Profils de température corporelle représentatifs a) des individus CTL ($n = 8$) b) des individus RC synchronisés sur le cycle lumineux ($n = 5$) et c) des individus RC non synchronisés sur le cycle lumineux ($n = 3$). Les plages blanches correspondent aux phases de lumière et les plages grises aux phases d'obscurité.

IV.A.3. Corrélations

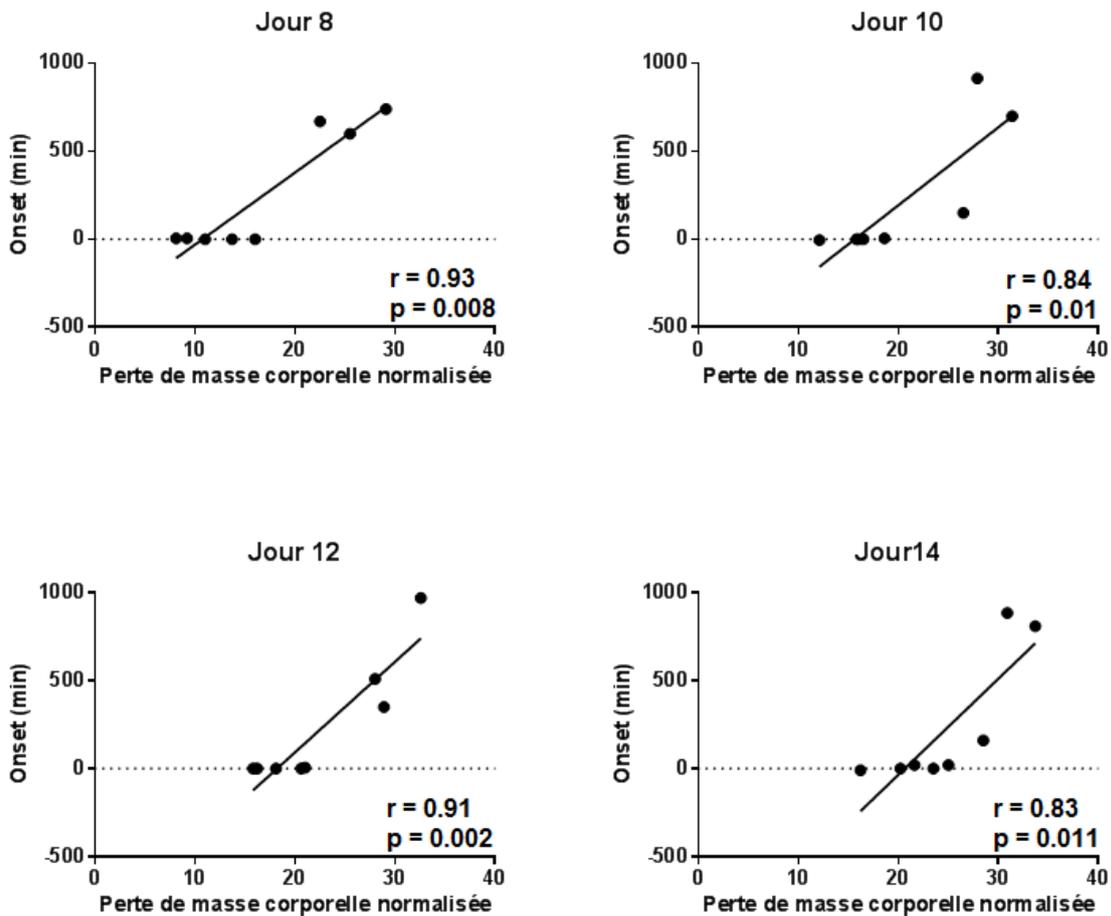


Figure 32 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée et onset pour les individus RC après le décalage horaire.

En corrélant les valeurs d'onset avec la perte de masse normalisée pour les jours suivant le décalage horaire (jours 8, 10, 12 et 14) il est possible de voir une corrélation statistiquement significative entre ces valeurs (Figure 32). Ici, les individus qui perdent le plus de poids sont ceux qui ne parviennent pas à se resynchroniser sur le nouveau cycle lumineux après le décalage horaire. Cette corrélation n'existe pas au sein du groupe CTL (jour 8 : $r = 0,01$, $p = 0,97$, jour 10 : $r = 0,20$, $p = 0,64$, jour 8 : $r = 0,16$, $p = 0,70$, jour 8 : $r = 0,18$, $p = 0,67$).

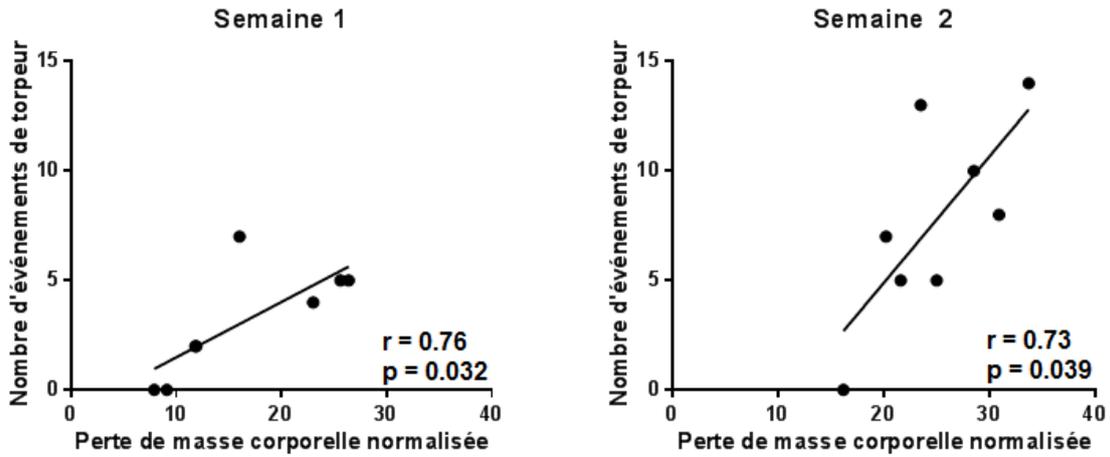


Figure 33 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée (au dernier jour de la semaine) et nombre d'événements de torpeur pour les individus RC avant et après le décalage horaire.

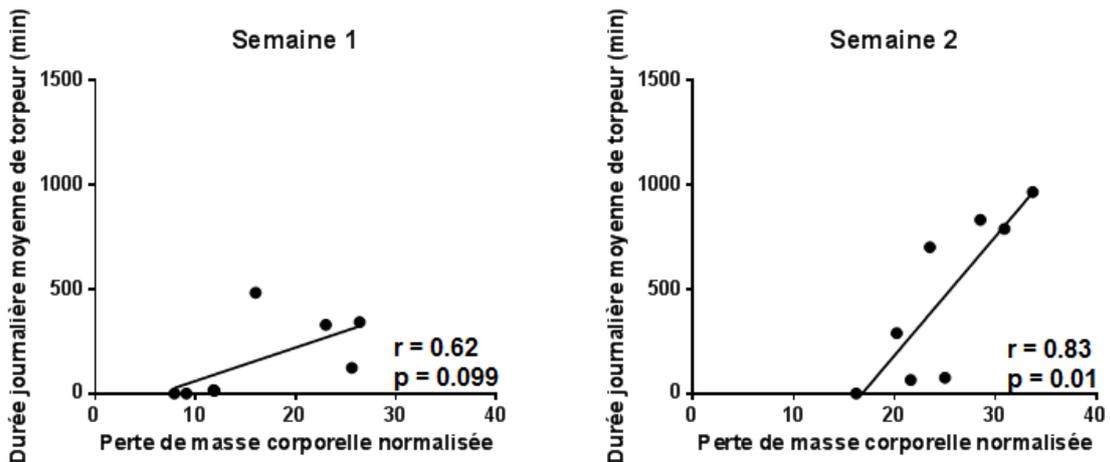


Figure 34 : Corrélations entre perte de masse corporelle normalisée (au dernier jour de la semaine) et durée journalière moyenne de torpeur pour les individus RC avant et après le décalage horaire.

L'autre principale adaptation au traitement alimentaire au sein du groupe RC est l'utilisation de la torpeur comme mécanisme d'économie d'énergie. Cette utilisation en réponse au traitement est de nouveau visible avec une corrélation statistiquement significative entre perte de masse corporelle normalisée et nombre d'événements de torpeur. On la retrouve chez les individus RC pour la première comme pour la deuxième semaine (Semaine 1 : $r = 0,76$, $p = 0,032$, Semaine 2 : $r = 0,73$, $p = 0,039$)

(Figure 33). La durée journalière moyenne des individus RC est elle aussi significativement corrélée avec la perte de masse corporelle normalisée mais cette fois ci seulement en deuxième semaine (Semaine 1 : $r = 0,62$, $p = 0,099$, Semaine 2 : $r = 0,83$, $p = 0,01$) après le décalage horaire (Figure 34). Les individus du groupe CTL n'utilisant pas ou peu la torpeur (1 individu en première semaine, 2 en deuxième semaine), ces corrélations ne se retrouvent pas pour ce groupe.

IV.A.4. Suivi du métabolisme aérobie en continu

Les données préliminaires de respirométrie montrent une consommation moyenne d'oxygène (VO_2) inférieure pour les individus RC par rapport aux individus CTL sur toute la durée de la journée (Figure 35). Cette consommation d'oxygène garde cependant la même rythmicité pour les animaux RC et CTL.

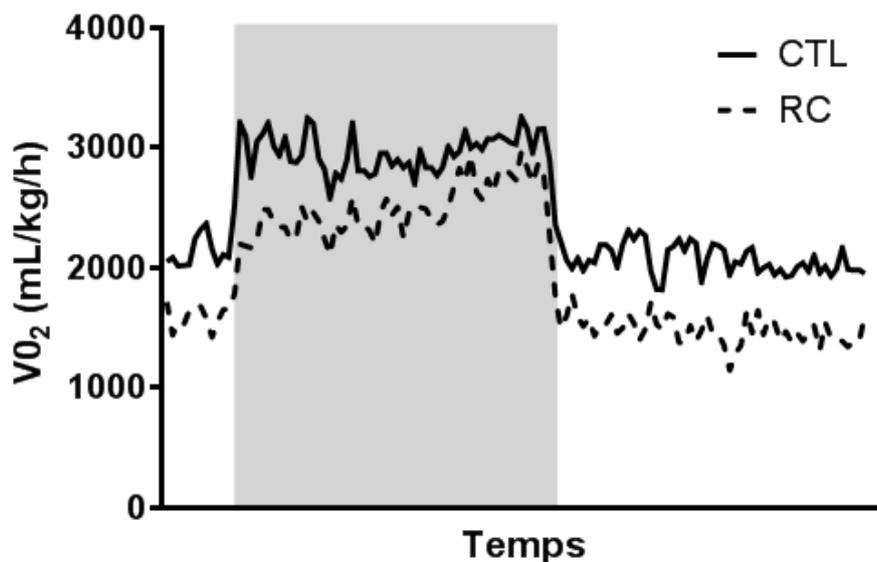


Figure 35 : Consommation d'oxygène moyenne d'individus CTL ($n = 2$) et RC synchronisé ($n = 2$) au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité (gris) et une phase de lumière (blanc).

Les données préliminaires de respirométrie montrent un quotient respiratoire (RER) inférieur pour les individus RC par rapport aux individus CTL durant une grande partie des phases d'obscurité et de lumière. Le quotient respiratoire des deux groupes semble cependant beaucoup plus proche en fin de phase d'obscurité et de début de phase lumineuse (Figure 36).

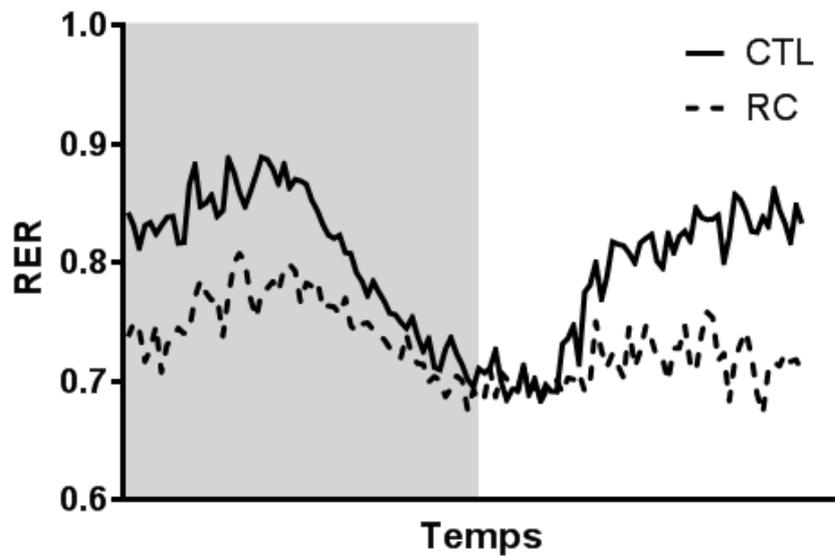


Figure 36 : Quotient respiratoire moyen d'individus CTL ($n = 2$) et RC ($n = 2$) au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité (gris) et une phase de lumière (blanc).

Ce qu'il faut retenir :

Après 14 jours de restriction à 60%, les animaux RC ont perdu une part importante de leur poids de départ. Le suivi de l'activité locomotrice spontanée et la température corporelle des individus, nous a permis d'identifier une forte corrélation entre la perte de masse normalisée et la perturbation du processus de resynchronisation. Nous avons également noté qu'une partie des individus mettaient en place une stratégie comportementale pour contrer les effets de la restriction en utilisant la torpeur journalière. Les individus du groupe RC utilisaient plus souvent ce mécanisme d'économie d'énergie que les individus du groupe CTL et cette utilisation était fortement corrélée avec la perte de masse corporelle normalisée. Les résultats montrent également une augmentation de l'utilisation de la torpeur journalière par les individus du groupe RC à la suite du décalage horaire avec, encore une fois, une utilisation plus importante de ce mécanisme chez les animaux perdant le plus de poids. Les données de locomotion spontanée n'ont montré aucune différence entre les deux groupes au cours de l'expérience, indiquant qu'il n'y avait pas d'autre adaptation comportementale au sein du groupe RC.

IV.B. Etude 2 : Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)

IV.B.1. Evolution de la masse corporelle

Les animaux RC présentent une perte de poids importante dès les premiers jours d'intervention alimentaire (Figure 37). A la fin des 19 jours de traitement les animaux RC ont perdu en moyenne $14,9 \pm 5,6$ g (soit $18,1 \pm 6,5$ % de leur masse corporelle de départ) alors que les individus CTL n'ont pas changé de poids avec une variation de seulement $2,6 \pm 6,4$ g (soit $2,8 \pm 7,8$ % de leur masse corporelle de départ). La masse corporelle normalisée des individus RC diffère de plus en plus de celle des individus CTL. Cette différence est significativement différente dès le quatrième jour de traitement, les statistiques sont résumées dans le tableau 5.

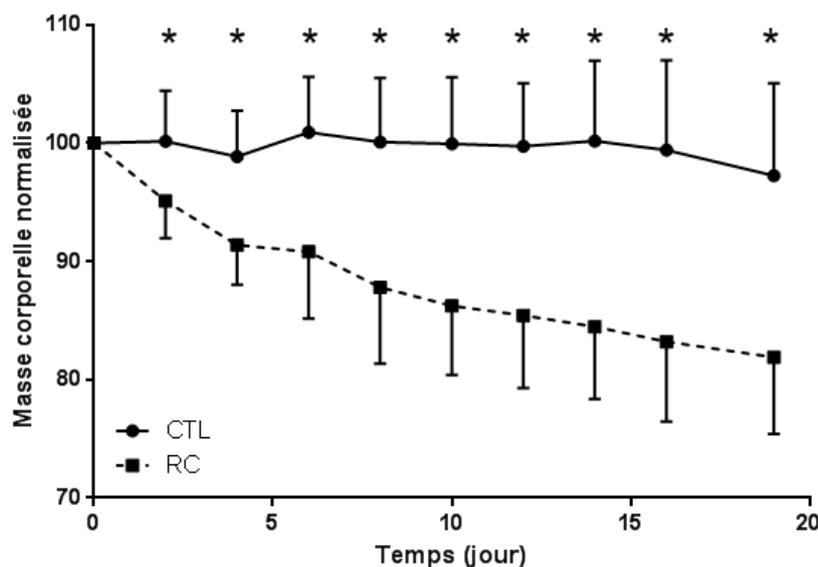


Figure 37 : Evolution de la masse corporelle normalisée (en % de la masse corporelle de départ) des individus CTL ($n = 14$) et RC ($n = 14$) au cours des 19 jours de traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

	CTL	RC
Jour 0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
Jour 2	100,1 ± 4,3	95,1 ± 3,2
Jour 4	98,9 ± 3,9	91,4 ± 3,4 *
Jour 6	100,9 ± 4,7	90,8 ± 5,7 *
Jour 8	100,1 ± 5,4	87,8 ± 6,5 *
Jour 10	99,9 ± 5,6	86,2 ± 5,9 *
Jour 12	99,7 ± 5,4	85,4 ± 6,1 *
Jour 14	100,2 ± 6,8	84,5 ± 6,1 *
Jour 16	99,4 ± 7,6	83,2 ± 6,8 *
Jour 19	97,2 ± 7,8	81,9 ± 6,5 *

Tableau 5 : Masse corporelle normalisée moyenne des individus CTL et RC au cours des 19 jours de traitement.

IV.B.2. Aptitudes physiques et métabolisme

IV.B.2.a. Coordination et endurance sur le test du Rotarod

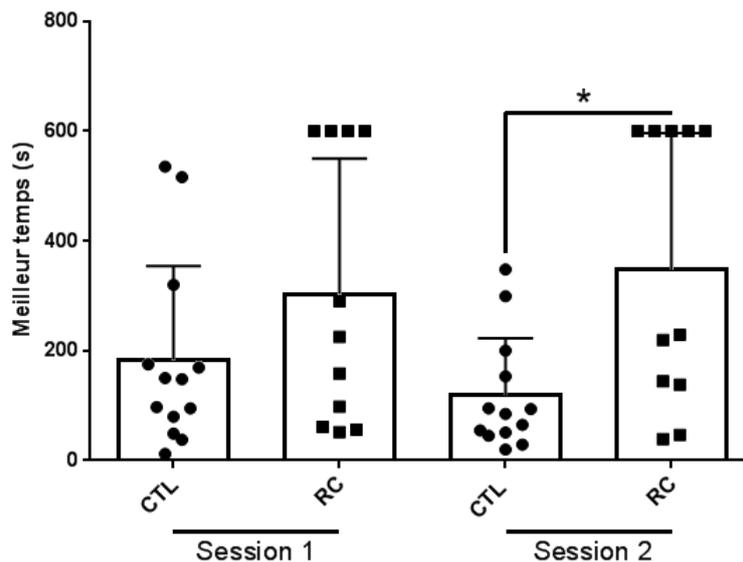


Figure 38 : Temps passé sur le Rotarod pour les groupes CTL (n=13) et RC (n=11) avant et après le traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative (p<0,05) entre les deux groupes.

Avant l'intervention alimentaire les deux groupes présentent des performances assez hétérogènes. Les individus CTL restent en moyenne 183 ± 171 s sur le dispositif et les individus RC 304 ± 246 s. Cependant il n'y a pas de différence significative dans les performances moyennes entre les deux groupes ($U = 48$, $p = 0,18$). Les tests réalisés après l'intervention alimentaire montrent de meilleures aptitudes motrices des individus RC comparés aux individus CTL avec 118 ± 104 s contre 347 ± 249 s ($U = 33$, $p = 0,03$). Enfin, les tests statistiques ne montrent aucune évolution significative des performances entre le début et la fin du traitement pour chacun des deux groupes (CTL : $W = -35$, $p = 0,24$, RC : $W = 7$, $p = 0,77$). Les résultats apparaissent sur la Figure 38.

IV.B.2.b. Suivi du métabolisme basal

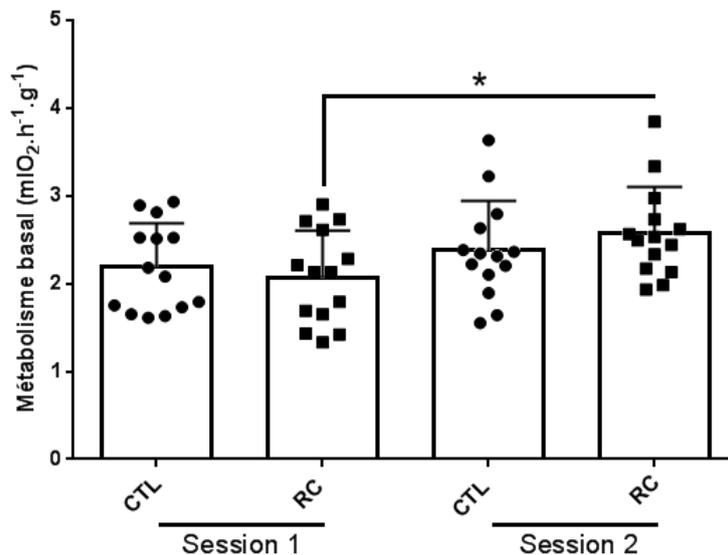


Figure 39 : Métabolisme basal des individus des groupes CTL ($n=14$) et RC ($n=14$) avant et après le traitement alimentaire. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

Avant l'intervention alimentaire, le métabolisme basal moyen des individus CTL est de $2,18 \pm 0,5 \text{mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ et celui des individus RC de $2,07 \pm 0,53 \text{mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Les tests réalisés après l'intervention alimentaire montrent une stagnation du métabolisme moyen des individus CTL à $2,38 \pm 0,56 \text{mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ($W = 41$, $p = 0,21$) et une augmentation de celui des individus RC à $2,58 \pm 0,52 \text{mlO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ($t = 3,43$, $p < 0,01$). Enfin, il n'a pas été observé de différence significative ($t = 0,97$, $p = 0,34$)

entre les groupes RC et CTL après le traitement. Les résultats apparaissent sur la Figure 39.

IV.B.2.c. Suivi de la glycémie à jeun

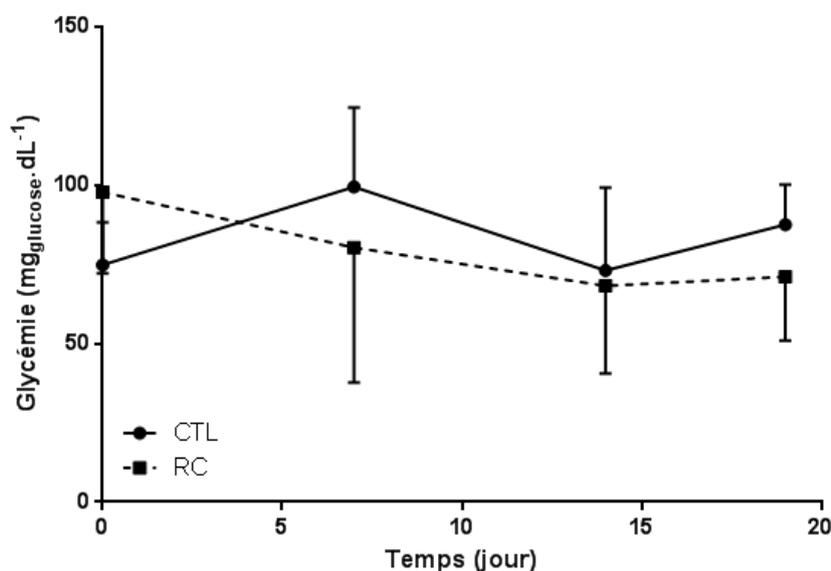


Figure 40 : Evolution de la glycémie à jeun des individus CTL (n=5) et RC (n=5) au cours des 19 jours de traitement alimentaire.

Aucune différence de glycémie entre les deux groupes n'a pu être relevée. Les mesures effectuées montrent une grande variabilité inter- et intra-individuelle. Les mesures de Glycémie sont rapportées dans le tableau 7 et la Figure 40.

	CTL	RC
Jour 0	74,8 ± 13,4	97,8 ± 25,7
Jour 7	99,4 ± 25,0	80,3 ± 42,6
Jour 14	73,0 ± 26,1	68,2 ± 27,7
Jour 19	87,5 ± 12,7	71,0 ± 20,2

Tableau 6 : Mesures de glycémie pour les individus CTL et RC.

IV.B.3. Evaluation et suivi des capacités cognitives

Les individus des deux groupes expérimentaux ne présentent pas de différence quant au nombre d'essais total pour chacun des deux tests d'apprentissage et pour

le test de mémoire (Apprentissage 1 : $t = 1,417$, $p = 0,19$, Mémoire : $U = 29$, $p = 0,58$, Apprentissage 2 : $t = 0,653$, $p = 0,53$) (Figure 41). Les animaux du groupe CR réussissent le premier apprentissage en une moyenne de $33,7 \pm 10,5$ essais, le test de mémoire en $11,7 \pm 6,2$ essais et le second apprentissage en $32,6 \pm 11,3$ essais. Les individus du groupe CTL réussissent le premier apprentissage en une moyenne de $28 \pm 4,8$ essais, le test de mémoire en $10,4 \pm 1,9$ essais et le second apprentissage en $29,4 \pm 7,4$ essais.

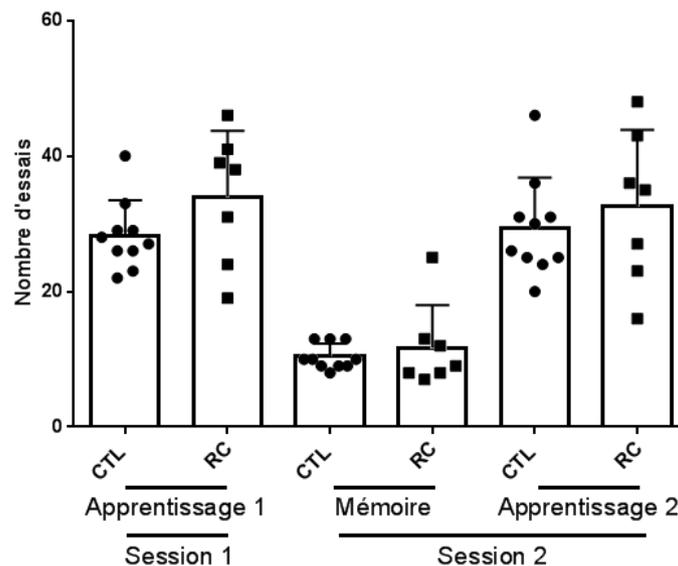


Figure 41 : Nombre d'essais effectués à la fin du test pour les individus des groupes CTL ($n=10$) et RC ($n=7$) au cours des apprentissages 1 et 2 et du test de mémoire.

Le taux de réussite des individus du groupe CTL augmente significativement de $45 \pm 16,7\%$ pour le premier apprentissage à $82,2 \pm 9,7\%$ pour le test de mémoire ($t = 4,718$; $p < 0,001$). Le taux de réussite du second apprentissage s'établit à $38,8 \pm 16,1\%$. Contrairement au groupe CTL, le groupe RC ne montre pas d'amélioration de ses performances moyennes lors du test de mémoire ou le taux de réussite s'établit à $59,9 \pm 39,7\%$ par rapport au premier apprentissage ou le taux de réussite est de $49,6 \pm 11,9\%$ ($t = 0,735$, $p = 0,49$). Lors du test de mémoire, les performances des individus du groupe RC présentent une grande variabilité. Enfin, leur taux de réussite pour le second apprentissage s'établit à $27 \pm 18,7\%$ et est significativement inférieur à celui du premier apprentissage ($t = 2,466$; $p = 0,049$) (Figure 42).

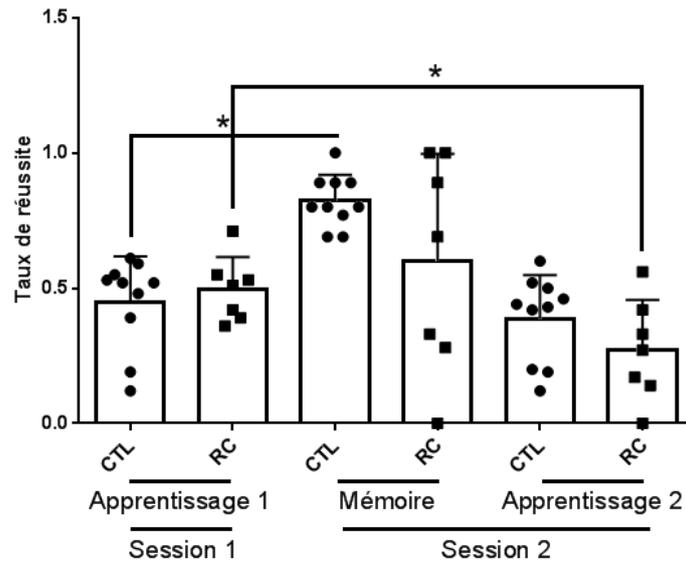


Figure 42 : Taux de réussite pour les individus des groupes CTL (n=10) et RC (n=7) au cours des apprentissages 1 et 2 et du test de mémoire. Les * indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les deux groupes.

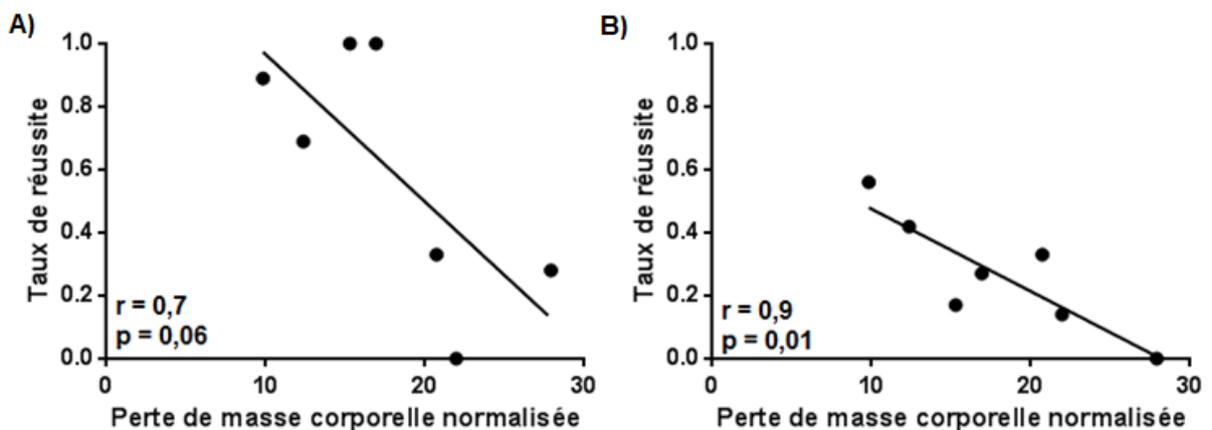


Figure 43 : Corrélation entre perte de masse corporelle normalisée au jour du test (en % de la masse corporelle de départ) et taux de réussite lors de tests de discrimination visuelle pour les individus RC (n=7). A) Lors d'un test de mémoire après une restriction de 40 % pendant 17 jours, B) Lors d'un test d'apprentissage après une restriction de 40 % pendant 19 jours.

Il existe une forte corrélation entre perte de masse corporelle normalisée et taux de réussite à ce test de discrimination visuelle. Cette corrélation se retrouve pour le second apprentissage, où, plus les individus perdent de poids, plus leurs performances sont impactées (n = 7, r = 0,9 ; p = 0,01, Figure 43B). Il existe

également une tendance similaire pour le test de mémoire avec un résultat proche de la significativité statistique ($n = 7$, $r^2 = 0,7$; $p = 0,06$, Figure 43A)

Ce qu'il faut retenir :

Après 19 jours de restriction à 40%, les animaux RC ont perdu une part importante de leur poids de départ. Pour la tâche de discrimination, les individus du groupe RC montraient des performances moindres au test d'apprentissage après le traitement alimentaire. Ces performances étaient en lien avec la perte de masse corporelle normalisée : les individus perdant le plus de masse par rapport à leur masse de départ étant ceux qui avaient le plus de difficulté lors de ce test. Nous avons également noté une importante hétérogénéité entre les individus de ce même groupe lors d'un test portant sur la mémorisation de l'apprentissage effectué avant le traitement. Pour ce test il existe une tendance similaire à celle retrouvée chez les individus RC lors du second apprentissage. L'évaluation des performances de coordination et d'endurance montre une meilleure performance des individus RC après la restriction. De même, le métabolisme basal de ce groupe est augmenté après la restriction. Parallèlement à ce changement métabolique, nous n'avons pas noté d'évolution de la glycémie à jeun lors des 19 jours de traitement alimentaire.

IV.C. Changement qualitatifs de l'alimentation à long terme et plasticité comportementale acquise - Supplémentation en AGPI n-3 et comportement

IV.C.1. Analyse des lipides sanguins circulants

La supplémentation en huile de poisson provoque une augmentation relative des AGPI n-3 au détriment des AGPI n-6 et des acides gras monoinsaturés (Tableau 8). En effet, les AGPI n-3 représentent $24,7 \pm 1,5$ % des acides gras totaux chez les microcèbes supplémentés contre $8,1 \pm 1,3$ % chez les individus CTL. Cette augmentation des AGPI n-3 est due à une augmentation des AGPI n-3 à longues chaînes. Les acides gras 20:5 n-3, 22:5 n-3 et 22:6 n-3 représentent respectivement

4,0 ± 0,9 %, 4,9 ± 1,1 % et 15,5 ± 1,3 % des acides gras totaux chez les individus AGPI n-3 alors qu'ils ne représentent respectivement que 0,2 ± 0,0 %, 1,7 ± 0,4 % et 6,0 ± 0,9 % des acides gras totaux chez les individus CTL. En parallèle, les AGPI n-6 et les acides gras monoinsaturés représentent respectivement 20,5 ± 2,7 % et 8,0 ± 0,4 % des acides gras totaux chez les individus AGPI n-3 alors qu'ils représentent respectivement 35,5 ± 1,1 % et 11,6 ± 0,0 % des acides gras totaux chez les individus CTL. Le taux des acides gras saturés reste quant à lui équivalent au sein des deux groupes à 43,3 ± 0,0 % des acides gras totaux chez les CTL et 45,0 ± 0,9 % des acides gras totaux chez les individus AGPI n-3.

	CTL (n = 3)	AGPI n-3 (n = 3)
Acide gras	g/100g	
12:0	0,5 ± 0,2	1,9 ± 0,2 *
16:0	24,8 ± 0,9	27,2 ± 0,4
18:0	16,7 ± 1,2	14,4 ± 0,2
24:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Σ saturés	43,3 ± 0,0	45,0 ± 0,9
18:1 n-9	9,0 ± 0,0	6,0 ± 0,3 *
18:1 n-7	1,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0
Σ insaturés	11,6 ± 0,0	8,0 ± 0,4 *
18:2 n-6	13,4 ± 2,0	8,9 ± 1,0 *
20:3 n-6	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,0 *
20:4 n-6	16,3 ± 0,1	9,6 ± 1,7 *
22:4 n-6	1,5 ± 0,4	0,2 ± 0,1 *
22:5 n-6	1,5 ± 0,3	0,4 ± 0,0 *
Σ AGPI n-6	35,3 ± 1,1	20,5 ± 2,7 *
18:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:3 n-3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
20:4 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:5 n-3	0,2 ± 0,0	4,0 ± 0,9 *
22:5 n-3	1,7 ± 0,4	4,9 ± 1,1 *
22:6 n-3	6,0 ± 0,9	15,5 ± 1,3 *
Σ AGPI n-3	8,1 ± 1,3	24,7 ± 1,5 *
Total	100,0	100,0

Tableau 8 : Composition détaillées des phospholipides plasmatiques des individus CTL et AGPI n-3 après 18 mois de supplémentation. Les * indiquent une différence significative entre les groupes ($p < 0,05$).

IV.C.2. Tests comportementaux

IV.C.2.a. Evaluation et suivi des capacités cognitives

L'analyse des données du nombre d'essais et du nombre d'erreurs ne donne aucune différence statistiquement significative entre les groupes CTL et AGPI n-3, que ce soit pour les tests de mémoire ou ceux d'apprentissage à tout moment du traitement alimentaire.

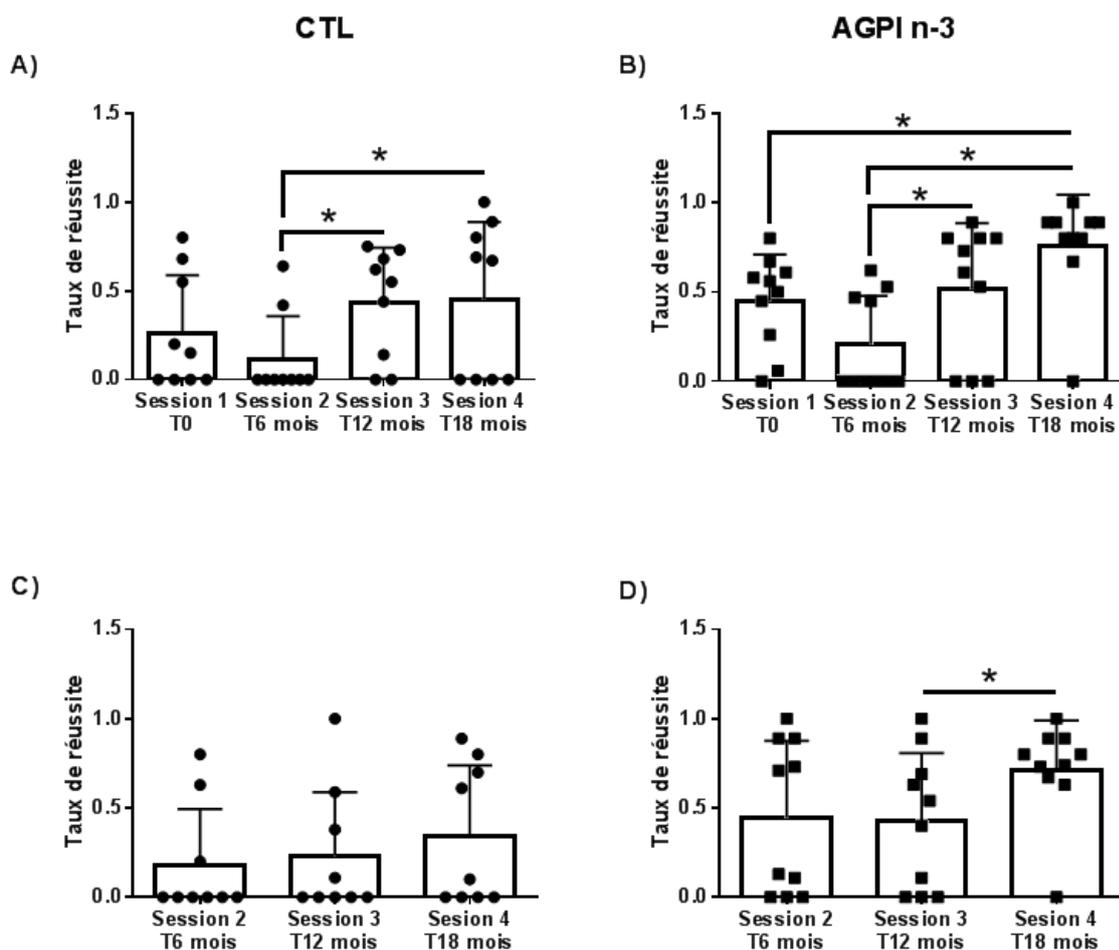


Figure 44 : Taux de réussite lors de tests de discrimination visuelle au cours des 18 mois de traitement alimentaire. A) Pour les individus CTL ($n = 9$) à des tests d'apprentissage, B) pour les individus AGPI n-3 ($n = 10$) à des tests d'apprentissage, C) pour les individus CTL ($n = 9$) à des tests de mémoire, D) pour les individus AGPI n-3 ($n = 10$) à des tests de mémoire. Les * représentent une différence statistiquement significative.

L'analyse des données du taux de réussite montre des évolutions temporelles des performances au sein des deux groupes pour les tests de mémoire ainsi que pour les nouveaux apprentissages. Pour l'apprentissage on note une amélioration des performances des individus CTL et AGPI n-3 entre le test à 6 mois et les tests à 12 et 18 mois. Ils passent respectivement de $11,7 \pm 24,0$ % de réussite à 6 mois à $43,4 \pm 30,8$ % à 12 mois et $45,0 \pm 44,8$ % à 18 mois pour les individus CTL (T6/T12 : $t = 2,977$, $p = 0,03$, T6/T18 : $t = 3,123$, $p = 0,02$) et de $20,7 \pm 27,1$ % à 6 mois à $51,6 \pm 37,1$ % à 12 mois et $76,3 \pm 28,2$ % à 18 mois pour les individus AGPI n-3 (T6/T12 : $t = 3,062$, $p = 0,02$, T6/T18 : $t = 5,509$, $p < 0,01$). Les individus du groupe AGPI n-3 présentent également une amélioration de leurs performances entre le test basal à T0 et le test à 18 mois avec un taux de réussite qui passe de $44,9 \pm 26,2$ % à T0 à $76,3 \pm 28,2$ % à 18 mois ($t = 3,111$, $p = 0,02$). Pour la mémoire on note une amélioration des performances des individus AGPI n-3 entre 12 et 18 mois avec un taux de réussite de $42,6 \pm 38,2$ % à 12 mois à $71,5 \pm 27,5$ % à 18 mois ($t = 2,575$, $p = 0,04$) (Figure 44). Les résultats ne montrent aucune différence statistiquement significative des taux de réussite entre les deux groupes aux différents temps de l'étude.

Les résultats du nombre de refus lors des tests de mémoire et d'apprentissage montrent une diminution du nombre de refus entre les tests à 6 et 18 mois pour les deux groupes expérimentaux lors des tests d'apprentissage. Le nombre de refus passe alors de $8,7 \pm 5,7$ à 6 mois à $2,9 \pm 4,3$ à 18 mois pour les individus CTL ($t = 2,980$, $p = 0,03$) et de $7,7 \pm 5,3$ à 6 mois à $1,1 \pm 3,1$ à 18 mois pour les individus AGPI n-3 ($t = 3,316$, $p = 0,01$). Pour les tests de mémoire, les individus du groupe CTL montrent une diminution du nombre de refus après 18 mois établi à $1,9 \pm 2,4$ par rapport au test effectué après 6 mois de traitement alimentaire où il est de $4,4 \pm 2,2$ ($t = 2,844$, $p = 0,02$). Pour le groupe des animaux supplémentés en AGPI n-3, il est possible de noter une diminution significative du nombre de refus entre le test à 12 mois où il est de $3,5 \pm 3,1$ et le test à 18 mois où il est de $0,7 \pm 1,6$ ($t = 3,285$, $p < 0,01$). (Figure 45). De même que pour les taux de réussite, les résultats ne montrent aucune différence statistiquement significative des performances aux différents temps de l'étude.

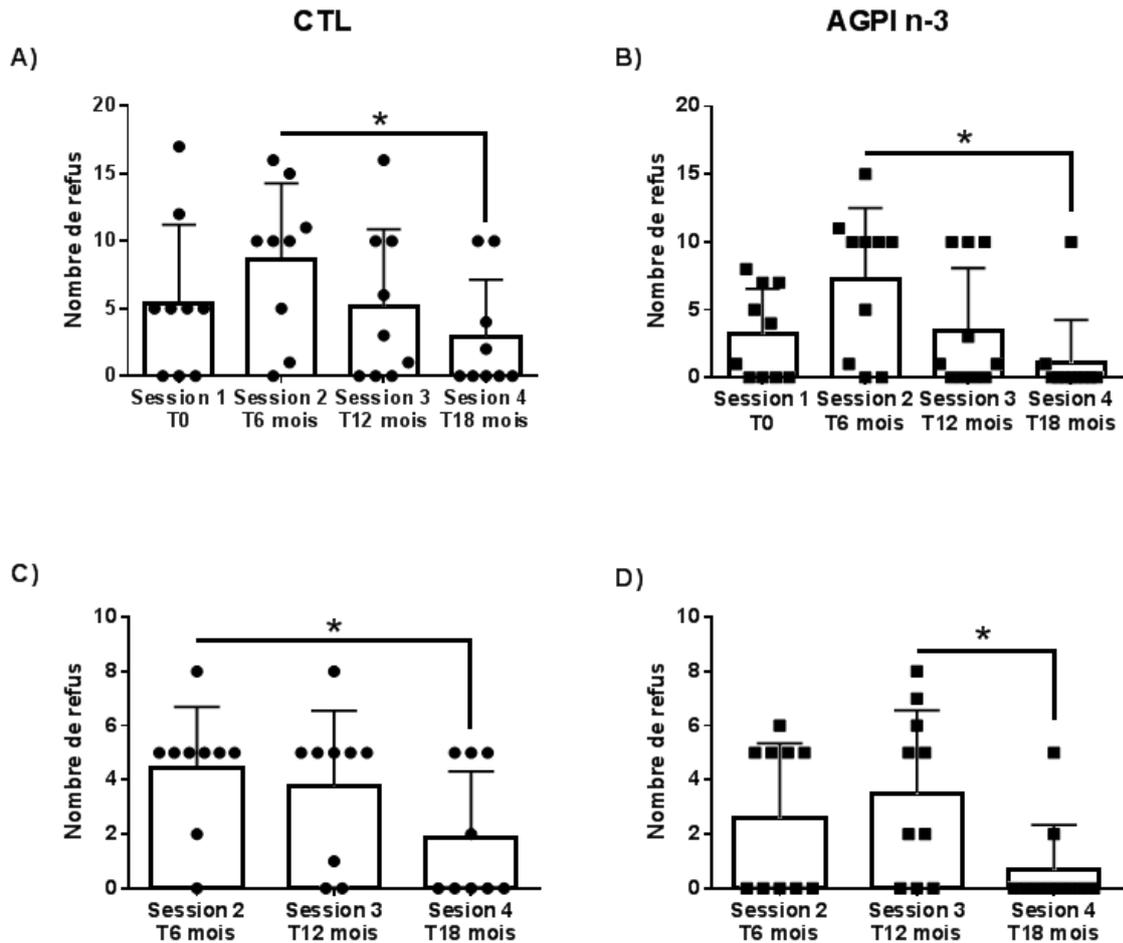


Figure 45 : Nombre de refus lors de tests de discrimination visuelle au cours des 18 mois de traitement alimentaire. A) Pour les individus CTL ($n = 9$) à des tests d'apprentissage, B) pour les individus AGPI n-3 ($n = 10$) à des tests d'apprentissage, C) pour les individus CTL ($n = 9$) à des tests de mémoire, D) pour les individus AGPI n-3 ($n = 10$) à des tests de mémoire. Les * représentent une différence statistiquement significative.

IV.C.2.b. Suivi des l'anxiété des individus

Les résultats ne montrent aucune différence dans le temps de déplacement ou la distance parcourue dans le dispositif. La distance parcourue est de $73,7 \pm 182,5$ cm à T0 et $88,2 \pm 207,8$ cm à T18 mois pour les individus CTL et $567,6 \pm 968,3$ cm à T0 et $606,1 \pm 1120,0$ cm à T18 mois pour les individus AGPI n-3. Les temps de déplacement sont quant à eux de $3,0 \pm 5,2$ s à T0 et $3,4 \pm 8,0$ s à T18 mois pour les individus CTL et $16,8 \pm 30,7$ s à T0 et $16,0 \pm 30,0$ s à T18 mois pour les individus

AGPI n-3. Lors du test à 6 mois, les déplacements sont équivalents. La distance parcourue est de $15,3 \pm 31,1$ cm pour les individus CTL et $4,0 \pm 12,7$ pour les individus AGPI n-3. Les temps de déplacement sont quant à eux de $0,5 \pm 1,0$ s pour les individus CTL et $0,2 \pm 0,7$ s pour les individus AGPI n-3. L'analyse de variance sur ces paramètres ne montre aucun effet du temps. (Figure 46).

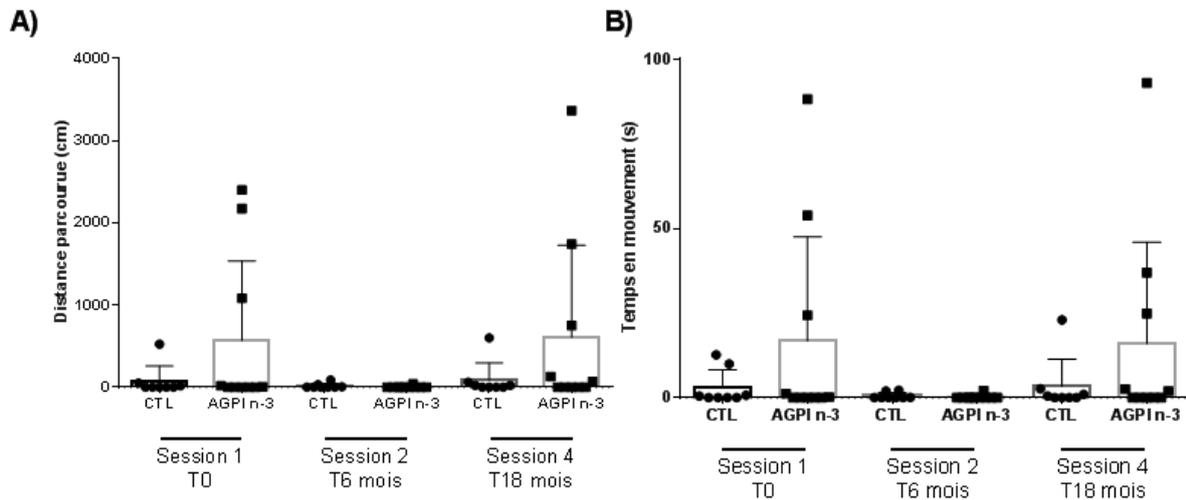


Figure 46 : Distance parcourue (A) et temps en mouvement (B) dans le dispositif du test d'openfield des individus CTL ($n = 8$) et AGPI n-3 ($n = 10$) avant (Session 1, T0), après 6 mois (Session 2, T6 mois) et après 18 mois (Session 4, T18 mois) de traitement alimentaire.

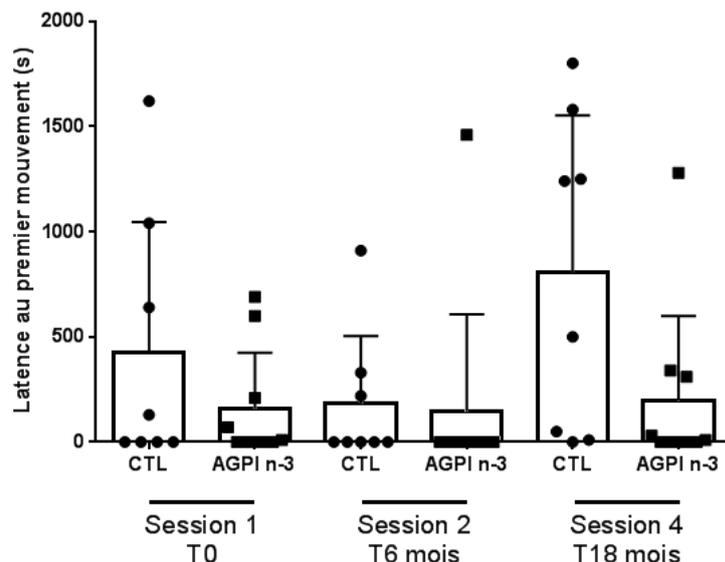


Figure 47 : Latence au premier mouvement dans le dispositif du test d'openfield des individus CTL ($n = 8$) et AGPI n-3 ($n = 10$) avant (Session 1, T0), après 6 mois (Session 2, T6 mois) et après 18 mois (Session 4, T18 mois) de traitement alimentaire. Les * représentent une différence statistiquement significative.

Lorsque l'on s'intéresse à la latence au premier mouvement, il n'y a aucune différence entre les deux groupes lors de 6 premiers mois de traitement. Cependant, après 18 mois de traitement alimentaire, les individus supplémentés, sont plus rapides à initier un déplacement que les individus CTL ($t = 2,63$, $p = 0,03$) (Figure 47). Le temps moyen avant le premier déplacement est alors de $197,0 \pm 403,2$ s pour les individus AGPI n-3 et $803,8 \pm 748,4$ pour les individus CTL. L'analyse de variance ne montre aucun effet du temps sur cette latence au premier mouvement.

IV.C.3. Neurogenèse

La Figure 48 représente des exemples caractéristiques d'images d'immunohistochimie réalisées sur les différentes zones cérébrales (amygdale, bulbe olfactif, gyrus denté et zone sous-ventriculaire). La spécificité de la réaction immunohistochimique est vérifiée à l'aide des contrôles négatifs qui garantissent la spécificité des anticorps secondaires (images non représentées).

Le nombre des neurones en division (cellules NeuN+/BrdU+) par rapport au nombre total de neurones (cellules NeuN+) permet d'estimer la neurogenèse dans les différentes zones cibles. Au niveau de l'amygdale, le nombre de nouveaux neurones ne varie pas significativement chez les animaux AGPI n-3 ($0,49 \pm 0,01$) comparativement aux contrôles ($0,45 \pm 0,01$) ($t = 2,1$, $p = 0,1$) (Figure 49). Dans le bulbe olfactif, les nouveaux neurones augmentent de 28% chez les AGPI n-3 ($0,37 \pm 0,07$) par rapport aux contrôles ($0,29 \pm 0,03$) montrant ainsi une différence significative ($t = 9,6$, $p = 0,003$) (Figure 49). Les neurones en division dans le gyrus denté représentent $0,52 \pm 0,01$ chez les contrôles contre $0,67 \pm 0,03$ pour le groupe AGPI n-3, ce qui correspond à une augmentation significative de près de 30% des nouveaux neurones ($t = 9,1$, $p = 0,009$). Au niveau de la SVZ, une augmentation statistiquement significative de 36% de nouveaux neurones est observée chez les AGPI n-3 ($0,52 \pm 0,02$) en comparaison avec les contrôles ($0,38 \pm 0,02$) ($t=5,9$; $p=0,041$) (Figure 49).

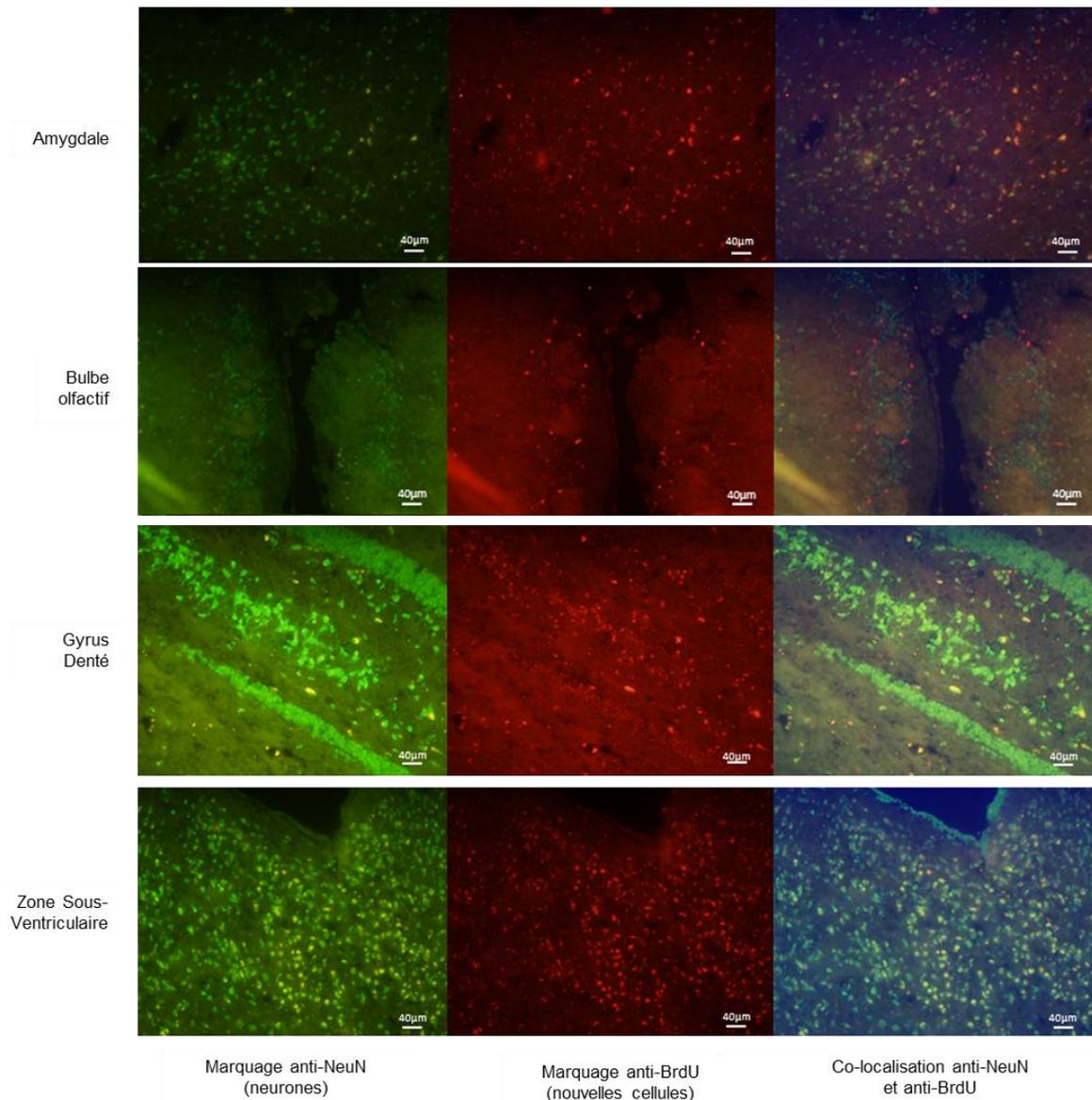


Figure 48 : Exemples caractéristiques d'images d'immunohistochimie réalisées sur les différentes zones cérébrales (amygdale, bulbe olfactif, gyrus denté et zone sous-ventriculaire). Le marquage anti-NeuN (vert) permet d'observer les neurones présents dans chaque zone tandis que le marquage anti-BrdU (rouge) permet d'identifier les cellules en division. La combinaison des deux images permet d'observer la co-localisation des marqueurs et donc la présence de nouveaux neurones ou de neurones en division. Lors de l'assemblage des deux images (superposition), les cellules marquées seulement avec les anticorps anti-BrdU sont des cellules gliales tandis que les cellules marquées seulement avec les anticorps anti-NeuN des neurones plus anciens (> 2 semaines).

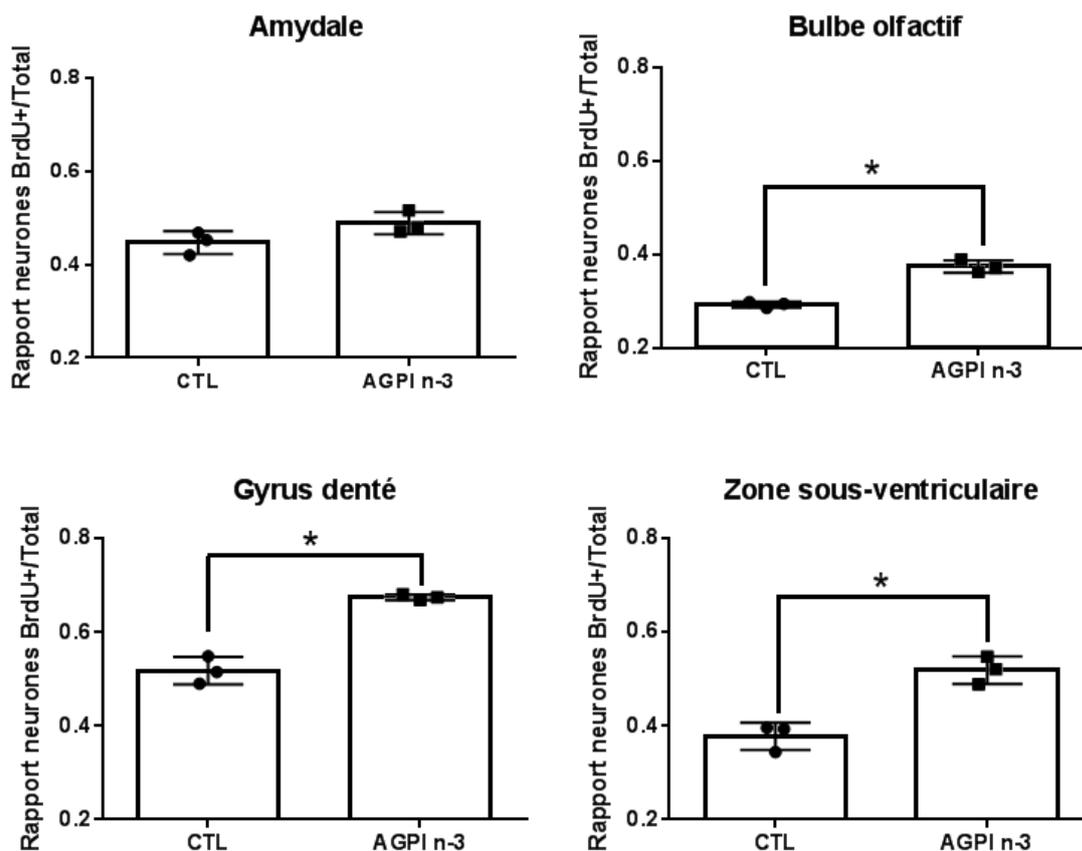


Figure 49 : Rapport neurones en division sur neurones totaux dans différentes zones du cerveau chez des individus CTL (n=3) et AGPI n-3 (n=3).

IV.C.4. Rotarod

Les animaux CTL restent en équilibre 123 ± 75 s en moyenne lors de la première session et 69 ± 54 s lors de la seconde ($t = 0,279$, $p = 0,95$). Le temps passé sur le dispositif pour les individus AGPI n-3 est quant à lui de 113 ± 81 s en moyenne pour la première session et 123 ± 100 s pour la seconde ($t = 1,534$, $p = 0,25$). Les résultats ne montrent aucune évolution des performances après 6 mois de traitement pour les deux groupes expérimentaux (CTL : $W = -37$, $p = 0,50$, AGPI n-3 : $W = 5$, $p = 0,39$) (Figure 50)

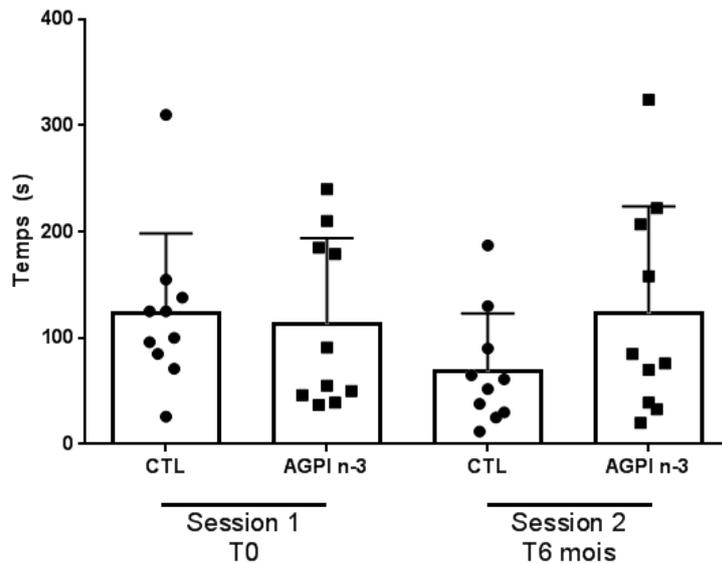


Figure 50 : Temps passé sur le Rotarod pour les individus CTL ($n = 10$) et AGPI n-3 ($n = 10$) avant et après 6 mois de traitement alimentaire.

Ce qu'il faut retenir :

Cette supplémentation en AGPI n-3 sur 18 mois a conduit à une modification significative de la composition des lipides amenant à une diminution du rapport AGPI n-6/ AGPI n-3. En parallèle, il a été relevé une latence au premier mouvement inférieure chez les individus supplémentés par rapport aux individus CTL lors d'un test d'openfield effectué après 18 mois de traitement alimentaire sans qu'aucune autre différence entre les deux groupes n'ait pu être observée sur les autres paramètres de ce test. Les tests cognitifs montrent une augmentation du taux de réussite des individus supplémentés en AGPI n-3 lors d'un test d'apprentissage effectué après 18 mois de traitement alimentaire par rapport au test effectué avant le traitement. De même, les individus supplémentés en AGPI n-3 montrent une augmentation de leur taux de réussite lors du test de mémoire effectué après 18 mois de supplémentation par rapport au test effectué après 12 mois de supplémentation à mettre en parallèle à une diminution du nombre de refus entre ces deux tests chez ces individus. Parallèlement à ces observations comportementales, on note une augmentation de la neurogenèse dans 3 zones du cerveau le BO, le DG et la SVZ.

Discussion

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre l'influence de variations alimentaires sur la plasticité comportementale, qu'elle soit innée ou acquise. Il s'est articulé autour de deux types de modifications de l'alimentation : des variations quantitatives et des variations qualitatives. La première partie de ce travail s'est intéressée aux effets à court terme d'une restriction alimentaire sans malnutrition à travers deux études. La première s'intéressant aux effets sur la plasticité comportementale innée par l'étude de la synchronisation de l'horloge biologique et la seconde à la plasticité comportementale acquise à travers l'étude des capacités cognitives et plus particulièrement de l'apprentissage et de la mémoire. La seconde partie de ce travail s'est intéressée à des modifications pérennes de l'alimentation à l'aide d'une supplémentation en AGPI n-3 et à ses conséquences sur la plasticité comportementale acquise via l'étude de comportement, des capacités cognitives ainsi que la production de nouveaux neurones par les individus.

V.A. Effets d'une restriction calorique sur la plasticité du comportement chez le microcèbe

V.A.1. Perte de masse corporelle et intensité de la restriction

Lors des deux études portant sur l'impact de la réduction de la quantité alimentaire disponible par une restriction calorique sans malnutrition, les individus RC ont perdu une part importante de leur poids de départ. Cette perte atteint 15% à 14 jours et presque 20% à 19 jours lors d'une restriction à 40% sans malnutrition. Elle atteint environ 25% à 14 jours lorsque l'intensité de la restriction s'élève à 60%. L'importance de cette perte est donc liée à l'intensité de la restriction. Bien que cette observation puisse sembler triviale, il est intéressant de noter que le microcèbe est, dans la nature, également soumis à des variations dans l'apport énergétique sur des périodes variables [206]. Les animaux de l'élevage de Brunoy sont, quant à eux, élevés dans des conditions saisonnières avec des variations limitées de quantité énergétique disponible et, bien qu'ils montrent des adaptations semblables à celles observées en nature (prise de masse corporelle avant l'hiver, hypométabolisme), ils ne semblent pas pouvoir subir de restrictions intenses et prolongées du moins pendant la période favorable estivale. De précédents travaux, conduits sur les animaux de l'élevage de Brunoy par Giroud *et al.* [193,194] semblent montrer des

résultats similaires bien que moins importants en termes de perte de masse corporelle pour les individus en restriction en été. En effet, dans les études de Giroud *et al.*, les individus en restriction calorique à 40% en été ne présentent qu'une perte de masse limitée et ce à l'issue de restrictions d'une durée de 30 et 35 jours. Seuls les individus soumis à une restriction à 80% sans malnutrition durant l'été ont du être retirés des expérimentations car présentant une masse corporelle limite (fixée à 55g, masse corporelle en dessous de laquelle ils doivent être exclus de l'expérience pour ne pas leur faire courir de risques pour leur santé). Cette différence dans l'adaptation à une restriction sévère tient probablement à la période d'expérimentation. L'été contient, à ses extrémités, deux périodes particulièrement critiques où les individus peuvent être fortement contraints. En effet, le début de l'été correspond à une période de diminution du poids des individus qui épuisent leurs réserves constituées avant la période favorable et la fin de l'été correspond à une période de mise en réserve d'énergie sous forme de graisse [207]. Il est possible de penser que la perturbation d'une de ces deux périodes serait particulièrement critique et que les individus en pleine modification physiologique et comportementale seraient dans l'impossibilité de faire correctement face à un changement brutal dans l'énergie disponible. Au contraire une modification de l'apport énergétique lors de la phase stable du milieu de l'été serait moins impactante et permettrait aux individus de mieux réagir. Du fait de contraintes liées à l'élevage, il n'a cependant pas toujours été possible de travailler avec des individus lors de la phase stable du milieu d'été ce qui a pu accentuer le challenge énergétique et mener à une perte de poids supérieure à restriction égale entre ce travail de thèse et les études de Giroud *et al.* [193,194].

Pour ce travail de thèse, l'intensité de restriction avait été définie à priori à partir d'autres protocoles de restriction calorique utilisés sur les animaux de cet élevage [105,193,194]. Le pourcentage a ainsi été établi à 60% permettant un défi énergétique suffisant sans risquer l'exclusion d'individus pour atteinte de la masse corporelle limite. Cependant lors de l'étude RC-Chrono deux individus présentaient une masse corporelle très proche de cette limite après deux semaines de restriction à 60%. Après cette première étude, lors d'une étude préliminaire portant sur la restriction calorique et les capacités cognitives réalisée avec 3 individus et effectuée avec une restriction de 60% sans malnutrition, l'expérience a du être arrêtée peu avant la fin, les 3 individus ayant atteint cette masse corporelle limite. Ceci a conduit,

par la suite, à un réajustement de la restriction à un pourcentage de 40% l'étude RC-Cog afin d'éviter l'exclusion d'individus. Ce pourcentage de restriction nous a permis d'atteindre ce but bien que certains individus aient été très proches du seuil d'exclusion lors du dernier jour du protocole alimentaire.

Il semble donc que la restriction calorique aiguë soit particulièrement contraignante pour les individus. La perte de poids enregistrée lors de nos deux études montre la difficulté qu'ont les individus à faire face à une restriction intense et courte durant cette période habituellement favorable. Ces données renforcent les conclusions des études sur la restriction calorique aiguë chez le microcèbe montrant que la restriction en été est particulièrement contraignante pour l'adaptation des individus lorsque celle-ci se prolonge.

V.A.2. Etude 1 : Restriction calorique et horloge biologique comme marqueur de la plasticité comportementale innée (RC-Chrono)

Le but de la première étude était d'analyser l'effet d'une restriction calorique sévère à 60 % sur la capacité des individus à resynchroniser leur horloge biologique sur un cycle lumière/obscurité après un décalage horaire de 6 heures. En suivant l'activité locomotrice spontanée et la température corporelle des individus, nous avons été en mesure d'identifier une forte corrélation entre la perte de masse normalisée et la perturbation du processus de resynchronisation. Les actogrammes et les profils de température corporelle des individus montrent une grande variation inter-individuelle dans la réponse des individus du groupe RC à l'intervention alimentaire. Dans cette étude, 3 individus du groupe RC ne sont pas parvenus à se resynchroniser sur le cycle lumière/obscurité au cours de la semaine suivant le décalage horaire quand les 5 autres y sont parvenus dans les deux jours. La capacité à se resynchroniser semble particulièrement liée à la perte de masse corporelle (en pourcentage de la masse corporelle de départ). En effet, cette dernière était fortement corrélée avec les valeurs d'onset des jours suivant le décalage horaire chez les individus du groupe RC. La corrélation entre la perte de masse corporelle normalisée et les données d'onset semble indiquer un seuil de perte de poids situé autour de 20% à partir de laquelle les individus ne parviennent pas à se resynchroniser. En effet, les individus du groupe RC ayant perdu moins de 20% de leur masse corporelle de départ le jour

suivant le décalage horaire (jour 8) sont parvenus à se resynchroniser dans les deux jours suivant cette perturbation. Au cours de la deuxième semaine, ces individus ont continué à perdre de la masse corporelle mais sont restés synchronisés. Contrairement à ces derniers, les individus du groupe RC ayant perdu plus de 20% de leur masse corporelle de départ au jour 8, ne sont pas parvenus à se resynchroniser sur le cycle lumière/obscurité avant la fin de l'expérience. Il a déjà été montré que l'horloge biologique centrale peut être affectée par la restriction calorique. En effet, des souris soumises à une alternance normale lumière/obscurité et nourries avec un régime hypocalorique durant la journée présentaient une perte de rythmicité dans le comportement locomoteur spontané ainsi que des altérations de la réponse au stimulus lumineux du système circadien via des changements dans l'expression des gènes de l'horloge centrale *Per1* et *Cry2* respectivement avancée de 1h et 3h [97]. Ainsi nos animaux ont pu souffrir de changements similaires lorsqu'ils perdaient plus de 20% de leur masse corporelle de départ.

De plus, le suivi des températures corporelles a permis de montrer que les microcèbes confrontés à une restriction calorique aiguë essaient d'adapter leur comportement en utilisant la torpeur. Les données de locomotion spontanée n'ont montré aucune différence entre les deux groupes au cours de l'expérience, indiquant qu'il n'y avait pas d'adaptation comportementale impliquant l'activité locomotrice au sein du groupe RC. L'utilisation de la torpeur comme stratégie d'économie d'énergie est renforcée par le métabolisme aérobie diminué chez les animaux RC par rapport aux CTL. D'autres études menées par Giroud *et al.* et Génin *et al.* sur la colonie de Brunoy ont montré que des microcèbes captifs soumis à une restriction calorique de 80% en période de jours longs (période favorable) utilisaient également cette stratégie pour contrer la diminution de l'énergie disponible [193,195]. L'étude de Giroud *et al.* a montré qu'une restriction à 40% sur cette période de jours longs ne provoquait pas d'entrée en torpeur [193]. Cependant, il n'y avait avant le présent travail de thèse aucune information sur leur réaction à une restriction calorique intermédiaire de 60% en période de jours longs. Au cours de ce travail de thèse, l'utilisation de la torpeur s'est accrue avec le temps passé sous restriction comme cela est théoriquement attendu [26]. Non seulement les individus du groupe RC montraient un nombre plus important d'événements de torpeur journalière mais augmentaient également la durée d'utilisation de ce mécanisme. Ces événements

sont également de plus en plus profonds comme le montre la diminution de la température corporelle minimale enregistrée au cours de l'expérience. L'utilisation de ce mécanisme est fortement liée à la condition corporelle et à l'apport énergétique. En effet, seuls 2 individus du groupe CTL ont utilisé cette stratégie plus d'une fois lors de la deuxième semaine contre 7 dans le groupe RC. Là encore, la durée d'utilisation de ce mécanisme est fortement corrélée avec la perte de masse corporelle normalisée, les animaux perdant le plus de poids étant ceux qui utilisent le plus ce mécanisme. Ces résultats sont similaires à ceux de la littérature sur le microcèbe. Dans la nature, cette espèce est habituée à entrer en torpeur journalière afin de faire face à une diminution attendue de la quantité de nourriture disponible en hiver [176,177]. Cette stratégie est supposée leur faire réduire leur dépense énergétique de 10% [177]. Lorsque cette stratégie est utilisée, les bénéfices en terme d'économie d'énergie doivent être plus importants que les coûts associés à cette pratique et décrits dans différentes études [180–182]. Ici, la torpeur journalière semble ne pas être efficace en période de jours longs. En effet, les individus qui utilisent le plus ce mécanisme sont ceux qui continuent à perdre du poids de façon importante. En regardant les données individuelles, il est possible de voir que les individus qui utilisent le plus ce mécanisme d'économie d'énergie sont non seulement ceux ayant perdu le plus de poids mais également ceux ne parvenant pas à se resynchroniser après le décalage horaire. Etant donné ces résultats, nous pouvons avancer qu'utilisation de la torpeur et resynchronisation pourraient être liées. Cependant, et bien que ce lien semble probable, nous ne sommes pas parvenus à trouver de corrélation directe entre ces deux paramètres.

L'étude RC-Chrono met en évidence l'impact d'une restriction calorique sévère sur la capacité à se resynchroniser sur un rythme lumière/obscurité après un décalage horaire de 6h. Les résultats indiquent que la perte de poids joue un rôle majeur dans la capacité à s'adapter à une diminution de l'énergie disponible. L'impossibilité de se resynchroniser pour une partie des individus du groupe RC semble être le fruit de l'interaction entre une influence accrue des oscillateurs périphériques, synchronisés sur l'heure variable du nourrissage du jour précédant, une réponse photique perturbée au niveau du système nerveux central et une utilisation anormale et inefficace de la torpeur. Il serait intéressant de poursuivre les investigations pour déterminer pourquoi la plasticité comportementale innée du microcèbe peut être

diminuée par un déficit énergétique important chez certains individus et pas chez d'autres.

V.A.3. Restriction calorique à court terme et capacités cognitives comme marqueur de plasticité comportementale acquise (RC-Cog)

Le but de la deuxième étude était d'observer l'effet d'une restriction calorique sévère sur les performances cognitives du microcèbe soumis à une diminution de 40% de ses apports caloriques sans malnutrition sur une courte durée durant la période estivale. Pour cela, nous avons mesuré les performances cognitives, physiques et métaboliques avant et après deux semaines de traitement alimentaire dans le but d'étudier leur évolution.

Dans cette étude, les animaux étaient soumis à une habitude au test de discrimination, suivi d'une phase d'apprentissage et de deux semaines de repos avant d'être soumis à une modification de leur alimentation. Durant cette première phase d'apprentissage, ainsi que durant la période de repos, les individus ont été nourris *ad-libitum*. Les informations relatives à l'apprentissage conceptuel (la compréhension globale des mécanismes du test durant la phase d'habitude) ainsi que celles relatives au premier apprentissage ont donc théoriquement été correctement stockées dans la mémoire à long terme. De plus, le test de discrimination étant basé sur le conditionnement opérant (récompense en cas de succès et punition en cas d'échec) il est raisonnable de penser que l'expérience de l'animal a été suffisamment forte pour provoquer un stockage de l'information à long terme. En effet, il a déjà été montré que les expériences émotionnellement fortes sont fortement consolidées dans la mémoire à long terme, l'amygdale jouant un rôle de modulation [208,209]. Le second apprentissage semblait, quant à lui, beaucoup plus difficile. En effet, lors de la validation de la tâche de discrimination visuelle, les animaux, tous nourris *ad-libitum*, montraient une amélioration de leurs capacités d'apprentissage (apprentissage plus rapide et avec moins d'erreurs) sur un protocole similaire et utilisant les mêmes paires de stimuli visuels que ceux utilisés lors des premier et second apprentissages de ce protocole (triangle noir en plastique contre cercle blanc en carton pour le premier apprentissage puis rectangle vert en gomme avec des cercles noirs concentriques contre étoile bleue en papier rigide pour le

second apprentissage) du fait d'une acquisition du contexte général du test [185]. Lors du test effectué au cours de ce travail de thèse, les individus du groupe CTL présentaient des performances similaires aux deux apprentissages, suggérant une demande cognitive équivalente (contexte général du test acquis).

Nous avons observé des capacités d'apprentissage altérées chez les individus du groupe RC. Confrontés pour la première fois au test de discrimination, les individus ont dû acquérir une compréhension générale du test en lui-même ainsi qu'apprendre la discrimination à l'aide du conditionnement opérant. Le réseau neuronal permettant la compréhension générale du test, c'est-à-dire sauter de la plateforme de départ sur l'une des plateformes disponibles afin de rejoindre le nichoir, ne doit être créé qu'une fois puis est utilisé à chaque nouvelle présentation du test, menant à une amélioration des performances pour les tests suivants [185]. Contrairement à ce dernier, le réseau neuronal permettant la discrimination visuelle, c'est à dire l'association stimulus/plateforme stable, doit être créé pour chaque nouvelle paire de stimuli et peut être utilisé de nouveau dans le cadre d'un test de mémoire portant sur la même paire de stimuli. Le réseau neuronal permettant la discrimination durant le premier test d'apprentissage a été créé alors que la nourriture était fournie *ad-libitum* permettant un apport énergétique optimal. Au contraire, celui créé lors de la seconde discrimination, l'a été en période de déficit d'énergie disponible pour les individus du groupe RC. Les coûts associés à la plasticité synaptique ainsi qu'à la neurotransmission étant importants [210,211], les modifications intervenant durant un apprentissage pourraient être trop coûteuses pour les individus confrontés à un déficit d'apport énergétique. Ce déficit a pu conduire à une diminution de la capacité d'apprentissage pour le groupe RC. De même, une étude récente a suggéré que le cerveau avait tendance à éviter les tâches cognitives énergétiquement coûteuses leur préférant d'autres moins coûteuses lors de la prise de décision [212]. Dans notre étude, le microcèbe confronté à un déficit de l'apport énergétique pourrait ainsi éviter la prise de décision quant aux choix à effectuer et modifier sa stratégie en conséquence ce qui amènerait à une diminution du taux de réussite par l'utilisation d'une stratégie sub-optimale. De plus, la performance au second test d'apprentissage est corrélée avec la perte de masse normalisée. Ainsi les individus qui ont perdu le plus de masse corporelle par rapport à leur masse de départ sont ceux qui réussissent le moins bien ce test. Ceci conforte l'hypothèse d'un coût énergétique

trop important de l'apprentissage sous restriction pour les individus RC visible par la baisse des performances à ce test par rapport à la première session.

Les individus ont été soumis à la fois à des tests d'apprentissage et à un test de mémoire du premier apprentissage. Alors que les performances lors du second test d'apprentissage ont globalement diminué pour tous les groupes et que le taux de réussite était corrélé à la perte de masse normalisée, les performances lors du test de mémoire ont été différentiellement affectées chez les individus du groupe RC. L'amélioration significative des performances lors du test de mémoire pour les individus du groupe CTL n'a pas été observée pour le groupe RC. Ici, quelques individus du groupe RC montraient des performances similaires aux individus du groupe CTL, alors que d'autres individus du même groupe montraient des déficits cognitifs importants pour ce test. Une telle différence inter-individuelle est rare chez des sujets adultes et pourrait être expliquée par une réponse différentielle au traitement notamment sur la perte de masse. En effet, nous avons relevé une tendance significative pour la corrélation entre la variation de masse corporelle normalisée et les performances à ce test de mémoire pour les individus du groupe RC. Cette tendance montrait que les individus qui perdaient le plus de poids étaient ceux présentant les plus mauvaises performances lors de ce test de mémoire.

Il a déjà été montré que l'apprentissage et la mémoire d'un test de discrimination se basaient sur différents systèmes au sein du cerveau [213]. McDonald *et al.* (2007) [213] ont passé en revue les indices suggérant que l'apprentissage d'une tâche simple de discrimination dépendait principalement du striatum dorso-latéral alors que le rappel d'une discrimination déjà apprise dépendait de l'hippocampe. Il n'est ainsi pas surprenant d'observer des effets différents de la restriction calorique sur chacun des deux tests. En effet, plusieurs études ont montré qu'une hypoglycémie entraînait des pertes dendritiques voire des nécroses cellulaires dans l'hippocampe [214,215], région cérébrale qui joue un rôle prépondérant dans le rappel d'une discrimination précédemment acquise. Les individus avec la plus importante diminution de masse corporelle devraient être ceux les plus exposés à des hypoglycémies et, par conséquent, à des déficits de fonctionnement de l'hippocampe associés se traduisant par une diminution de la capacité de mémoire. De plus, lors de la période de jours longs, le microcèbe n'est pas physiologiquement adapté à faire face à une baisse de

la quantité de nourriture disponible et, ne pouvant entrer en torpeur journalière efficacement [216], il continue de perdre du poids et principalement de la masse maigre [194]. Par conséquent, les individus perdant le plus de poids sont ceux qui sont incapables de faire face à une diminution de l'apport énergétique [217,218]. Dans une telle situation, employer l'énergie disponible pour des processus cérébraux coûteux serait plus dangereux pour la survie de l'animal que de l'employer pour se maintenir. Ainsi les capacités de mémoire sont maintenues chez les individus qui réussissent à maintenir une balance énergétique équilibrée. Ces différences dans les effets de la RC sur la mémoire et l'apprentissage d'une discrimination simple renforcent l'idée que ce test est difficile pour le microcèbe. Ces résultats donnent de nouveaux indices renforçant le lien entre perte de poids et performances cognitives.

Au cours de cette étude, les individus ont également été soumis à des tests de mémoire spatiale. Ce test se déroulait dans un dispositif circulaire adapté au microcèbe à partir du labyrinthe de Barnes [219]. Il consistait à retrouver le couloir menant à un nichoir à l'aide de repères extérieurs au dispositif. Les résultats de ce test n'ont montré aucune différence significative entre individus des groupes RC et CTL. Cependant, le manque de résultats à ce test semble plus tenir à un manque de motivation des individus des deux groupes que de facteurs purement liés à la performance. En effet seuls 3 individus CTL et 2 individus RC ont exploré le dispositif au cours de la première session de test.

Cette étude démontre l'impact d'une diminution brutale et inattendue de l'apport énergétique sur les processus cognitifs. Les résultats indiquent que les animaux soumis à une RC étaient incapables de correctement acquérir une nouvelle discrimination et même de solliciter leur mémoire à long terme pour certains d'entre eux. La variabilité inter-individuelle dans les performances de mémoire semble liée à la condition corporelle. En effet, les animaux présentant la plus grande perte de masse corporelle étaient ceux présentant les plus mauvais résultats. L'apprentissage a, quant à lui, affecté l'ensemble du groupe, suggérant que cette tâche présente une demande énergétique plus importante. Ceci est appuyé par le fait que les individus perdant le plus de poids sont ceux qui présentent les moins bons résultats pour cette tâche. Ces résultats renforcent le lien entre fonctionnement cérébral et nutrition et plus particulièrement fonctionnement cérébral et perte de poids. Ainsi, la plasticité

acquise du microcèbe semble particulièrement affectée par l'apport énergétique et est extrêmement réduite lors d'une perte de poids importante.

V.A.4. Perte de masse limite et perturbations du fonctionnement cérébral

Dans les deux précédentes études, nous avons pu observer une forte variation interindividuelle dans la réponse à une diminution marquée et inattendue de l'apport énergétique. Ainsi, dans les deux études certains individus du groupe RC semblaient plus impactés par cette diminution que les autres. Dans l'étude RC-Chrono, 3 individus du groupe RC présentant une perte de masse de plus de 20% au moment du décalage horaire, ne parvenaient pas à se resynchroniser sur la nouvelle photopériode. On retrouve ce même pourcentage dans l'étude RC-Cog dans laquelle, 3 individus avec une perte de masse corporelle supérieure à 20% au moment du test de mémoire ne parvenaient pas à réussir le test. Dans les deux cas, le seuil de 20% de perte de masse semble être la limite du fonctionnement optimal du cerveau chez les individus restreints (Figure 51). En effet, les individus RC ne dépassant pas ce seuil réagissent de la même façon que les individus CTL.

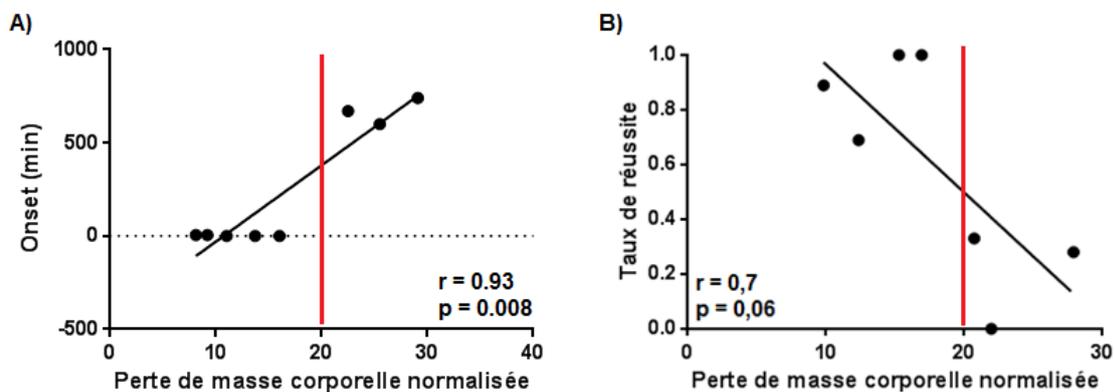


Figure 51 : Corrélations entre perte de masse normalisée et A) Onset d'activité locomotrice après un décalage horaire B) Taux de réussite à un test de mémoire de discrimination visuelle présentant le seuil de perte de masse de 20% discriminant dans le classement des individus RC suivant leur réponse à la restriction.

Il est intéressant de noter que bien que les mécanismes cérébraux sous-jacents aux comportements étudiés au cours de ces deux études soient différents, cette limite

semble être la même. Comme nous l'avons déjà vu, le fonctionnement cérébral est particulièrement coûteux [2,3]. Ainsi il semble probable que passé ce seuil, l'apport énergétique dévolu à ce type de fonction cérébrale soit insuffisant et la majorité de l'énergie redirigée vers des processus permettant la survie immédiate de l'individu.

V.B. Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la plasticité comportementale acquise du microcèbe

Ce travail avait pour but d'étudier l'effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur le comportement et les capacités cognitives du microcèbe, et donc la plasticité comportementale acquise. Cette supplémentation a conduit à une modification significative de la composition des lipides circulants avec une forte augmentation des AGPI n-3 sans changement dans le pourcentage d'acides gras saturés. Cette modification a eu pour effet une diminution du rapport AGPI n-6/ AGPI n-3 dans la ration alimentaire et, par voie de conséquence, dans les lipides plasmatiques. Il est important de noter que nous n'avons pas mesuré l'influence de cette supplémentation à long-terme sur la composition lipidique du tissu cérébral (car les animaux de cette étude sont toujours vivants). Cependant, toutes les études de supplémentation nutritionnelles en AGPI n-3 s'accompagnent d'un enrichissement significatif du cerveau en cette famille d'acides gras et plus particulièrement en dérivés à longue chaîne comme le DHA [220,221], Tout indique que c'est également le cas chez le microcèbe, dans nos conditions expérimentales [143,222]. Cet enrichissement en AGPI n-3 s'est accompagné de changements comportementaux. Après 18 mois de supplémentation, il a ainsi été relevé une latence au premier mouvement inférieure chez les individus supplémentés par rapport aux individus CTL lors d'un test d'openfield sans qu'aucune autre différence entre les deux groupes n'ait pu être observée sur les autres paramètres de ce test. En parallèle, les tests cognitifs montrent une augmentation du taux de réussite des individus supplémentés en AGPI n-3 lors d'un test d'apprentissage effectué après 18 mois de traitement alimentaire par rapport au test effectué avant le traitement. De même, les individus supplémentés en AGPI n-3 montrent une augmentation de leur taux de réussite lors du test de mémoire effectué après 18 mois de supplémentation par rapport au test effectué après 12 mois de supplémentation. Ce résultat est à mettre en parallèle avec une diminution du nombre de refus entre ces deux tests chez les individus

supplémentés. Parallèlement à ces observations comportementales, on note une augmentation de la neurogenèse dans 3 zones du cerveau le bulbe olfactif (BO), le gyrus denté (DG) et la zone sous-ventriculaire (SVZ) mais pas dans l'amygdale.

La diminution de la latence au premier mouvement lors du test d'openfield semble indiquer un niveau d'anxiété inférieur chez les individus supplémentés par rapport aux individus CTL. En effet, le test d'openfield permet de mesurer l'état émotionnel des individus à travers divers paramètres et la latence au premier mouvement est généralement associée à l'état d'anxiété [200,201]. Le test de mémoire effectué lors de la session 4 (T18 mois) montre un taux de réussite supérieur à celui du test effectué lors de la session 3 (T12 mois). Cette augmentation du taux de réussite doit cependant être mise en parallèle avec une diminution du nombre de refus entre ces mêmes tests. Ainsi, plus qu'une amélioration de la capacité de mémoire des individus, ce résultat semble indiquer une diminution de l'anxiété des individus supplémentés en AGPI n-3 lors du test de la session 4 de supplémentation. Les individus moins anxieux sont alors plus concentrés sur la tâche à accomplir et la réussissent mieux (moins de refus), entraînant une augmentation du taux de réussite. Une diminution de l'anxiété chez des individus supplémentés en AGPI n-3 a déjà été décrite lors de différentes études sur des modèles allant du rongeur à l'Homme [223–225]. De plus cette diminution de l'anxiété était également explicative de l'amélioration des performances de mémoire spatiale chez le microcèbe après une supplémentation de 5 mois lors d'une étude précédente réalisée au laboratoire [143].

Cependant, l'augmentation du taux de réussite entre le test d'apprentissage effectué à T0 et celui effectué à T18 mois, ne peut être expliquée par une baisse du nombre de refus entre ces deux tests. Ainsi, ce résultat ne serait pas lié seulement à la diminution de l'anxiété mais pourrait également être le fruit d'autres mécanismes liés aux différents rôles des AGPI n-3 au sein de l'organisme. Un des rôles des AGPI n-3 est, en effet, un rôle structural. Le DHA est un des principaux constituants fondamentaux des lipides membranaires, particulièrement concentré dans les membranes du système nerveux central. Par ce rôle, il module l'activité de protéines membranaires comme la pompe Na/K ATPase ou la cytochrome oxydase permettant ainsi une augmentation de la production d'ATP [114,123]. Il peut également influencer sur l'expression des transporteurs de glucose au niveau du cerveau [121,122]. Ainsi

les individus supplémentés, qui présentent une part importante de DHA circulant, doivent présenter une concentration plus élevée en DHA dans les membranes cérébrales permettant un meilleur apport énergétique au cerveau et un fonctionnement optimisé de ce dernier se traduisant par une meilleure réussite lors du taux d'apprentissage. La supplémentation en AGPI n-3 semble également conduire à une augmentation de la neurogenèse permettant une amélioration de la capacité d'apprentissage des individus supplémentés. En effet, il a déjà été montré que la supplémentation en AGPI n-3 favorisait la neurogenèse ou à défaut avait un rôle protecteur sur les neurones, via une modification du rapport AGPI n-6/ AGPI n-3 [125–127].

Nous avons cherché à savoir si la supplémentation en AGPI n-3 pouvait avoir un effet sur le processus de neurogenèse dans des zones cérébrales spécifiquement impliquées dans la mémoire et les émotions chez le microcèbe. Cette activité neurogénique a été démontrée dans le cerveau des primates adultes, notamment chez les macaques, au niveau du bulbe olfactif, de la SVZ [226] et de l'hippocampe [227,228]. Le présent travail a tout d'abord permis de montrer la présence de ce processus pour la première fois chez le microcèbe et, à notre connaissance, pour la première fois chez un primate prosimien [229]. En plus des régions présentées ici, la neurogenèse a également été observée en quantité importante au niveau du cortex auditif (données non présentées), modalité sensorielle très fortement exploitée chez le microcèbe. Dans les régions associées à la mémoire telles que le bulbe olfactif et le gyrus denté, les AGPI n-3 ont tendance à favoriser le processus de neurogenèse (augmentation d'environ 30%). Cette augmentation, plutôt importante quantitativement, a été également observée dans d'autres expériences de supplémentation chez le rongeur. En effet, un résultat similaire a été observé chez la souris âgée chez qui la supplémentation en AGPI n-3 à long terme multiplie par 3 le nombre de nouveaux neurones produits sur une durée de 6 jours dans l'hippocampe [230]. Cette hausse de nouveaux neurones est sans doute à mettre en relation avec la mémoire et l'apprentissage. Chez des rats âgés la supplémentation en DHA à long-terme augmente la neurogenèse hippocampique ce qui démontre que les AGPI n-3 sont impliqués dans le développement et le maintien de l'apprentissage et la mémoire en stimulant de nouveaux neurones dans l'hippocampe [231]. Le même phénomène semblerait se produire dans le bulbe olfactif. Pour estimer l'impact sur la

mémoire dans cette région, il serait intéressant de tester la mémoire olfactive des animaux. Précédemment, nous avons vu que l'anxiété et la motivation des microcèbes jouaient un rôle dans la performance lors de la discrimination visuelle. C'est la raison pour laquelle, l'étude de la neurogénèse dans l'amygdale, centre des émotions, aurait pu expliquer les différentes réponses émotionnelles face à un même stimulus [232]. Dans l'amygdale, ce processus ne semble pas être modifié par la supplémentation en AGPI n-3 et ne peut donc pas être mis en relation avec les modifications comportementales observées en lien avec les émotions, sur la base des résultats présentés ici. Cependant, il est nécessaire de prendre du recul sur les conclusions de l'étude de la neurogénèse et ce pour deux raisons principales. Tout d'abord, ces résultats sont préliminaires car ils ont été obtenus à partir d'un nombre limité d'animaux (n=3 dans chaque groupe). Ensuite, à ce stade, nos résultats ne permettent pas de démontrer un lien de causalité formel entre amélioration comportementale et apparition des nouveaux neurones. Ces observations sont exclusivement corrélatives et non causales, et il faudrait maintenant réaliser des tests à la fois comportementaux mais aussi fonctionnels (IRM fonctionnelle, mesure de la fonctionnalité des réseaux neuronaux par imagerie bi-photon).

Il est toutefois possible de relier ces résultats aux études de supplémentation précédentes chez le microcèbe. En effet, il a déjà été démontré à travers deux études récentes que la supplémentation en AGPI n-3 à long-terme (plus de 6 mois) induisait à la fois une amélioration des performances cognitives liée à la baisse de l'anxiété [143] et une augmentation de l'utilisation cérébrale de glucose mesurée par imagerie TEP (tomographie par émission de positrons) [233]. Etant donné l'importance de la consommation d'énergie, essentiellement sous forme de glucose, par les neurones, nous proposons ici l'hypothèse que l'augmentation d'utilisation cérébrale du glucose était liée à une augmentation de la neurogénèse telle que celle mesurée dans la présente étude. L'augmentation d'utilisation cérébrale du glucose pourrait donc être directement due à l'augmentation de la population de neurones. Nous pouvons également supposer que la mise en place de nouvelles connexions entre les neurones existants et les nouveaux ainsi que la plasticité synaptique, permettent de soutenir des performances cognitives améliorées.

Alternativement, l'augmentation de la capacité d'apprentissage pourrait être liée à une augmentation de l'attention lors du test effectué à T18 mois. Chez l'Homme, il a déjà été décrit qu'un faible taux d'AGPI n-3 était en lien avec une capacité d'attention diminuée [139,146,234,235]. Ainsi les individus supplémentés en AGPI n-3 verraient leur capacité d'attention augmenter avec le temps passé en supplémentation et seraient plus attentifs lors du test effectué après 18 mois de traitement, conduisant à une amélioration de leur capacité d'apprentissage. Cette hypothèse permet également d'expliquer que seul l'apprentissage soit affecté. En effet, l'impact de la supplémentation en AGPI n-3 sur l'attention n'aurait été suffisant qu'à partir de 18 mois et n'aurait pas eu d'effet lors de l'acquisition de la discrimination à T12 mois précédant le test de mémoire à T18 mois.

A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur les capacités cognitives d'individus adultes ne présentant aucun trouble cérébral apparent, la majorité des études s'intéressant à leurs effets sur des populations âgées ou souffrant de troubles cérébraux [145,147,148,223,225]. Ainsi les nombreux effets d'une supplémentation en AGPI n-3 montrés lors des études sur des modèles de pathologies, des sujets âgés ou encore souffrant de troubles cérébraux seraient peu visibles sur des populations saines, ce qui tendrait à expliquer le peu d'effets observés après une supplémentation longue chez le microcèbe (environ un dixième de son espérance de vie maximale dans la colonie). De plus l'effet neuroprotecteur des AGPI n-3, montré sur différents modèles pourrait n'être vu que lors de prochaines études sur ces animaux en phase de sénescence. Cette étude montre cependant des effets bénéfiques d'une supplémentation à long terme en AGPI n-3 avec une baisse de l'anxiété des individus supplémentés, une augmentation de la capacité de mémoire des individus par rapport aux tests effectués avant le traitement alimentaire et une augmentation de la neurogénèse dans des zones cérébrales sous-tendant ces fonctions cognitives.

Si l'étude de supplémentation en AGPI n-3 avait pour but de tester l'impact de variations qualitatives sur la plasticité comportementale acquise, il est important de noter que cette supplémentation pourrait également influencer des marqueurs de

plasticité innée comme l'horloge biologique. Bien que cette influence n'ait pas été testée dans le présent travail de thèse, des travaux conduits sur d'autres espèces tels que le Hamster, ont montré leur influence sur l'expression des rythmes biologiques. Ainsi, une carence en AGPI n-3 perturbe les rythmes d'activité locomotrice et d'expression de la mélatonine, hormone clé des rythmes veille-sommeil [141]. A l'inverse, la supplémentation, lorsqu'elle est appliquée en été, semble favorable à un rétablissement d'une activité locomotrice spontanée normalisée chez le microcèbe [143]. Enfin, des travaux récents ont montré qu'au cours d'une supplémentation en AGPI n-3 de quelques semaines, appliquée en hiver, lorsque l'expression de la torpeur est plus fréquente et physiologiquement plus adaptée qu'en été, les épisodes de torpeur sont moins fréquents et moins profonds comparativement à des animaux contrôles [236]. Ces données tendent à montrer qu'il existerait également une influence de cette famille d'acides gras sur l'horloge biologique et le métabolisme, et donc sur des mécanismes de plasticité comportementale innée.

V.C. Capacités physiques, métabolisme et modifications alimentaires

Bien que la restriction soit un véritable défi énergétique, les deux études ne semblent pas montrer de baisse des performances physiques des individus. En effet, lors de ces études, les individus RC ont perdu en moyenne un cinquième de leur masse corporelle après 19 jours de restriction à 40% (RC-Cog) et un quart après 14 jours de restriction à 60% (RC-Chrono). Cependant, les tests de Rotarod menés lors d'une restriction à 40% ne montrent aucune différence dans les performances de coordination et d'endurance avant et après traitement. Il a même été noté une meilleure réussite des individus RC au test de Rotarod après le traitement alimentaire. Ces résultats suggèrent une amélioration pouvant être liée à la perte de poids. Il a déjà été montré une telle augmentation des performances de coordination et d'endurance lors d'une étude de restriction calorique chronique à 30% sur des microcèbes adultes (projet RESTRIKAL). Ce projet a permis de mettre en évidence une amélioration de l'ordre de 100% des individus restreints lors de tests de Rotarod effectué après 2, 3 et 4 ans de restriction (données du laboratoire non publiées). Outre le fait que ces observations nous permettent d'affirmer que les résultats des différents tests cognitifs n'ont pas été biaisés par de moindres performances motrices

chez les individus RC, ils montrent également une capacité physique intacte lorsque l'énergie disponible est limitée. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'étude RC-Chrono. En effet, lors de cette étude, l'activité locomotrice spontanée des individus RC n'est pas modifiée significativement au cours de la restriction alimentaire. Ceci tend à indiquer que la fourniture d'énergie par l'organisme reste suffisante pour maintenir des performances motrices permettant à l'individu de survivre dans son milieu. De plus, de nombreuses études se sont intéressées aux variations de l'allocation énergétique entre maintenance, croissance et reproduction chez différentes espèces [237–240]. Ces études montrent qu'un environnement donné favorise l'allocation d'énergie vers une fonction précise. Par exemple dans le cas de l'anodonte des piscines, l'énergie serait, en temps normal, principalement allouée à la croissance mais qu'elle serait détournée vers la reproduction en cas de forte densité de population [238]. Dans nos études, un mécanisme similaire pourrait être mis en place, et les individus investiraient préférentiellement leur énergie dans la maintenance et la recherche alimentaire plutôt que dans des processus cognitifs coûteux.

De plus, le suivi de la glycémie et de la cétonémie à jeun des individus RC et CTL pendant les 19 jours de traitement alimentaire lors de l'étude RC-Cog, n'a montré aucune différence pour ces 2 paramètres entre RC et CTL. De même, aucune évolution de la glycémie n'a été visible lors du traitement alimentaire, suggérant le maintien d'un apport constant de substrats énergétiques à l'organisme par utilisation des réserves. Lors de périodes d'hypoglycémies prolongées, l'organisme utilise les lipides de réserve conduisant à la formation de corps cétoniques. La présence de corps cétoniques dans le sang est donc un bon indicateur d'hypoglycémie. Dans cette étude, la cétonémie se situait toujours sous le seuil de détection de 0,1 mmol/L (données non-présentées), confortant l'hypothèse du maintien d'une glycémie stable et donc d'une cétonémie stable lors de la restriction. Cependant l'énergie disponible étant diminuée, nous avons vu que les individus utilisaient des stratégies comportementales d'économie d'énergie par utilisation de la torpeur et l'hypométabolisme. Cet hypométabolisme est particulièrement visible lors de l'étude RC-Chrono. Dans cette étude, une partie des individus CTL et RC a été suivie à l'aide d'un système de respirométrie permettant le suivi métabolique en continu durant les 14 jours de traitement alimentaire. Bien que le nombre d'individus suivi ait

été trop faible pour réaliser une étude statistique il est intéressant de noter une baisse importante du métabolisme des individus RC pendant la restriction. Leur métabolisme est alors très inférieur à celui des individus CTL sur une grande partie de la journée. La RC induit généralement une diminution du métabolisme qui permet de compenser le déficit énergétique chez différentes espèces [241,242]. Ces données permettent non seulement de montrer une diminution du métabolisme des individus RC mais également une stratégie d'utilisation de substrats énergétiques différents. En effet, ces enregistrements nous permettent de calculer le quotient respiratoire (Figure 52). Comme pour la consommation d'oxygène, marqueur du métabolisme des individus, le quotient respiratoire est très inférieur chez les individus RC par rapport aux individus CTL suggérant une utilisation préférentielle de substrats lipidiques. Au contraire ce quotient est relativement élevé chez les individus CTL suggérant une utilisation de substrats majoritairement glucidiques.

Dans une précédente étude menée sur des individus de la colonie de Brunoy en hiver et en été et soumis à des restrictions de 40% et 80% pour chacune de ces saisons, il avait été montré que les individus utilisaient différents substrats énergétiques en fonction de la saison avec utilisation prioritaire de masse maigre en été afin de diminuer le métabolisme et utilisation de masse grasse avec réduction du métabolisme par l'utilisation de la torpeur durant l'hiver [194]. Comme nous avons déjà pu le voir pour la masse, les individus utilisés au cours de ce travail de thèse ont été beaucoup plus affectés par la restriction en été que ceux de l'étude de Giroud *et al.* citée précédemment. En prenant en compte les données de métabolisme aérobie, nous pouvons voir que les individus RC de l'étude RC-Chrono présentent une utilisation préférentielle de la masse grasse similaire à celle des individus de Giroud *et al.*. Lors de l'étude RC-Cog, nous avons testé le métabolisme basal des individus des groupes RC et CTL. Au contraire des résultats de suivi métabolique en continu, nous avons observé une augmentation du métabolisme basal des individus RC entre les deux sessions du protocole. Ceci suggère qu'ils étaient plus actifs lors de la seconde session ou maladaptés à la restriction car utilisant plus d'énergie au repos. Dans notre expérience, les mesures de métabolisme basal ont été menées 4 heures avant la présentation de la nourriture. Cette fenêtre temporelle pourrait très bien faire l'objet d'une activité locomotrice spontanée plus importante du fait de l'anticipation de la présentation de la nourriture qui se retrouve en période de restriction alimentaire

[243]. Ces résultats ne sont donc pas incompatibles avec la baisse générale du métabolisme.

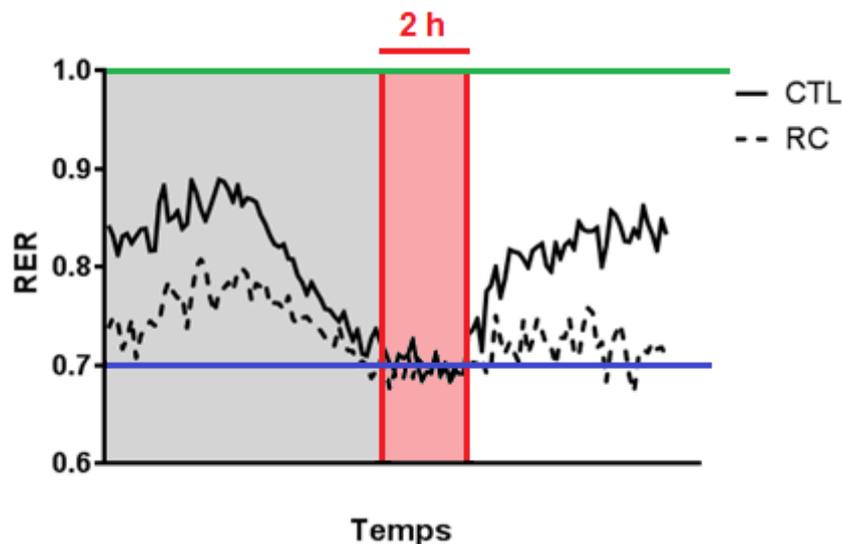


Figure 52 : Quotient respiratoire moyen d'individus CTL ($n = 2$) et RC ($n = 2$) au cours d'une journée divisée en une phase d'obscurité (gris) et une phase de lumière (blanc). La plage rouge correspond à la plage où les métabolismes sont identiques. Le seuil bleu correspond au seuil théorique d'utilisation unique des lipides. Le seuil vert correspond au seuil théorique d'utilisation unique des glucides.

Les modifications de l'alimentation testées ici ne semblent donc pas avoir d'effet sur les performances motrices. Lors de la restriction calorique, les individus parviennent à maintenir une glycémie stable ainsi que des performances locomotrices élevées. Cependant, ce challenge énergétique les pousse à modifier leur métabolisme en le réduisant comportementalement ainsi qu'en utilisant d'autres substrats énergétiques. Ainsi une grande partie de l'énergie utilisée par les individus RC semble provenir de l'oxydation des acides gras de réserve qui leur permet de maintenir une glycémie stable.

V.D. Variation inter-individuelle, aspect motivationnel et autres biais lors des tests physiques et cognitifs

Au cours des trois études développées dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons pu noter de fortes variations inter-individuelles dans les réponses

comportementales des groupes soumis à un changement de l'alimentation. Outre l'effet visible du régime alimentaire, plusieurs paramètres propres aux différents individus permettent d'expliquer ces variations. Un des principaux biais potentiels est le niveau de motivation des individus pour effectuer les tests. Ce problème, s'il est inexistant dans l'étude RC-Chrono où seuls les comportements spontanés sont analysés, est prépondérant lors des tests cognitifs en conditions contrôlées. Ainsi lors du test de la plateforme circulaire effectué au cours de l'étude RC-Cog, seule une partie des individus se montrait suffisamment motivée pour explorer le dispositif et chercher la sortie du test que se soit pour les individus CTL ou RC. De même certains individus refusent d'effectuer une partie des essais lors des tests de mémoire et d'apprentissage conduisant à des plus faibles taux de réussite. Lors de l'élaboration d'un test, le facteur motivation doit être pris en compte car permettant de supprimer les biais ou de réduire le nombre d'essais ou de sessions nécessaires [185]. Ce facteur est d'autant plus important dans les études sur la restriction calorique que la motivation ne peut être augmentée par une récompense alimentaire. Cette baisse de la motivation se retrouve également entre les saisons. Dans l'étude sur les effets d'une supplémentation en AGPI n-3 on peut noter des variations similaires des performances des individus des groupes CTL et AGPI n-3 sur la tâche de discrimination. En effet, pour les deux groupes, il y a une augmentation du taux de réussite entre les tests d'apprentissage effectués après 12 mois et 18 mois de traitement alimentaire et les tests effectués après 6 mois de traitement alimentaire. En parallèle, les deux groupes présentent une réduction du nombre de refus lors du test d'apprentissage effectué après 18 mois de traitement alimentaire par rapport au test effectué après 6 mois de traitement alimentaire. Ces résultats indiquent deux choses. D'une part, les individus présentent une amélioration de leur performance en été (12 mois) par rapport à l'hiver (6 mois). Il est assez normal d'observer un tel phénomène sachant que le microcèbe est une espèce présentant une saisonnalité marquée [159,162,193,244]. Ainsi l'hiver, cette espèce diminue son activité afin d'économiser de l'énergie. Ici les individus des deux groupes présentaient une faible capacité d'apprentissage probablement due à l'influence de la saison. La différence observée entre les deux hivers (tests à 6 mois et 18 mois) est, quant à elle, principalement due à une diminution du nombre de refus d'effectuer le test. Ainsi les individus des deux groupes semblent s'être habitués à la semaine de test en hiver et prennent plus facilement part aux tests cognitifs. De même que pour l'apprentissage,

on note une baisse du nombre de refus entre le test de mémoire effectué au cours du premier hiver (6 mois) et celui effectué lors du second hiver (18 mois) chez les individus CTL indiquant, là aussi, une habituation au test. Une autre cause de biais potentiel peut être liée au stress de l'animal. En effet il est possible que des individus plus stressés soient moins performants au cours des tests cognitifs. L'anxiété est largement considérée comme un facteur de biais cognitif [245,246]. Ainsi les individus les plus enclins au stress pourraient montrer des performances cognitives faibles sous l'effet de ce dernier. Le stress peut également être un facteur expliquant la grande variabilité des mesures de glycémie des deux groupes expérimentaux lors de l'étude sur l'effet de la restriction sur les capacités cognitives.

Nos études montrent de grandes variations dans le comportement et les résultats à différents tests chez le microcèbe. Différents paramètres extérieurs sont à prendre en compte lors de l'explication des résultats. En effet, la motivation des individus joue un rôle important dans la performance des individus à un test donné, les individus non motivés pouvant être confondus avec des individus non performants. Cette absence de motivation peut être due à des facteurs différents comme l'adéquation du test avec l'écologie de l'espèce ou encore la saisonnalité. Un autre facteur important à prendre en compte lors de l'analyse des résultats correspond au stress qui peut diminuer les performances cognitives des individus. Ainsi il convient de prendre en compte ces différents paramètres lors de l'analyse des résultats comportementaux.

Conclusion générale et Perspectives

En conclusion, nos données démontrent que les modifications de l'alimentation, qu'elles soient quantitatives ou qualitatives peuvent avoir des effets importants sur la plasticité comportementale innée comme acquise. La restriction calorique, par le challenge énergétique qu'elle représente, semble particulièrement critique et dépendre de la capacité des animaux à gérer la perte de poids. Le fonctionnement de l'horloge biologique et des fonctions cognitives sont d'autant plus impactés que la perte de masse corporelle est importante. De plus, il semble qu'il existe un seuil de perte de masse corporelle au-delà duquel les processus cérébraux ne sont plus assurés de manière optimale. Ce seuil semble se situer autour de 20% de la masse initiale. Ceci pourrait être dû à une allocation préférentielle de l'énergie disponible à la survie des individus par le maintien de fonctions motrices essentielles. Les modifications qualitatives de l'alimentation telle que la supplémentation en micronutriments de type AGPI n-3 semblent également capables d'influencer la plasticité comportementale. Cependant, les effets sont plus limités sur des individus adultes sains. L'augmentation de la création de nouveaux neurones au sein des certaines structures cérébrales pourrait cependant permettre une augmentation de la plasticité comportementale acquise par création de nouveaux réseaux.

Ainsi ce travail de thèse montre que la diminution de l'énergie disponible engendrée par une restriction calorique, même courte, peut réduire la plasticité comportementale, qu'elle soit innée ou acquise. La plasticité comportementale permettant une adaptation rapide de l'organisme aux changements de son environnement, cette réduction de la plasticité est particulièrement dommageable dans le cas où ces changements devraient se poursuivre dans le temps, l'individu étant alors maladapté et moins à même de survivre. Certains mécanismes de compensation, comme la neurogénèse ou un compromis énergétique bien géré, peuvent contrecarrer certains de ces effets.

Au-delà de la supplémentation en AGPI n-3, d'autres micronutriments peuvent être capables d'influencer l'un ou l'autre des types de plasticité comportementale. C'est le cas notamment de polyphénols tels que le Resveratrol qui peut à la fois agir sur la régulation de l'horloge biologique et les performances mnésiques [247–249], ou de vitamines [250]. Les travaux de la présente thèse, en complément des travaux cités ci-dessus, permettent donc de mettre en lumière le fait que les variations

nutritionnelles, qu'elles soient quantitatives ou qualitatives sont capables d'influencer massivement les différentes formes de plasticités comportementales et donc les grandes fonctions cérébrales. Ces résultats confirment le rôle central de la nutrition dans le fonctionnement optimal du cerveau et les conséquences de ce fonctionnement sur les capacités d'adaptations des individus face aux changements environnementaux.

Références bibliographiques

- [1] M.F. Bear, B.W. Connors, M.A. Paradiso, *Neuroscience : exploring the brain*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- [2] C. Kennedy, O. Sakurada, M. Shinohara, J. Jehle, L. Sokoloff, Local cerebral glucose utilization in the normal conscious macaque monkey., *Ann. Neurol.* 4 (1978) 293–301
- [3] L. Leybaert, M. De Bock, M. Van Moorhem, E. Decrock, E. De Vuyst, Neurobarrier coupling in the brain: adjusting glucose entry with demand., *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3213–20.
- [4] D.D. Clarke, L. Sokoloff, *Circulation and Energy Metabolism of the Brain*, in: *Basic Neurochem.*, Lippincott-Raven, 1999.
- [5] L. Sokoloff, Energetics of functional activation in neural tissues., *Neurochem. Res.* 24 (1999) 321–9.
- [6] D. Attwell, C. Iadecola, The neural basis of functional brain imaging signals., *Trends Neurosci.* 25 (2002) 621–5.
- [7] F. Bellisle, Effects of diet on behaviour and cognition in children., *Br. J. Nutr.* 92 Suppl 2 (2004) S227-32.
- [8] L.M. Riby, A.S. Law, J. McLaughlin, J. Murray, Preliminary evidence that glucose ingestion facilitates prospective memory performance., *Nutr. Res.* 31 (2011) 370–7.
- [9] S.I. Sünram-Lea, J.K. Foster, P. Durlach, C. Perez, Glucose facilitation of cognitive performance in healthy young adults: examination of the influence of fast-duration, time of day and pre-consumption plasma glucose levels., *Psychopharmacology (Berl)*. 157 (2001) 46–54.

- [10] S. Cunnane, S. Nugent, M. Roy, A. Courchesne-Loyer, E. Croteau, S. Tremblay, et al., Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease., *Nutrition*. 27 (2011) 3–20.
- [11] A.A.M. Morris, Cerebral ketone body metabolism., *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 109–21.
- [12] S.L. Lewis, D.P. Edwards, D. Galbraith, Increasing human dominance of tropical forests, *Science* (80-.). 349 (2015) 827–832.
- [13] K.E. Trenberth, T.J. Hoar, El Niño and climate change, *Geophys. Res. Lett.* 24 (1997) 3057–3060.
- [14] S. Mandujano, Preliminary Evidence of the Importance of ENSO in Modifying Food Availability for White-tailed Deer in a Mexican Tropical Dry Forest¹, *Biotropica*. 38 (2006) 695–699.
- [15] A. Sih, M.C.O. Ferrari, D.J. Harris, Evolution and behavioural responses to human-induced rapid environmental change., *Evol. Appl.* 4 (2011) 367–87.
- [16] U. Tuomainen, U. Candolin, Behavioural responses to human-induced environmental change., *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86 (2011) 640–57.
- [17] G. Bell, Adaptation, extinction and global change, *Evol. Appl.* 1 (2008).
- [18] L.-M. Chevin, R. Lande, G.M. Mace, Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory, *PLoS Biol.* 8 (2010)
- [19] R. Lande, Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation, *Res. Popul. Ecol. (Kyoto)*. 40 (1998) 259–269.
- [20] D.N. Reznick, C.K. Ghalambor, The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution., *Genetica*. 112–113 (2001) 183–98.

- [21] E.C. Snell-Rood, An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity, *Anim. Behav.* 85 (2013) 1004–1011.
- [22] F. Mery, J.G. Burns, Behavioural plasticity: an interaction between evolution and experience, *Evol. Ecol.* 24 (2009) 571–583.
- [23] P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, A.-M. Alborn, C. Nordborg, D.A. Peterson, et al., Neurogenesis in the adult human hippocampus, *Nat. Med.* 4 (1998) 1313–1317.
- [24] G. Ming, H. Song, Adult neurogenesis in the Mammalian central nervous system, *Annu. Rev. Neurosci.* 28 (2005) 223–250.
- [25] P. Taupin, F.H. Gage, Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals, *J. Neurosci. Res.* 69 (2002) 745–749.
- [26] P. Vuarin, P.Y. Henry, Field evidence for a proximate role of food shortage in the regulation of hibernation and daily torpor: A review, *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 184 (2014) 683–697.
- [27] N.J. Dingemans, M. Wolf, Between-individual differences in behavioural plasticity within populations: causes and consequences, *Anim. Behav.* 85 (2013) 1031–1039.
- [28] N.J. Dingemans, A.J.N. Kazem, D. Réale, J. Wright, Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity., *Trends Ecol. Evol.* 25 (2010) 81–9.
- [29] K.J. Mathot, J. Wright, B. Kempenaers, N.J. Dingemans, Adaptive strategies for managing uncertainty may explain personality-related differences in behavioural plasticity, *Oikos*. 0 (2012) 1–12.
- [30] C. Dibner, U. Schibler, U. Albrecht, *The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks*, 2010.

- [31] The Organization of Circadian Clocks in Animals, <http://www.pharma.uzh.ch/en/research/chronobiology/areas/chronobiology/introduction0/inanimals.html>
- [32] R.Y. Moore, The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system, 1st ed., Elsevier Inc., 2013.
- [33] R. Buijs, R. Salgado, E. Sabath, C. Escobar, Peripheral circadian oscillators: Time and food, 1st ed., Elsevier Inc., 2013.
- [34] F. HALBERG, Circadian (about twenty-four-hour) rhythms in experimental medicine., *Proc. R. Soc. Med.* 56 (1963) 253–7.
- [35] L. Zhang, L.J. Ptáček, Y.-H. Fu, Diversity of human clock genotypes and consequences., *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 119 (2013) 51–81.
- [36] Y. Hasegawa, M. Arita, Circadian clocks optimally adapt to sunlight for reliable synchronization., *J. R. Soc. Interface.* 11 (2014)
- [37] M.W. Hankins, S.N. Peirson, R.G. Foster, Melanopsin: an exciting photopigment., *Trends Neurosci.* 31 (2008) 27–36.
- [38] M.D. Rollag, D.M. Berson, I. Provencio, Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment., *J. Biol. Rhythms.* 18 (2003) 227–34.
- [39] E. Challet, Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals., *J. Comp. Physiol. B.* 180 (2010) 631–644.
- [40] S.J. Shettleworth, *Cognition, Evolution, and Behavior*, Oxford University Press, 2009.

- [41] J. Morand-Ferron, E.F. Cole, J.L. Quinn, Studying the evolutionary ecology of cognition in the wild: a review of practical and conceptual challenges., *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* (2015).
- [42] R. Dukas, J.M. Ratcliffe, *Cognitive Ecology II*, 2009.
- [43] C.W. Cotman, G.S. Lynch, The neurobiology of learning and memory, *Cognition*. 33 (1989) 201–241.
- [44] L.R. Squire, Declarative and Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning and Memory, *J. Cogn. Neurosci.* 4 (1992) 232–243.
- [45] D.O. Hebb, *The Organization of Behavior: A Neuropsychological theory*, Wiley, 1949.
- [46] Konorski, Jerzy, *Conditioned reflexes and neuron organization*, (1948).
- [47] R. Lamprecht, J. LeDoux, Structural plasticity and memory, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 45–54.
- [48] R.A. Nicoll, R.C. Malenka, Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*. 377 (1995) 115–118.
- [49] E.P. Bauer, G.E. Schafe, J.E. LeDoux, NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala., *J. Neurosci.* 22 (2002) 5239–49.
- [50] A. Matus, Actin-based plasticity in dendritic spines., *Science*. 290 (2000) 754–8.
- [51] A. Mecklinger, The control of long-term memory: Brain systems and cognitive processes, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 34 (2010) 1055–1065.

- [52] A. Ben-Yakov, Y. Dudai, M.R. Mayford, Memory Retrieval in Mice and Men, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. (2015)
- [53] G. Szapiro, J.M. Galante, D.M. Barros, M. Levi de Stein, M.R.M. Vianna, L.A. Izquierdo, et al., Molecular mechanisms of memory retrieval., Neurochem. Res. 27 (2002) 1491–8.
- [54] G. Szapiro, L.A. Izquierdo, M. Alonso, D. Barros, G. Paratcha, P. Ardenghi, et al., Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval., Neuroscience. 99 (2000) 1–5.
- [55] G. Riedel, J. Micheau, A.G. Lam, E.L. Roloff, S.J. Martin, H. Bridge, et al., Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes., Nat. Neurosci. 2 (1999) 898–905.
- [56] T. Abel, K.M. Lattal, Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval, Curr. Opin. Neurobiol. 11 (2001) 180–187.
- [57] M.R. Vianna, D.M. Barros, T. Silva, H. Choi, C. Madche, C. Rodrigues, et al., Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats., Psychopharmacology (Berl). 150 (2000) 77–84.
- [58] K.A. Goosens, W. Holt, S. Maren, A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats., Behav. Brain Res. 114 (2000) 145–52.
- [59] S. Trouche, B. Bontempi, P. Rouillet, C. Rampon, Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (2009) 5919–24.

- [60] C.M. McCay, M.F. Crowell, L.A. Maynard, The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size, *J. Nutr.* 10 (1935) 63–79.
- [61] B.J. Willcox, D.C. Willcox, H. Todoriki, A. Fujiyoshi, K. Yano, Q. He, et al., Caloric Restriction, the Traditional Okinawan Diet, and Healthy Aging: The Diet of the World's Longest-Lived People and Its Potential Impact on Morbidity and Life Span, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1114 (2007) 434–455.
- [62] M. Suzuki, D.C. Willcox, M.W. Rosenbaum, B.J. Willcox, M. Suzuki, D.C. Willcox, et al., Oxidative stress and longevity in okinawa: an investigation of blood lipid peroxidation and tocopherol in okinawan centenarians., *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2010 (2010)
- [63] H.O. Bang, J. Dyerberg, A.B. Nielsen, Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos., *Lancet (London, England)*. 1 (1971) 1143–5.
- [64] J.-M. Alessandri, P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, et al., Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life, *Reprod. Nutr. Dev.* 44 (2004) 509–538.
- [65] S.-J. Lin, M. Kaeberlein, A.A. Andalis, L.A. Sturtz, P.-A. Defossez, V.C. Culotta, et al., Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration, *Nature*. 418 (2002) 344–348.
- [66] H.A. Tissenbaum, L. Guarente, Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*. 410 (2001) 227–230.
- [67] J.R. Vanfleteren, B.P. Braeckman, G.L. Anderson, G.L. Anderson, J. Apfeld, C. Kenyon, et al., Mechanisms of life span determination in *Caenorhabditis elegans*, *Neurobiol. Aging*. 20 (1978) 487–502.

- [68] H.Y. Cohen, C. Miller, K.J. Bitterman, N.R. Wall, B. Hekking, B. Kessler, et al., Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase, *Science* (80-.). 305 (2004).
- [69] Y. Kanfi, R. Shalman, V. Peshti, S.N. Pilosof, Y.M. Gozlan, K.J. Pearson, et al., Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability, 2008.
- [70] C.-K. Lee, R.G. Klopp, R. Weindruch, T.A. Prolla, Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction, *Science* (80-.). 285 (1999).
- [71] K.A. Al-Regaiey, M.M. Masternak, M. Bonkowski, L. Sun, A. Bartke, Long-Lived Growth Hormone Receptor Knockout Mice: Interaction of Reduced Insulin-Like Growth Factor I/Insulin Signaling and Caloric Restriction, *Endocrinology*. 146 (2005) 851–860.
- [72] S.E. Dunn, F.W. Kari, J. French, J.R. Leininger, G. Travlos, R. Wilson, et al., Dietary Restriction Reduces Insulin-like Growth Factor I Levels, Which Modulates Apoptosis, Cell Proliferation, and Tumor Progression in p53-deficient Mice, *Cancer Res*. 57 (1997).
- [73] M. Blüher, B.B. Kahn, C.R. Kahn, Extended Longevity in Mice Lacking the Insulin Receptor in Adipose Tissue, *Science* (80-.). 299 (2003).
- [74] N.D. Hunt, G.D. Li, M. Zhu, M. Miller, A. Levette, M.E. Chachich, et al., Effect of calorie restriction and refeeding on skin wound healing in the rat., *Age (Dordr)*. 34 (2012) 1453–8.
- [75] R.J. Colman, T.M. Beasley, J.W. Kemnitz, S.C. Johnson, R. Weindruch, R.M. Anderson, Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys, *Nat. Commun*. 5 (2014).
- [76] J.W. Kemnitz, E.B. Roecker, R. Weindruch, D.F. Elson, S.T. Baum, R.N. Bergman, Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys., *Am. J. Physiol*. 266 (1994) E540-7.

- [77] M.A. Lane, S.S. Ball, D.K. Ingram, R.G. Cutler, J. Engel, V. Read, et al., Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points., *Am. J. Physiol.* 268 (1995) E941-8.
- [78] G.L. Branch-Mays, D.R. Dawson, J.C. Gunsolley, M.A. Reynolds, J.L. Ebersole, K.F. Novak, et al., The effects of a calorie-reduced diet on periodontal inflammation and disease in a non-human primate model., *J. Periodontol.* 79 (2008) 1184–91.
- [79] J.L. Ebersole, M.J. Steffen, M.A. Reynolds, G.L. Branch-Mays, D.R. Dawson, K.F. Novak, et al., Differential gender effects of a reduced-calorie diet on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates., *J. Periodontal Res.* 43 (2008) 500–7.
- [80] A. Black, D.B. Allison, S.A. Shapses, E.M. Tilmont, A.M. Handy, D.K. Ingram, et al., Calorie restriction and skeletal mass in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): evidence for an effect mediated through changes in body size., *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56 (2001) B98-107.
- [81] B.D. Sitzmann, J.A. Mattison, D.K. Ingram, G.S. Roth, M.A. Ottinger, H.F. Urbanski, Impact of Moderate Calorie Restriction on the Reproductive Neuroendocrine Axis of Male Rhesus Macaques., *Open Longev. Sci.* 3 (2010) 38–47.
- [82] J.O. Holloszy, L. Fontana, Caloric restriction in humans., *Exp. Gerontol.* 42 (2007) 709–12.
- [83] F.M. Cerqueira, F.M. Cunha, F.R.M. Laurindo, A.J. Kowaltowski, Calorie restriction increases cerebral mitochondrial respiratory capacity in a NO•-mediated mechanism: Impact on neuronal survival, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1236–1241.
- [84] L.C. Ribeiro, A. Quincozes-Santos, M.C. Leite, R.T. Abib, J. Kleinkauf-Rocha, R. Biasibetti, et al., Caloric restriction increases hippocampal glutamate uptake and glutamine synthetase activity in Wistar rats, *Neurosci. Res.* 64 (2009) 330–334.

- [85] A. Fontan-Lozano, J.L. Saez-Cassanelli, M.C. Inda, M. De Los Santos-Arteaga, S.A. Sierra-Dominguez, G. Lopez-Lluch, et al., Caloric Restriction Increases Learning Consolidation and Facilitates Synaptic Plasticity through Mechanisms Dependent on NR2B Subunits of the NMDA Receptor, *J. Neurosci.* 27 (2007) 10185–10195.
- [86] A. Hiona, C. Leeuwenburgh, Effect of Age and Caloric restriction on Barin Neuronal Cell Death/Survival, *Ann. New York Acad. Sci.* 1019 (2004) 96–105.
- [87] A. Fontan-Lozano, G. Lopez-Lluch, J.M. Delgado-Garcia, P. Navas, A.M. Carrion, Molecular Bases of Caloric Restriction Regulation of Neuronal Synaptic Plasticity, *Mol. Neurobiol.* 38 (2008) 167–177.
- [88] D. Chen, J. Bruno, E. Easlou, S.-J. Lin, H.-L. Cheng, F.W. Alt, et al., Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction., *Genes Dev.* 22 (2008) 1753–7.
- [89] S. Michán, Y. Li, M.M.-H. Chou, E. Parrella, H. Ge, J.M. Long, et al., SIRT1 Is Essential for Normal Cognitive Function and Synaptic Plasticity, *J. Neurosci.* 30 (2010) 9695–9707.
- [90] P.R. Mouton, M.E. Chachich, C. Quigley, E. Spangler, D.K. Ingram, Caloric restriction attenuates amyloid deposition in middle-aged APP/ PS1 mice, *Neurosci. Lett.* 464 (2009) 184.
- [91] A. Sridharan, M. Pehar, M.S. Salamat, T.D. Pugh, B.B. Bendlin, A.A. Willette, et al., Calorie restriction attenuates astrogliosis but not amyloid plaque load in aged rhesus macaques: a preliminary quantitative imaging study., *Brain Res.* 1508 (2013) 1–8.
- [92] E.K. Kastman, A.A. Willette, C.L. Coe, B.B. Bendlin, K.J. Kosmatka, D.G. McLaren, et al., A calorie-restricted diet decreases brain iron accumulation and preserves motor performance in old rhesus monkeys., *J. Neurosci.* 32 (2012) 11897–904.

- [93] H.E. Koubi, J.P. Robin, G. Dewasmes, Y. Le Maho, J. Frutoso, Y. Minaire, Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization., *Physiol. Behav.* 50 (1991) 337–43.
- [94] I. Caldelas, C.A. Feillet, H. Dardente, F. Eclancher, A. Malan, S. Gourmelen, et al., Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output., *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 921–9.
- [95] S.A. Patel, N. Velingkaar, K. Makwana, A. Chaudhari, R. Kondratov, Calorie restriction regulates circadian clock gene expression through BMAL1 dependent and independent mechanisms., *Sci. Rep.* 6 (2016) 25970.
- [96] D. Resuehr, J. Olcese, Caloric restriction and melatonin substitution: effects on murine circadian parameters., *Brain Res.* 1048 (2005) 146–52.
- [97] J. Mendoza, C. Graff, H. Dardente, P. Pevet, E. Challet, Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle., *J. Neurosci.* 25 (2005) 1514–22.
- [98] O. Froy, The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals., *Front. Neuroendocrinol.* 28 (2007) 61–71.
- [99] H.-H. Tian, A.-R. Aziz, W. Png, M.F. Wahid, D. Yeo, A.-L. Constance Png, Effects of fasting during ramadan month on cognitive function in muslim athletes., *Asian J. Sports Med.* 2 (2011) 145–53.
- [100] M.W. Green, N. a. Elliman, P.J. Rogers, Lack of effect of short-term fasting on cognitive function, *J. Psychiatr. Res.* 29 (1995) 245–253.
- [101] T.V.E. Kral, M. Heo, L.M. Whiteford, M.S. Faith, Effects on cognitive performance of eating compared with omitting breakfast in elementary schoolchildren., *J. Dev. Behav. Pediatr.* 33 (2012) 9–16.

- [102] K. Eckles-Smith, D. Clayton, P. Bickford, M.D. Browning, Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression, *Mol. Brain Res.* 78 (2000) 154–162.
- [103] L.W. Means, J.L. Higgins, T.J. Fernandez, Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning, *Physiol. Behav.* 54 (1993) 503–508.
- [104] A. Kuhla, S. Lange, C. Holzmann, F. Maass, J. Petersen, B. Vollmar, et al., Lifelong Caloric Restriction Increases Working Memory in Mice, *PLoS One.* 8 (2013).
- [105] A. Dal-Pan, J. Terrien, F. Pifferi, R. Botalla, I. Hardy, J. Marchal, et al., Caloric restriction or resveratrol supplementation and ageing in a non-human primate: First-year outcome of the RESTRIKAL study in *Microcebus murinus*, *Age (Omaha).* 33 (2011) 15–31.
- [106] S. Yanai, Y. Okaichi, H. Okaichi, Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats., *Neurobiol. Aging.* 25 (2004) 325–32.
- [107] A. V Witte, M. Fobker, R. Gellner, S. Knecht, A. Flöel, Caloric restriction improves memory in elderly humans., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 1255–60.
- [108] M.W. Green, P.J. Rogers, N.A. Elliman, S.J. Gatenby, Impairment of cognitive performance associated with dieting and high levels of dietary restraint., *Physiol. Behav.* 55 (1994) 447–52.
- [109] C. Poumès-Ballihaut, B. Langelier, F. Houlier, J.M. Alessandri, G. Durand, C. Latge, et al., Comparative bioavailability of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat., *Lipids.* 36 (2001) 793–800.
- [110] S.C. Cunnane, M.A. Ryan, C.R. Nadeau, R.P. Bazinet, K. Musa-Veloso, U. McCloy, Why is carbon from some polyunsaturates extensively recycled into lipid synthesis?, *Lipids.* 38 (2003) 477–84.

- [111] S.C. Cunnane, K. Musa, M.A. Ryan, S. Whiting, D.D. Fraser, Potential role of polyunsaturates in seizure protection achieved with the ketogenic diet., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*. 67 (n.d.) 131–5.
- [112] C.D. Stubbs, A.D. Smith, The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function., *Biochim. Biophys. Acta*. 779 (1984) 89–137.
- [113] ANSES, Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, 2011.
- [114] J.M. Bourre, M. Francois, A. Youyou, O. Dumont, M. Piciotti, G. Pascal, et al., The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats., *J. Nutr.* 119 (1989) 1880–92.
- [115] S. Favrelière, L. Barrier, G. Durand, S. Chalon, C. Tallineau, Chronic dietary n-3 polyunsaturated fatty acids deficiency affects the fatty acid composition of plasmeneylethanolamine and phosphatidylethanolamine differently in rat frontal cortex, striatum, and cerebellum., *Lipids*. 33 (1998) 401–7.
- [116] T. Moriguchi, N. Salem, Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance., *J. Neurochem.* 87 (2003) 297–309.
- [117] I. Carrié, M. Clément, D. de Javel, H. Francès, J.M. Bourre, Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice., *J. Lipid Res.* 41 (2000) 473–80.
- [118] V.C. Gavino, G.R. Gavino, Adipose hormone-sensitive lipase preferentially releases polyunsaturated fatty acids from triglycerides., *Lipids*. 27 (1992) 950–4.
- [119] J.C. DeMar, K. Ma, J.M. Bell, S.I. Rapoport, Half-lives of docosahexaenoic acid in rat brain phospholipids are prolonged by 15 weeks of nutritional deprivation of n-3 polyunsaturated fatty acids., *J. Neurochem.* 91 (2004) 1125–37.

- [120] J. Bernsohn, F.J. Spitz, Linoleic- and linolenic acid dependency of some brain membrane-bound enzymes after lipid deprivation in rats., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57 (1974) 293–8.
- [121] F. Pifferi, F. Roux, B. Langelier, J.-M. Alessandri, S. Vancassel, M. Jouin, et al., (n-3) polyunsaturated fatty acid deficiency reduces the expression of both isoforms of the brain glucose transporter GLUT1 in rats., *J. Nutr.* 135 (2005) 2241–6.
- [122] F. Pifferi, M. Jouin, J.M. Alessandri, U. Haedke, F. Roux, N. Perrière, et al., n-3 Fatty acids modulate brain glucose transport in endothelial cells of the blood-brain barrier., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 77 (2007) 279–86.
- [123] A. Ximenes da Silva, F. Lavalie, G. Gendrot, P. Guesnet, J.-M. Alessandri, M. Lavalie, Glucose transport and utilization are altered in the brain of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids., *J. Neurochem.* 81 (2002) 1328–37.
- [124] D.G. Birch, E.E. Birch, D.R. Hoffman, R.D. Uauy, Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33 (1992) 2365–76.
- [125] B.S. Beltz, M.F. Tlusty, J.L. Benton, D.C. Sandeman, Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis., *Neurosci. Lett.* 415 (2007) 154–8.
- [126] R. Crupi, M. Cambiaghi, R. Deckelbaum, I. Hansen, J. Mindes, E. Spina, et al., n-3 fatty acids prevent impairment of neurogenesis and synaptic plasticity in B-cell activating factor (BAFF) transgenic mice, *Prev. Med. (Baltim).* 54 (2012) S103–S108.
- [127] W.J. Lukiw, J.-G. Cui, V.L. Marcheselli, M. Bodker, A. Botkjaer, K. Gotlinger, et al., A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease., *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 2774–83.
- [128] S. Delion, S. Chalon, D. Guilloteau, J.C. Besnard, G. Durand, alpha-Linolenic acid dietary deficiency alters age-related changes of dopaminergic and

serotonergic neurotransmission in the rat frontal cortex., *J. Neurochem.* 66 (1996) 1582–91.

[129] S. Delion, S. Chalon, J. Hérault, D. Guilloteau, J.C. Besnard, G. Durand, Chronic dietary alpha-linolenic acid deficiency alters dopaminergic and serotonergic neurotransmission in rats., *J. Nutr.* 124 (1994) 2466–76.

[130] S. Chalon, Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 75 (n.d.) 259–69.

[131] S. Chalon, S. Vancassel, L. Zimmer, D. Guilloteau, G. Durand, Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission., *Lipids.* 36 (2001) 937–44.

[132] L. Zimmer, S. Vancassel, S. Cantagrel, P. Breton, S. Delamanche, D. Guilloteau, et al., The dopamine mesocorticolimbic pathway is affected by deficiency in n-3 polyunsaturated fatty acids., *Am. J. Clin. Nutr.* 75 (2002) 662–7.

[133] L. Zimmer, E. Kudas, D. Guilloteau, L. Garreau, J.-C. Besnard, S. Chalon, Microdialysis as a tool for in vivo study of dopamine transporter function in rat brains, *J. Neurosci. Methods.* 103 (2000) 137–144.

[134] L. Zimmer, S. Hembert, G. Durand, P. Breton, D. Guilloteau, J.C. Besnard, et al., Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid diet-deficiency acts on dopamine metabolism in the rat frontal cortex: a microdialysis study., *Neurosci. Lett.* 240 (1998) 177–81.

[135] E. Kudas, L. Galineau, S. Bodard, S. Vancassel, D. Guilloteau, J.-C. Besnard, et al., Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat., *J. Neurochem.* 89 (2004) 695–702.

[136] S. Aïd, S. Vancassel, C. Pournès-Ballihaut, S. Chalon, P. Guesnet, M. Lavielle, Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus., *J. Lipid Res.* 44 (2003) 1545–51.

- [137] I. Fedorova, N. Hussein, M.H. Baumann, C. Di Martino, N. Salem, An n-3 fatty acid deficiency impairs rat spatial learning in the Barnes maze., *Behav. Neurosci.* 123 (2009) 196–205.
- [138] I. Fedorova, N. Hussein, C. Di Martino, T. Moriguchi, J. Hoshiba, S. Majchrzak, et al., An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 77 (2007) 269–77.
- [139] I. Fedorova, N. Salem, Omega-3 fatty acids and rodent behavior., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 75 (2006) 271–89.
- [140] T. Takeuchi, M. Iwanaga, E. Harada, Possible regulatory mechanism of DHA-induced anti-stress reaction in rats., *Brain Res.* 964 (2003) 136–43.
- [141] M. Laviaille, G. Champeil-Potokar, J.M. Alessandri, L. Balasse, P. Guesnet, C. Papillon, et al., An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters., *J. Nutr.* 138 (2008) 1719–24.
- [142] S. Reisbick, M. Neuringer, Omega-3 Fatty Acid Deficiency and Behavior, in: *Handb. Essent. Fat. Acid Biol.*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997: pp. 397–426.
- [143] N. Vinot, M. Jouin, A. Lhomme-Duchadeuil, P. Guesnet, J.-M. Alessandri, F. Aujard, et al., Omega-3 Fatty Acids from Fish Oil Lower Anxiety, Improve Cognitive Functions and Reduce Spontaneous Locomotor Activity in a Non-Human Primate, *PLoS One.* 6 (2011) 1–8.
- [144] S. Languille, F. Aujard, F. Pifferi, Effect of dietary fish oil supplementation on the exploratory activity, emotional status and spatial memory of the aged mouse lemur, a non-human primate, *Behav. Brain Res.* 235 (2012) 280–286.

- [145] I. Carrié, G. Abellan Van Kan, Y. Rolland, S. Gillette-Guyonnet, B. Vellas, PUFA for prevention and treatment of dementia?, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 4173–85.
- [146] G. Young, J. Conquer, Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders., *Reprod. Nutr. Dev.* 45 (2005) 1–28.
- [147] F. Calon, G. Cole, Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 77 (2007) 287–293.
- [148] R. Palacios-Pelaez, W.J. Lukiw, N.G. Bazan, Omega-3 Essential Fatty Acids Modulate Initiation and Progression of Neurodegenerative Disease, *Mol. Neurobiol.* 41 (2010) 367–374.
- [149] I. Tattersall, Madagascar's Lemurs: Cryptic diversity or taxonomic inflation?, *Evol. Anthropol. Issues, News, Rev.* 16 (2007) 12–23.
- [150] E.E. Louis, M.S. Coles, R. Andriantompohavana, J.A. Sommer, S.E. Engberg, J.R. Zaonarivelo, et al., Revision of the Mouse Lemurs (*Microcebus*) of Eastern Madagascar, *Int. J. Primatol.* 27 (2006) 347–389.
- [151] A.D. Yoder, R.M. Rasoloarison, S.M. Goodman, J.A. Irwin, S. Atsalis, M.J. Ravosa, et al., Remarkable species diversity in Malagasy mouse lemurs (primates, *Microcebus*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 11325–30.
- [152] A.D. Yoder, M.M. Burns, F. Enin, Molecular Evidence of Reproductive Isolation in Sympatric Sibling Species of Mouse Lemurs, *Int. J. Primatol.* 23 (2002).
- [153] D.W. Weisrock, S.D. Smith, L.M. Chan, K. Biebouw, P.M. Kappeler, A.D. Yoder, Concatenation and Concordance in the Reconstruction of Mouse Lemur Phylogeny: An Empirical Demonstration of the Effect of Allele Sampling in Phylogenetics, *Mol. Biol. Evol.* 29 (2012) 1615–1630.

- [154] A. Nassor, M.R. Jury, Intra-seasonal climate variability of Madagascar. Part 1: Mean summer conditions, *Meteorol. Atmos. Phys.* 65 (1998) 31–41.
- [155] A. Nassor, M.R. Jury, Intra-seasonal climate variability of Madagascar. Part 2: Evolution of flood events, *Meteorol. Atmos. Phys.* 64 (1997) 243–254.
- [156] R.E. Dewar, A.F. Richard, Evolution in the hypervariable environment of Madagascar., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13723–7.
- [157] M. Dammhahn, P.M. Kappeler, Comparative Feeding Ecology of Sympatric *Microcebus berthae* and *M. murinus*, *Int. J. Primatol.* 29 (2008) 1567–1589.
- [158] M. Joly, E. Zimmermann, Do solitary foraging nocturnal mammals plan their routes?, *Biol. Lett.* 7 (2011) 638–640.
- [159] R.D. Martin, A review of the behaviour and ecology of the lesser mouse lemurs (*Microcebus murinus*), in: *Comp. Ecol. Behav. Primates*, 1973: pp. 1–68.
- [160] U. Radespiel, W. Reimann, M. Rahelinirina, E. Zimmermann, Feeding Ecology of Sympatric Mouse Lemur Species in Northwestern Madagascar, *Int. J. Primatol.* 27 (2006) 311–321.
- [161] S. Thorén, F. Quietzsch, D. Schwochow, L. Sehen, C. Meusel, K. Meares, et al., Seasonal Changes in Feeding Ecology and Activity Patterns of two sympatric Mouse Lemur species, the Gray Mouse Lemur (*Microcebus murinus*) and the Golden-brown Mouse Lemur (*M. ravelobensis*), in Northwestern Madagascar, *Int. J. Primatol.* 32 (2011) 566–586.
- [162] R.D. Martin, A preliminary field study of the lesser mouse lemur *Microcebus murinus*, *Z. Tierpsychol.* 9 (1972) 43–89.
- [163] Pagès-Feuillade E., Modalités de l'occupation de l'espace et relations interindividuelles chez un prosimien nocturne malgache (*Microcebus murinus*), *Folia Primatol.* 50 (1988) 204–220.

- [164] J. Fietz, Body Mass in Wild *Microcebus murinus* over the Dry Season, *Folia Primatol.* 69 (1998) 183–190.
- [165] U. Radespiel, Sociality in the Gray Mouse Lemur (*Microcebus murinus*) in Northwestern Madagascar, *Am. J. Primatol.* 51 (2000) 21–40.
- [166] M. Eberle, P.M. Kappeler, Sex in the dark: determinants and consequences of mixed male mating tactics in *Microcebus murinus*, a small solitary nocturnal primate, *Behav Ecol Sociobiol.* 57 (2004) 77–90.
- [167] M. Perret, Influence of social factors on sex ratio at birth, maternal investment and young survival in a prosimian primate, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 27 (1990) 447–454.
- [168] M. Seguy, M. Perret, Grégarisme et rythme journalier de la température interne en fonction de la disponibilité alimentaire chez un primate nocturne, in: *Sur Quelques Asp. La Chronobiologie*, Université de Saint-Etienne, 2004: pp. 71–76.
- [169] M. Séguy, M. Perret, Factors affecting the daily rhythm of body temperature of captive mouse lemurs (*Microcebus murinus*)., *J. Comp. Physiol. B.* 175 (2005) 107–115.
- [170] C.I. Canale, M. Perret, M. Théry, P.-Y. Henry, Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate, *J. Exp. Biol.* 214 (2011) 551–560.
- [171] F. Aujard, M. Perret, G. Vannier, Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character?, *J. Comp. Physiol. B.* 168 (1998) 540–8.
- [172] F. Génin, M. Perret, Photoperiod-induced changes in energy balance in gray mouse lemurs., *Physiol. Behav.* 71 (n.d.) 315–21.

- [173] J. Schmid, P.M. Kappeler, Fluctuating sexual dimorphism and differential hibernation by sex in a primate, the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43 (1998) 125–132.
- [174] T. LeTallec, M. Théry, M. Perret, Effects of light pollution on seasonal estrus and daily rhythms in a nocturnal primate, *J. Mammal.* 96 (2015) 438–445.
- [175] T. Le Tallec, M. Théry, M. Perret, Melatonin concentrations and timing of seasonal reproduction in male mouse lemurs (*Microcebus murinus*) exposed to light pollution, *J. Mammal.* 97 (2016) 753–760.
- [176] J. Schmid, Daily torpor in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in Madagascar: energetic consequences and biological significance, *Oecologia.* 123 (2000) 175–183.
- [177] J. Schmid, J.R. Speakman, Torpor and energetic consequences in free-ranging grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): a comparison of dry and wet forests, *Naturwissenschaften.* 96 (2009) 609–620.
- [178] F. Geiser, R.L. Drury, Radiant heat affects thermoregulation and energy expenditure during rewarming from torpor., *J. Comp. Physiol. B.* 173 (2003) 55–60.
- [179] J. Terrien, L. Ambid, M. Nibbelink, A. Saint-Charles, F. Aujard, Non-shivering thermogenesis activation and maintenance in the aging gray mouse lemur (*Microcebus murinus*)., *Exp. Gerontol.* 45 (2010) 442–8.
- [180] C.I. Canale, P.-Y. Henry, Energetic costs of the immune response and torpor use in a primate, *Funct. Ecol.* 25 (2011) 557–565.
- [181] S. Giroud, M. Perret, Y. Le Maho, I. Momken, C. Gilbert, S. Blanc, Gut hormones in relation to body mass and torpor pattern changes during food restriction and re-feeding in the gray mouse lemur., *J. Comp. Physiol. B.* 179 (2009) 99–111.

- [182] T.C. Roth, N.C. Rattenborg, V. V Pravosudov, The ecological relevance of sleep: the trade-off between sleep, memory and energy conservation., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365 (2010) 945–59.
- [183] C. Kraus, M. Eberle, P.M. Kappeler, The costs of risky male behaviour: sex differences in seasonal survival in a small sexually monomorphic primate, *Proc. R. Soc.* 275 (2008) 1635–44.
- [184] E. Rasoazanabary, Male and Female Activity Patterns in *Microcebus murinus* During the Dry Season at Kirindy Forest, Western Madagascar, *Int. J. Primatol.* 27 (2006) 437–464.
- [185] J.-L. Picq, N. Villain, C. Gary, F. Pifferi, M. Dhenain, Jumping Stand Apparatus Reveals Rapidly Specific Age-Related Cognitive Impairments in Mouse Lemur Primates., *PLoS One.* 10
- [186] M. Joly, S. Ammersdörfer, D. Schmidtke, E. Zimmermann, Touchscreen-based cognitive tasks reveal age-related impairment in a primate aging model, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*)., *PLoS One.* 9 (2014) e109393.
- [187] M. Joly, B. Deputte, J.-M. Verdier, Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, *Neurobiol. Aging.* 27 (2006) 1045–1049.
- [188] S.G. Trouche, T. Maurice, S. Rouland, J.-M. Verdier, N. Mestre-Francés, The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances., *Neurobiol. Learn. Mem.* 94 (2010) 100–6.
- [189] P. Kappel, S. Hohenbrink, U. Radespiel, Experimental evidence for olfactory predator recognition in wild mouse lemurs, *Am. J. Primatol.* 73 (2011) 928–938.
- [190] M. Joly, E. Zimmermann, First evidence for relocation of stationary food resources during foraging in a strepsirhine primate (*Microcebus murinus*)., *Am. J. Primatol.* 69 (2007) 1045–52.

- [191] M. Joly, M. Scheumann, E. Zimmermann, Wild Mouse Lemurs Revisit Artificial Feeding Platforms: Implications for Field Experiments on Sensory and Cognitive Abilities in Small Primates, *Am. J. Primatol.* 70 (2008) 892–896.
- [192] M.-L. Lührs, M. Dammhahn, P.M. Kappeler, C. Fitchel, Spatial memory in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), *Anim. Cogn.* 12 (2009) 599–609.
- [193] S. Giroud, S. Blanc, F. Aujard, F. Bertrand, C. Gilbert, M. Perret, Chronic food shortage and seasonal modulations of daily torpor and locomotor activity in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*)., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2008) R1958–R1967.
- [194] S. Giroud, M. Perret, P. Stein, J. Goudable, F. Aujard, C. Gilbert, et al., The grey mouse lemur uses season-dependent fat or protein sparing strategies to face chronic food restriction, *PLoS One.* 5 (2010).
- [195] F. Génin, M. Perret, Daily hypothermia in captive grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*): effects of photoperiod and food restriction, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 136 (2003) 71–81.
- [196] K.S. Lashley, The Mechanism of Vision: I. A Method for Rapid Analysis of Pattern-Vision in the Rat, *Pedagog. Semin. J. Genet. Psychol.* 37 (1930) 453–460.
- [197] Centre national de coordination des études et recherches sur la nutrition et l'alimentation (France), A. Martin, Centre national de la recherche scientifique (France), Agence française de sécurité sanitaire des aliments., Impr. Europe media duplication), *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*, Tec & doc, 2000.
- [198] C. Hall, E.L. Ballachey, A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology., *Univ. Calif. Publ. Psychol.* (1932).

- [199] C.S. Hall, Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality., *J. Comp. Psychol.* 18 (1934) 385–403.
- [200] L. Prut, C. Belzung, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, *Eur. J. Pharmacol.* 463 (2003) 3–33.
- [201] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The open-field test: A critical review., *Psychol. Bull.* 83 (1976) 482–504.
- [202] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues., *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- [203] P. Juaneda, G. Rocquelin, Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges, *Lipids.* 20 (1985) 40–41.
- [204] W.R. MORRISON, L.M. SMITH, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol, *J. Lipid Res.* 5 (1964) 600–8.
- [205] P. Guesnet, J.M. Antoine, J.B. Rochette de Lempdes, A. Galent, G. Durand, Polyunsaturated fatty acid composition of human milk in France: changes during the course of lactation and regional differences., *Eur. J. Clin. Nutr.* 47 (1993) 700–10.
- [206] M.B. Blanco, E. Rasoazanabary, L.R. Godfrey, Unpredictable environments, opportunistic responses: Reproduction and population turnover in two wild mouse lemur species (*Microcebus rufus* and *M. griseorufus*) from eastern and western Madagascar., *Am. J. Primatol.* 77 (2015) 936–947.
- [207] J. Schmid, Tree Holes Used for Resting by Gray Mouse Lemurs (*Microcebus murinus*) in Madagascar : Insulation Capacities and Energetic Consequences, *Int. J. Primatol.* 19 (1998) 797–809.

- [208] J.L. McGaugh, Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 456–461.
- [209] J.L. McGaugh, The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences., *Annu. Rev. Neurosci.* 27 (2004) 1–28.
- [210] S.B. Laughlin, R.R. de Ruyter van Steveninck, J.C. Anderson, The metabolic cost of neural information., *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 36–41.
- [211] Q. Wen, D.B. Chklovskii, A cost-benefit analysis of neuronal morphology., *J. Neurophysiol.* 99 (2008) 2320–8.
- [212] W. Kool, J.T. McGuire, Z.B. Rosen, M.M. Botvinick, Decision making and the avoidance of cognitive demand., *J. Exp. Psychol. Gen.* 139 (2010) 665–682.
- [213] R.J. McDonald, A.L. King, T.D. Wasiak, E.L. Zelinski, N.S. Hong, A complex associative structure formed in the mammalian brain during acquisition of a simple visual discrimination task: dorsolateral striatum, amygdala, and hippocampus., *Hippocampus.* 17 (2007) 759–74.
- [214] S.J. Won, B.H. Yoo, T.M. Kauppinen, B.Y. Choi, J.H. Kim, B.G. Jang, et al., Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats., *J. Neuroinflammation.* 9 (2012) 182.
- [215] R.N. Auer, T. Wieloch, Y. Olsson, B.K. Siesj, The distribution of hypoglycemic brain damage, *Acta Neuropathol.* 64 (1984) 177–191.
- [216] J. Terrien, A. Zahariev, S. Blanc, F. Aujard, Impaired control of body cooling during heterothermia represents the major energetic constraint in an aging non-human primate exposed to cold, *PLoS One.* 4 (2009)

- [217] F. Buckley, K. O'Sullivan, J.F. Mee, R.D. Evans, P. Dillon, Relationships Among Milk Yield, Body Condition, Cow Weight, and Reproduction in Spring-Calved Holstein-Friesians, *J. Dairy Sci.* 86 (2003) 2308–2319.
- [218] J.-D. Dutil, Y. Lambert, Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (2011).
- [219] C.A. Barnes, Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat., *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93 (1979) 74–104.
- [220] N. Sinn, J. Bryan, Effect of Supplementation with Polyunsaturated Fatty Acids and Micronutrients on Learning and Behavior Problems Associated with Child ADHD, *J. Dev. Behav. Pediatr.* 28 (2007) 82–91.
- [221] C.I.F. Janssen, A.J. Kiliaan, Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: The influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration, *Prog. Lipid Res.* 53 (2014) 1–17.
- [222] F. Pifferi, M. Perret, P. Guesnet, F. Aujard, J.-M. Alessandri, Fatty Acid Composition of the Brain, Retina, Liver and Adipose Tissue of the Grey Mouse Lemur (*Microcebus murinus*, Primate), *Lipids.* 47 (2012) 793–801.
- [223] B.M. Ross, Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders, Prostaglandins, *Leukot. Essent. Fat. Acids.* 81 (2009) 309–312.
- [224] L. Buydens-Branchey, M. Branchey, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Anxiety Feelings in a Population of Substance Abusers, *J. Clin. Psychopharmacol.* 26 (2006) 661–665.
- [225] A.C. Ferraz, A.M. Delattre, R.G. Almendra, M. Sonagli, C. Borges, P. Araujo, et al., Chronic ω -3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on

anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol, *Behav. Brain Res.* 219 (2011) 116–122.

[226] D.R. Kornack, P. Rakic, Cell Proliferation Without Neurogenesis in Adult Primate Neocortex, *Science* (80-.). 294 (2001) 2127–2130.

[227] E. Gould, A. Beylin, P. Tanapat, A. Reeves, T.J. Shors, Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation., *Nat. Neurosci.* 2 (1999) 260–265.

[228] D.R. Kornack, P. Rakic, Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 5768–73.

[229] T.-F. Yuan, J. Li, F. Ding, O. Arias-Carrion, Evidence of adult neurogenesis in non-human primates and human, *Cell Tissue Res.* 358 (2014) 17–23.

[230] D. Cutuli, P. De Bartolo, P. Caporali, D. Laricchiuta, F. Foti, M. Ronci, et al., n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice, *Front. Aging Neurosci.* 6 (2014) 220.

[231] E. Kawakita, M. Hashimoto, O. Shido, Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo, *Neuroscience.* 139 (2006) 991–997.

[232] J. LeDoux, The emotional brain, fear, and the amygdala., *Cell. Mol. Neurobiol.* 23 (2003) 727–38.

[233] F. Pifferi, O. Dorieux, C.-A. Castellano, E. Croteau, M. Masson, M. Guillermier, et al., Long-chain n-3 PUFAs from fish oil enhance resting state brain glucose utilization and reduce anxiety in an adult nonhuman primate, the grey mouse lemur., *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1511–8.

[234] M.H. Bloch, A. Qawasmi, Omega-3 Fatty Acid Supplementation for the Treatment of Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptomatology: Systematic Review and Meta-Analysis, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 50 (2011) 991–1000.

- [235] C.J. Antalis, L.J. Stevens, M. Campbell, R. Pazdro, K. Ericson, J.R. Burgess, Omega-3 fatty acid status in attention-deficit/hyperactivity disorder, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids.* 75 (2006) 299–308.
- [236] P. Vuarin, P.-Y. Henry, M. Perret, F. Pifferi, Dietary Supplementation with n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Reduces Torpor Use in a Tropical Daily Heterotherm, *Physiol. Biochem. Zool.* 89 (2016) 536–545.
- [237] P. Calow, *Adaptive Aspects of Energy Allocation*, in: *Fish Energ.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 1985: pp. 13–31.
- [238] J. Jokela, P. Mutikainen, Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: a field experiment, *Oecologia.* 104 (1995) 122–132.
- [239] R.E. Ricklefs, Adaptation, constraint, and compromise in avian postnatal development, *Biol. Rev.* 54 (1979) 269–290.
- [240] L.C. Fitzpatrick, Energy Allocation in the Allegheny Mountain Salamander, *Desmognathus Ochrophaeus*, *Ecol. Monogr.* 43 (1973) 43–58.
- [241] A.G. Dulloo, R. Calokatisa, Adaptation to low calorie intake in obese mice: contribution of a metabolic component to diminished energy expenditures during and after weight loss., *Int. J. Obes.* 15 (1991) 7–16.
- [242] E.I. Kawahara, N.H.P.B. Maués, K.C. dos Santos, P.O. Barbanera, C.P. Braga, A.H. Fernandes, Energy restriction and impact on indirect calorimetry and oxidative stress in cardiac tissue in rat., *Indian J. Biochem. Biophys.* 51 (2014) 365–71.
- [243] K.-F. Storch, C.J. Weitz, Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 6808–13.

- [244] J. Schmid, J.U. Ganzhorn, Optional strategies for reduced metabolism in gray mouse lemurs, *Naturwissenschaften*. 96 (2009) 737–741.
- [245] J.C. Cassady, R.E. Johnson, Cognitive Test Anxiety and Academic Performance, *Contemp. Educ. Psychol.* 27 (2002) 270–295.
- [246] O.H.P. Burman, R.M.A. Parker, E.S. Paul, M.T. Mendl, Anxiety-induced cognitive bias in non-human animals, *Physiol. Behav.* 98 (2009) 345–350.
- [247] F. Pifferi, A. Dal-Pan, S. Languille, F. Aujard, F. Pifferi, A. Dal-Pan, et al., Effects of resveratrol on daily rhythms of locomotor activity and body temperature in young and aged grey mouse lemurs., *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013 (2013).
- [248] F. Pifferi, A. Dal-Pan, M. Menaker, F. Aujard, Resveratrol Dietary Supplementation Shortens the Free-Running Circadian Period and Decreases Body Temperature in a Prosimian Primate, *J. Biol. Rhythms*. 26 (2011) 271–275.
- .
- [249] A. Dal-pan, F. Pifferi, J. Marchal, J.-L. Picq, F. Aujard, Cognitive Performances Are Selectively Enhanced during Chronic Caloric Restriction or Resveratrol Supplementation in a Primate, *PLoS One*. 6 (2011).
- [250] C.R. Olson, C. V. Mello, Significance of vitamin A to brain function, behavior and learning, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 489–495.

Annexes

Annexe 1 : Article sur l'étude RC-Cog publié dans la revue
"Behavioural Brain Research"

Body mass loss correlates with cognitive performance in
primates under acute caloric restriction conditions

Nicolas Villain¹, Jean-Luc Picq^{2,3,4}, Fabienne Aujard¹, Fabien Pifferi¹

¹ CNRS UMR 7179, MNHN, Adaptive Mechanisms and Evolution (MECADEV), 1 Av du petit château,
91800 Brunoy, France

² Laboratoire de psychopathologie et de neuropsychologie, E.A. 2027, Université Paris 8, 2 rue de la
liberté, 93000 St Denis, France

³ Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay
UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Département des Sciences
du Vivant (DSV), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, F-92265 Fontenay-aux-Roses,
France



Research report

Body mass loss correlates with cognitive performance in primates under acute caloric restriction conditions.



N. Villain^a, J.-L. Picq^{b,c,d}, F. Aujard^{a,1}, F. Pifferi^{a,*,1}

^a UMR CNRS MNHN 7179, Adaptive Mechanisms and Evolution (MECADEV), 1 Avenue du Petit Château, 91800 Brunoy, France

^b Laboratoire de Psychopathologie et de Neuropsychologie, E.A. 2027, Université Paris 8, 2 Rue de la Liberté, 93000 St Denis, France

^c Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

^d Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département des Sciences du Vivant (DSV), Institut d'Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRcen, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

HIGHLIGHTS

- Caloric restriction lowers learning abilities.
- Individuals losing the more weight are the one performing poorly in a discrimination task.
- Learning abilities are affected during caloric restriction while previously acquired memory is not.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2016

Received in revised form 24 February 2016

Accepted 28 February 2016

Available online 4 March 2016

Keywords:

Caloric restriction

Learning

Memory

Microcebus murinus

ABSTRACT

Brain functions are known to consume high levels of energy, thus, the integrity of cognitive performance can be drastically impacted by acute caloric restriction. In this study, we tested the impact of a 40% caloric restriction on the cognitive abilities of the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*).

Twenty-three male mouse lemurs were divided into two groups: 13 control animals (CTL) that were fed with 105 kJ/day and 10 calorie restricted (CR) animals that received 40% less food (63 kJ/day) than the CTL animals. The animals were fed according to their group for 19 days. Before treatment, we assessed baseline associative learning capacities, resting metabolic rates and locomotor performance of both animal groups. After treatment, we tested the same functions as well as long-term memory.

Our results showed that CR animals had lower learning performance following caloric restriction. The effects of caloric restriction on memory recall varied and depended on the metabolism of the individual animal. Body mass loss was linked to memory test performance in the CR group, and lower performance was observed in individuals losing the most weight. While CR was observed to negatively impact learning, locomotor capacities were preserved in CR animals, and there were higher resting metabolic rates in the CR group. Our data reinforce the strong link between energy allocation and brain function, and suggest that in the context of food shortage, learning capacities could be a limiting parameter in the adaptation to a changing environment.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cognitive ability is defined as the aptitude of an organism to perceive, memorize and use information extracted from its environment [1]. Cognitive ability plays a major role in the adaptation of an individual to its environment, permitting him to succeed in foraging or mating, for example [2]. In changing environments,

individuals have to adapt continuously to fit their new living conditions, and this is sustained by cognition and behaviour. Global changes induce critical environmental modifications that can lead to a sudden reduction in food availability [3]. Global changes also affect phenomena such as El-Nino events [4], which can lead to even more unpredictable events (e.g., hurricanes and drought) that may directly affect individuals [5,6]. To face these types of changes, individuals can quickly adapt their behaviour to maintain a high level of performance. Two different types of behavioural plasticity have been defined: one allowing the individual to quickly change its behaviour when facing an expected environmental change (i.e., a seasonal change) and a slower one for the changes that have never

* Corresponding author.

E-mail address: pifferi@mnhn.fr (F. Pifferi).

¹ Equal contribution.

been experienced [7,8]. Both types of behavioural plasticity rely on cognitive abilities such as learning and memory. Learning is defined as the ability for an individual to acquire new information and modify existing knowledge by coding new information with a neural representation [9]. Learning is particularly important when facing unexpected changes in the environment. Memory is defined as the ability to store newly learned information as short-term memory or to consolidate information to long-term memory via neural changes. Because the neural networks underlying these abilities are vast and complex, optimal brain functioning seems to be particularly important for an individual to maintain a high performance in its environment.

However, brain functioning and brain plasticity are energetically costly [10,11]. The brain composes 2% of the total body weight but uses 20–25% of the oxygen and glucose consumed by an organism [12], which is mainly used for synaptic communication and restoration of axon membrane potentials [13]. Because glucose is the main energy source and glycogen reserves in the brain are scarce, the brain needs a constant glucose supply for optimal functioning [14–16]. Additionally, costly sensory systems have to be maintained to ensure the acquisition of as much environmental information as possible. Because of the demands associated with proper brain and sensory organ function and their facilitation of adaptation during environmental changes, brain processes may be significantly affected by a sudden drop in available energy. Several long-term studies have investigated the effects of caloric restriction on cognitive ability, but the conclusions have been contradictory. Eckles-Smith et al. [17] showed that a lifelong caloric restriction applied to mice prevented age-related deficits in long-term potentiation. Similarly, Means et al. [18] reported that a mid-life onset of caloric restriction prolonged cognitive performance in 25-month-old mice. Conversely, Yanai et al. [19] showed deleterious effects of a 2-year caloric restriction (10 g daily food vs *ad-libitum* for controls) applied on rats when performing a spatial memory task. The same contradictions appear in human studies wherein the effects of dietary restriction have been beneficial for some and deleterious for others. In a study by Witte et al. [20], improvements of the memory capacities of elderly human subjects occurred under a 30% caloric restriction. However, in a study by Green et al. [21], dietary restraint had deleterious effects on cognitive performances (such as short-term memory performance and vigilance) in women students. Numerous studies have investigated the effects of unadapted decreases in food consumption in humans and have been inconsistent. For example, Tian et al. [22] have shown that Muslim athletes exhibit poorer cognitive abilities when performing various cognitive tests (including both detection and identification tasks and memory recall) after two weeks of Ramadan intermittent fasting. Contrarily, Green et al. [23] observed no effects of meal skipping on cognitive function in female subjects. Similar results were obtained in a study from Kral et al. [24] wherein children that did not eat breakfast exhibited the same cognitive capacities as the children who did eat breakfast. However, these effects remain poorly studied in humans. In animals, there have been no studies reported investigating the short-term cognitive consequences of a sudden and unpredictable drop in energy consumption, which is a phenomenon that could occur before adaptation to a food shortage. Thus, in the present study, we investigate the impact of an acute 40% caloric restriction on cognitive functions in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*) primate.

The grey mouse lemur is a small Malagasy prosimian primate. Because the grey mouse lemur is a nocturnal lone forager, it faces both predictable and unpredictable seasonal changes in food availability [25,26]. In this species, cognitive abilities, and particularly memory, play a major role in foraging behaviour during harsh periods. It has been shown that the grey mouse lemur is able to return to stationary food resources in the wild and to plan its for-

aging track during low availability periods [27–29]. The mouse lemur is commonly used for cognitive testing because it develops age-related cognitive impairments [30,31]. The impact of food restriction on this species has been mainly addressed during short-day, winter-like photoperiods, when the food availability is low for this species and is a condition for which they are physiologically well-adapted (*i.e.*, there are increases in body mass, fat storing mechanisms, hypometabolism, and sexual rest) [32,33]. During long-day, summer-like photoperiods, food availability is supposed to be high for the grey mouse lemur, but weather-related events may cause the food supply to drop suddenly [34]. Very little is known about the cognitive and physiological responses of mouse lemurs to food shortage during the long-day photoperiod. In the long-day season, animals are lean and sexually active. For this study, cognitive performance was assessed before and after a 19-day 40% caloric restriction using a visual discrimination task. In parallel, we also controlled physical performance using motor coordination and endurance tasks and measured the resting metabolic rate at the beginning and end of the restriction period. We hypothesize that caloric restriction will significantly alter cognitive performance.

2. Methods

2.1. Ethics statement

All experiments were performed in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health publication 86-23, revised 1985) and the European Communities Council Directive (86/609/EEC). The research was conducted under authorization number D-91.114.1 from the “Direction Départementale de la Protection des Populations” and under the approval of the Cuvier Ethical Committee (Committee number 68 of the “Comité National de Réflexion Ethique sur l’Expérimentation Animale”) under authorization number 68-018.

2.2. Subjects, testing timeline and dietary intervention

Twenty-three adult male grey mouse lemurs from 1 to 4 years of age (2.4 ± 1.1) from a colony housed in Brunoy, France were used. During the whole experiment, we kept the animals under a long-day (summer-like) photoperiod (14 h light/10 h dark). Room temperature and humidity were kept constant at $T = 25^\circ\text{C}$ and $H = 55\%$. In the wild, these environmental conditions would favour high mouse lemur activity levels.

The experiment lasted 6 weeks (Fig. 1). During the first three weeks, animals were fed with a mixture of cereal, eggs and milk (‘mixture’). Fresh fruits and water were provided *ad-libitum* [35]. At the beginning of dietary treatment, animals were separated into the following two dietary groups: one control group (CTL), receiving 15 g of mixture and 6 g of mixed banana for a total of 105 kJ/day and one calorie restricted (CR) group, receiving 40% less calories than the CTL group *i.e.*, 9 g of mixture and 3.6 g of mixed banana for a total of 63 kJ/day.

In the first week, a first test session (session 1) lasted 4 days and consisted of a resting metabolic rate and physical capacities assessment (day 1) followed by a visual discrimination test (days 2–4). After the first test session, the animals were left for two weeks without any intervention. We then isolated the animals and split them into two groups to ensure two homogeneous groups: a CTL group of 13 individuals and a CR group of 10 individuals. For the subsequent 19 days, the animals were fed according to their assigned group. The second test session (session 2) started at day 16 and was the same as the first session with a recall of the first discrimination test replacing the habituation in the visual discrimination task. During

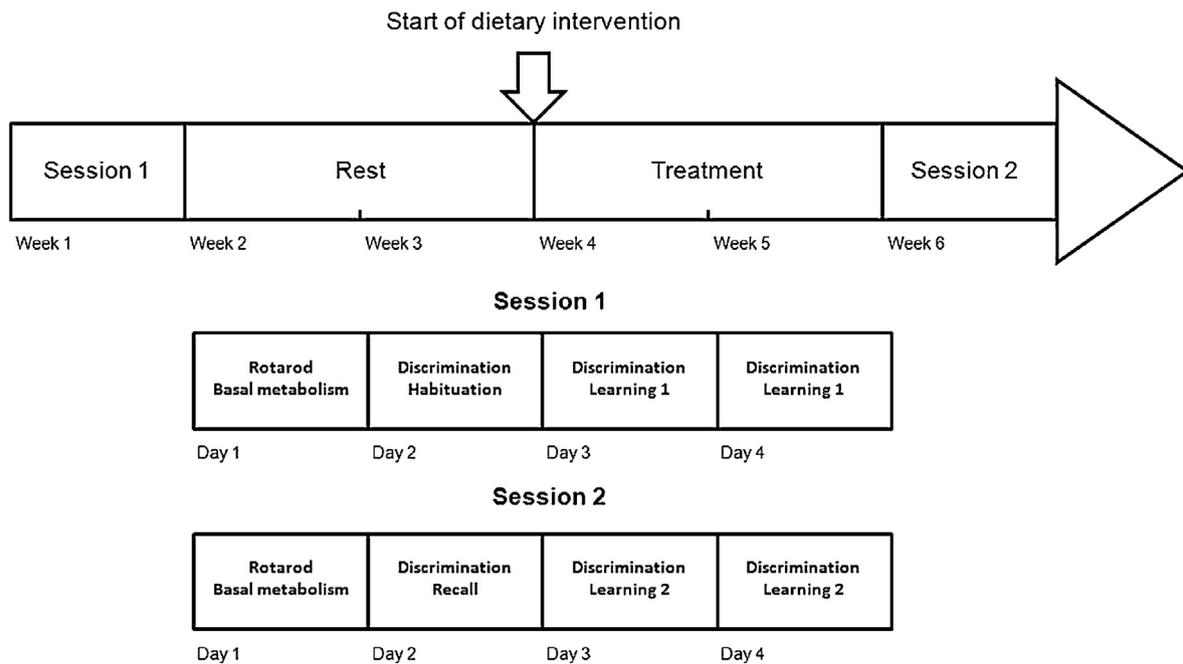


Fig. 1. Experimental timeline.

the dietary intervention period, we weighed the animals every two days to ensure that body mass did not fall below 55 g.

2.3. Rotarod

The rotarod apparatus consists of a rotating, accelerating cylinder (model 7750, Ugo Basile, Gemonio, Italy) with a rotation speed that was progressively increased up to 40 rpm. We assessed animal locomotor capacities by measuring the time spent on the cylinder.

We placed the animal on the rotating cylinder at 20 rpm. The cylinder speed was linearly increased. We allowed the animal to run freely on the cylinder. Each trial stopped when the animal fell from the apparatus or gripped the cylinder and turned on it without moving for 3 full rotations. We considered a trial as a failure when the animal jumped from the cylinder. In this case, we tested the animal again for a maximum of 5 trials per session. At the end of the test session, we kept the best time for each animal.

2.4. Basal metabolism

We assessed basal metabolism by measuring oxygen consumption with a closed circuit respirometer. We performed the measurement during the animal's daily resting period. We introduced each animal in a 2.5 l respiratory chamber that was placed in a cabinet at a controlled ambient temperature of 25 °C. We allowed the animals to habituate for 20 min under constant airflow ventilation at 21 min⁻¹. After the habituation phase, we closed the ventilation for 40 min. We measured the oxygen consumption during this 40-min time interval using the initial and final oxygen concentration measured with an analyser (Servomex 570A®). The apparatus was routinely calibrated with 100% N₂. We adjusted the basal metabolism using the animal's body mass.

2.5. Discrimination task

2.5.1. Apparatus

The discrimination task was recently validated and fully described for mouse lemurs. Among its advantages, the discrimination task does not rely on food reinforcement, which is mandatory

for CR studies [36]. In brief, a large, movable platform used as a starting platform, faced two narrow, movable, goal platforms that were placed slightly beneath. A fixed platform could be added between the two goal platforms during the habituation phase. A hole placed at the centre of the cage, behind the goal platforms, allowed the animal to enter a nest box considered as a goal box. An opaque glass prevented the animals from seeing the goal box from the starting platform. A plastic cylinder served as a starting box.

2.5.2. Testing procedure

Each session was performed over a period of 3 consecutive days. Day one consisted of a habituation phase with 7 trials without any visual stimuli. For each trial, we placed the animal into the starting cylinder for 1 min. The cylinder was then lifted up with the animal facing the platforms. We conducted the first 2 trials with a fixed central platform without any glass between the animal and the goal box. We conducted the 2 following trials with the same central platform adding an opaque glass that prevented the animal from seeing the goal box. We conducted the 3 remaining trials using either a 'right-left-right' or a 'left-right-left' sequence. For each successful trial (*i.e.*, the animal jumped on the platform and entered the goal box), we rewarded the animal by allowing him to spend 2 min in the goal box. For each unsuccessful trial, we allowed the animal to enter a nest box that was placed at the bottom of the apparatus and immediately relocated the animal to the starting cylinder for 1 min before starting a new trial. If the animal did not move after 15 s, we then moved the starting platform up and down to increase the motivation to jump.

The second and third days consisted of 2 sessions each with a 30 trial maximum (*i.e.*, the 'learning 1' test). The animal was required to reach a criterion of 8 successful trials out of 10 to be considered as a learner. For each trial, we placed the animal into the starting cylinder for 1 min. The cylinder was then lifted up with the animal facing the platforms. For each trial, we randomly associated each platform with a visual clue, allowing the animal to discriminate between the platforms. One of the visual clues indicated a fixed platform, allowing the animal to enter the goal box. The other clue indicated an unstable platform that fell when the animal jumped onto it. When the animal succeeded in reaching the goal box, we

allowed him to rest for 2 min in the goal box and scored the trial as a success. When the animal jumped on the unstable platform, we put him back on the cylinder for 1 min before beginning a new trial and scored the trial as a failure. Sometimes the animal avoided the task (*i.e.*, jumping on the floor, gripping onto the window, and refusing to jump for 5 min). In this case, we scored the trial as a refusal. For session 1, the visual cues were a 220 cm² black plastic triangle (fixed platform) and a 225 cm² white cardboard circle (unstable platform), as previously described [36].

For session 2, we replaced the habituation day by a recall of the first discrimination task (*i.e.*, the ‘recall test’). The recall test consisted of 1 session with a 30 trial maximum. The animal had to meet the same criteria as in the learning test. During the recall test, we used the same pair of visual clues as the ones used during the learning test before dietary intervention (a black plastic triangle for the fixed platform and a white cardboard circle for the unstable one). During days 2 and 3, animals were exposed to a new discrimination task using new visual stimuli (‘learning 2 test’). A 300 cm² green rubber rectangle with black concentric lines was used for the fixed platform and a 225 cm² blue star-shaped rigid paper was used for the unstable platform as previously described [36].

For both learning and memory tests, we scored the total number of trials necessary to reach the criterion, the total number of successful trials, the total number of unsuccessful trials and the total number of refusals. We defined the success rate as the number of successful trials out of the total number of trials.

2.6. Statistics

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) using parametrical tests after verifying the data normality using Shapiro-Wilk tests. Values are expressed as the means \pm SD.

Because of the differences in the starting body masses of animals in both groups (CTL starting body mass: 81.7 \pm 12.4 g, CR starting body mass: 82.8 \pm 12.9 g), we normalized the body mass using the starting body mass of each animal as a reference. In this study, we used either normalized body mass or total body mass loss in our analysis. We studied the evolution of normalized body mass data using a two-way ANOVA with the Bonferroni post-hoc test.

We used Student’s *t*-test to compare the within-group session 1 and 2 results for the time spent on Rotarod, the resting metabolic rate and the discrimination task. We used unpaired Student’s *t*-tests to analyse differences between groups for the same parameters. Finally, we used a linear regression to measure the correlation between total body mass loss and success rate at the discrimination recall task.

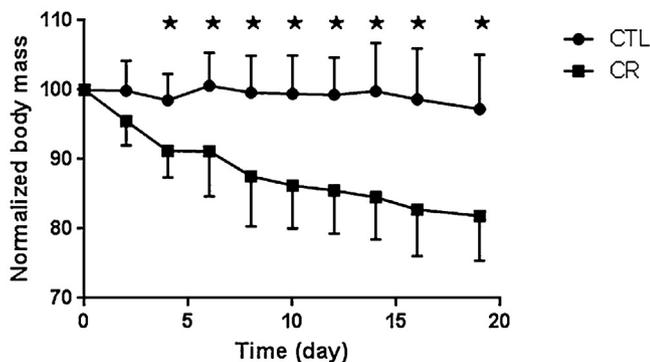


Fig. 2. Body mass changes of control (CTL, $n=13$) and calorie restricted (CR, $n=10$) animals during the 19 days of dietary treatment. *Significant difference between CTL and CR at $p < 0.05$.

Table 1

Bonferroni post-hoc test results for normalized body mass differences between control (CTL, $n=13$) and calorie restricted (CR, $n=10$) animals from day 4 to day 19.

Day	t Value	p Value
day 4	3.105	0.022
day 6	4.011	<0.001
day 8	5.109	<0.001
day 10	5.599	<0.001
day 12	5.858	<0.001
day 14	6.486	<0.001
day 16	6.741	<0.001
day 19	6.52	<0.001

For data analysis, we excluded the animals that refused to jump for the discrimination test (CTL $n=3$, CR $n=3$). Additionally, we were not able to obtain session 2 Rotarod data for 4 animals (CTL $n=1$, CR $n=3$); therefore, the results for these animals were excluded from the Rotarod analyses completely.

3. Results

3.1. Body mass

CR animals had significant body mass loss (-14.6 ± 5.8 g) at the end of the 40% caloric restriction while CTL animals had no significant change in body mass (-2.3 ± 6.6 g). Both groups presented large inter-individual variability with some animals losing twice as much body mass compared to others. The ANOVA indicated that diet ($F_{1/21} = 29.8$; $p < 0.001$), time ($F_{9/189} = 21.3$; $p < 0.001$) and their interaction ($F_{9/189} = 14.8$; $p < 0.001$) had significant effects on the body mass variations. The body masses of CR and CTL animals became significantly different at day 4 and remained significantly different until day 19 (Table 1, Fig. 2).

3.2. Rotarod

There was no significant difference in Rotarod performance within groups for session 1 and session 2 or between groups for session 2. CTL animals had a mean maximal activity of 185 ± 169 s before dietary intervention and 123 ± 106 s after dietary intervention. CR animals had a mean maximal activity of 248 ± 212 s before dietary intervention and 267 ± 238 s after dietary intervention (Fig. 3).

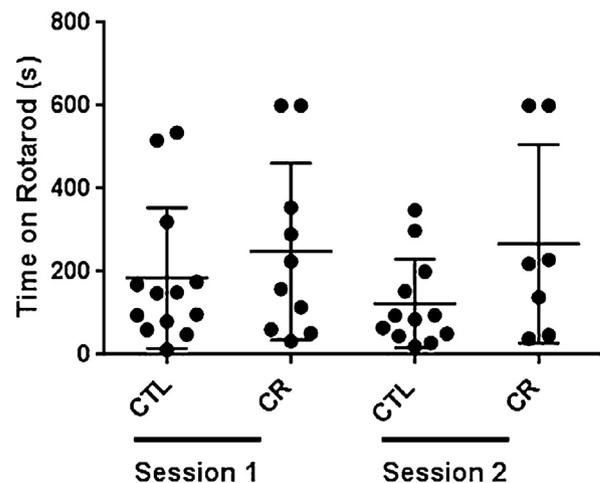


Fig. 3. Maximum time spent on Rotarod by CTL (for session 1, $n=13$ and for session 2, $n=12$) and CR (from session 1, $n=10$ and for session 2, $n=7$) animals during both test sessions.

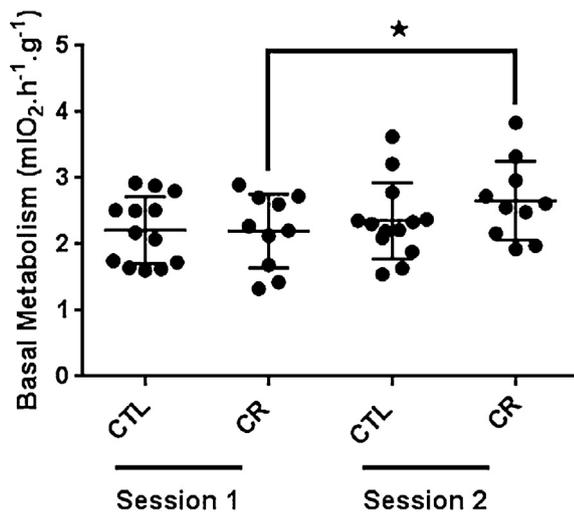


Fig. 4. Resting metabolic rate of CTL (n = 13) and CR (n = 10) animals during both test sessions. *Significant difference between CTL and CR animals at $p < 0.05$.

3.3. Basal metabolism

CTL individuals had a similar level of oxygen consumption before ($2.2 \pm 0.5 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) and after ($2.4 \pm 0.6 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) dietary intervention. The oxygen consumption of CR animals was significantly increased between session 1 ($2.2 \pm 0.6 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) and session 2 ($2.7 \pm 0.6 \text{ ml h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) ($t = 2.297$; $p = 0.047$) (Fig. 4).

3.4. Discrimination task

No significant differences between the two groups were observed for the total number of trials needed to reach the criterion in session 2. The CR animals had a total of 33.7 ± 10.5 trials for the learning 1 test, 11.7 ± 6.2 trials for the recall test and 32.6 ± 11.3 trials for the learning 2 test. CTL animals had a total of 28 ± 4.8 trials for the learning 1 test, 10.4 ± 1.9 trials for the recall test and 29.4 ± 7.4 trials for the learning 2 test.

The success rate of the CTL animals significantly increased from $42.2 \pm 16.6\%$ for the learning 1 test to $82.2 \pm 9.6\%$ for the recall test ($t = 4.718$; $p < 0.001$). CTL animals showed no significant difference in performance between the learning 1 and learning 2 test ($38.8 \pm 16.1\%$ for learning 2). Unlike the CTL group, the CR group did not exhibit any significant increases in the success rate between learning 1 and recall tests. Moreover, CR animals had a lower success rate for the learning 2 test compared to the learning 1 test ($t = 2.466$; $p = 0.049$) (Fig. 5).

In the recall tests, CR animals showed a particularly high level of inter-individual performance variability. Some animals that succeeded in recalling the learning 1 test performed as well as the CTL individuals but others performed poorly. When linked to body mass loss between session 2 and session 1, there is a significant positive correlation between weight loss and success rate ($n = 7$, $r^2 = 0.64$; $p = 0.03$, Fig. 6), and the animals with the greatest weight loss were the ones who performed the worst.

4. Discussion

The aim of this study was to observe the effects of a severe acute caloric restriction on cognitive performance in the grey mouse lemur using a short-term 40% caloric restriction during the summer-like photoperiod. We assessed cognitive, physical and metabolic performance both before and after 2 weeks of treatment to measure changes in these parameters. In the discrimination task, CR animals had impaired performances during new learn-

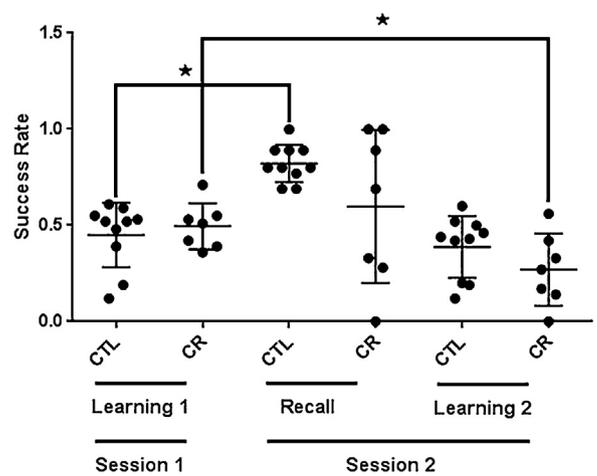


Fig. 5. Success rate at the visual discrimination task of CTL and CR animals for the learning 1 (CTL n = 12, CR n = 9), recall and learning 2 tests (n = 10 for CTL animals and n = 7 for CR animals). *Significant difference between CTL and CR at $p < 0.05$.

ing tasks. We also identified high inter-individual variability in memory recall performances in CR animals, which was also discriminated according to body weight loss; animals losing the most weight were those with the worst performances.

In our experiments, the animals performed a habituation task followed by the learning 1 test and then had a two-week rest period while being fed *ad-libitum*. The first learning session was thus consolidated under *ad-libitum* feeding conditions for all studied animals. Therefore, we can assume that the information from the contextual learning (*i.e.*, general understanding of the task during habituation) and learning 1 test were correctly stored in long-term memory. Moreover, because our experiment was based on operant conditioning with both negative and positive outcomes, we can reasonably think that the habituation event was emotionally impactful enough for the animal to store it in his long-term memory. Strong emotional experiences appear to be highly consolidated in long term memory formation via amygdala modulation [37,38]. The learning 2 task was even more challenging because it occurred after a recall task of the first task acquired one month beforehand. The role of previous experience is known to influence future performance [39,40]. In a previous study using in this same discrimination task, the animals under *ad-libitum* feeding showed an improvement of learning abilities on a similar protocol with the same pairs of visual stimuli used for the first and second learning event (black plastic triangle versus white cardboard circle for the first learning event and green rubber rectangle with black concen-

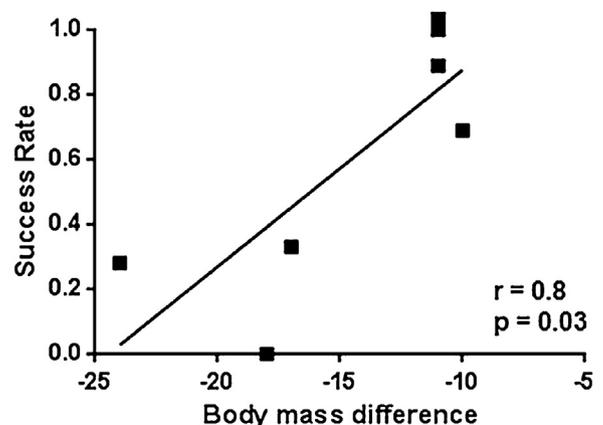


Fig. 6. Correlation between the success rate for the recall test and body mass difference in CR animals between session 2 and session 1.

tric lines versus blue star-shaped rigid paper for the second event) as they had already acquired a good understanding of the task [36]. In our experiments, the CTL animals performed equally between the learning 1 and learning 2 test, suggesting that the cognitive demands for both tasks are equivalent.

We observed altered learning abilities in CR animals. When exposed for the first time to the discrimination task, animals have to acquire a general understanding of the task itself and must also learn visual discrimination via operant conditioning. The neural network underlying general understanding of the task, which includes jumping from the starting platform to another platform to reach a goal box, is recalled for each new presentation of the same task and thereby leads to an improvement in performances for new discriminations [36]. However, the neural network underlying visual discrimination in itself, which includes associating the visual stimulus with the stable platform, has to be newly generated for each discrimination involving new sets of visual stimuli and could possibly be recalled later for a memory task involving a particular pair of visual stimuli. In contrast to the network used during the learning 1 task that was created when food was provided *ad-libitum*, the network during the learning 2 (session 2) task had to be created during the dietary intervention phase. Because of the costs of synaptic plasticity and neurotransmission [41,42], the modifications occurring during a learning event would be too costly for the animal to complete. The reduction in available energy thereby led to a decrease in learning performance in the entire CR group. Additionally, a recent study suggested that the brain tends to avoid demanding cognitive tasks [43], which may apply to this experimental condition wherein the cognitive tasks are performed under energetically unfavourable conditions.

Animals were subjected to both memory recall and new learning tests. It has already been shown that learning and memory retention of a discrimination task relies on different cerebral systems [44,45]. McDonald et al. [46] have reviewed evidence suggesting that learning of a simple discrimination task in the rat depends mainly on the dorsolateral striatum while memory recall of a previously acquired discrimination task depends on the hippocampus. It is therefore not surprising that there were different effects of CR observed on both tasks. We observed that while new learning abilities were globally altered in the CR group, memory recall was not significantly affected in all CR animals. The significant improvement of performance in memory recall observed in the CTL group was not observed in the CR group. However, some CR animals performed as well as CTL animals and other CR animals demonstrated drastic cognitive impairments in the memory recall task. Such a high inter-individual variability in performance is quite rare in adult animal subjects and could be explained by a differential effect of the treatment on each individual. In CR animals, there was a positive correlation between body mass loss and success rates in the discrimination memory task. Animals losing the most weight performed the worst on the memory task. Several studies have shown that hypoglycaemia induces damage in the hippocampus [47,48]. Because the hippocampus plays a major role in the recall of previously acquired discrimination tasks, the animals with the most significant body mass loss would be particularly vulnerable to hypoglycaemia and as a consequence, brain damage in the hippocampus would potentially occur and the associated recall difficulties. Additionally, during the long-day period, mouse lemurs are not physiologically adapted to food shortage conditions and cannot enter into an efficient daily torpor [49]; therefore, the animals will continue to lose weight that is mainly composed of fat-free mass [50]. Animals that lose the most weight are the ones that are unable to physiologically adapt to reduced energetic intake [51,52]. Under these conditions, providing energy for processes in the brain would be less beneficial for survival than using the energy to ensure survival mechanisms. Memory performance is preserved

in the animals that can maintain an energy balance. Such subtle differences in the effects of CR on memory and learning in the discrimination task reinforce the fact that this test is quite challenging for the mouse lemur. This information provides supplementary evidence for the link between body condition and cognitive performance.

The current study shows the impact of caloric restriction on cognitive performance. A two-week 40% caloric restriction appears to sufficiently challenge mouse lemurs under the long-day photoperiod and resulted in a mean body mass loss of approximately 1/6th over the course of the 19 day experiment (with high inter-individual variations). However, Rotarod tests showed no differences in performance both between and within animal groups. This suggests that CR did not decrease physical abilities of the animals, which allows us to rule out the hypothesis that the cognitive test results were biased because of physical impairment effects. Throughout the study, both animal groups maintained major survival skills such as motor coordination and balance. In parallel, we observed a change in basal metabolism when comparing between CTL and CR animals. The CR animals increased their basal metabolism between session 1 and session 2, which suggests that they were either more active during the experiment or maladapted to caloric restriction and were thereby using more energy at rest than before CR. CR has been shown to induce a decreased metabolism in different species [53,54]. In our study, the basal metabolism measurements were performed 4 h before feeding, a time window that can correspond to food anticipatory activity, which is defined as the increase in locomotor activity that precedes the presentation of food when the food is not provided *ad-libitum* [55]. It is possible that the CR animals herein are exhibiting food anticipatory activity and are already active at the time of the metabolism test (while the CTL individuals are still in a rest period), which could lead to the observed basal metabolism alterations.

5. Conclusion

This study shows the impact of caloric restriction on cognitive processes. The results indicate that animals under caloric restriction were unable to properly learn a new discrimination task and that some animals were also unable to recall tasks learned before restriction. The inter-individual variability in memory performance appears to be linked to metabolism because the animals losing the greatest amount of body mass were also the worst performers on the memory task. Learning a new discrimination task was affected by CR, suggesting that this cognitive task is more energy dependent than tasks that only require memory recall. The current findings reinforce the link between brain function and nutrition. Thus, brain function and body condition are of particular importance in the context of global changes that may require animals to forage in irregular places to find food resources.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sophie Dupont for helping to collect data and Lauriane Dezaire, Eric Gueton and Sandrine Gondor for providing animal care. We finally want to thank the Muséum National d'Histoire Naturelle and CNRS for the financial support provided for the study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.037>.

References

- [1] S.J. Shettleworth, *Cognition, Evolution, and Behavior*, Oxford University Press, 2009.
- [2] J. Morand-Ferron, E.F. Cole, J.L. Quinn, Studying the evolutionary ecology of cognition in the wild: a review of practical and conceptual challenges, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* (2015).
- [3] S.L. Lewis, D.P. Edwards, D. Galbraith, Increasing human dominance of tropical forests, *Science* 349 (2015) 827–832.
- [4] K.E. Trenberth, T.J. Hoar, El Niño and climate change, *Geophys. Res. Lett.* 24 (1997) 3057–3060.
- [5] Y. Dunham, A.S. Baron, M.R. Banaji, The development of implicit intergroup cognition, *Trends Cogn. Sci.* 12 (2008) 248–253.
- [6] L. Gould, R.W. Sussman, M.L. Sauter, Natural disasters and primate populations: the effects of a 2-year drought on a naturally occurring population of ring-tailed lemurs (*Lemur catta*) in Southwestern Madagascar, *Int. J. Primatol.* 20 (1999) 69–84.
- [7] F. Mery, J.G. Burns, Behavioural plasticity: an interaction between evolution and experience, *Evol. Ecol.* 24 (2009) 571–583.
- [8] E.C. Snell-Rood, An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity, *Anim. Behav.* 85 (2013) 1004–1011.
- [9] R. Dukas, J.M. Ratcliffe, *Cognitive Ecology II*, University of Chicago Press, Chicago, 2009.
- [10] C. Kennedy, O. Sakurada, M. Shinohara, J. Jehle, L. Sokoloff, Local cerebral glucose utilization in the normal conscious macaque monkey, *Ann. Neurol.* 4 (1978) 293–301.
- [11] L. Leybaert, M. De Bock, M. Van Moorhem, E. Decrock, E. De Vuyst, Neurobarrier coupling in the brain: adjusting glucose entry with demand, *J. Neurosci. Res.* 85 (2007) 3213–3220.
- [12] D.D. Clarke, L. Sokoloff, Circulation and energy metabolism of the brain, in: *Basic Neurochem*, Lippincott-Raven, 1999.
- [13] D. Attwell, C. Iadecola, The neural basis of functional brain imaging signals, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 621–625.
- [14] F. Bellisle, Effects of diet on behaviour and cognition in children, *Br. J. Nutr.* 92 (Suppl. 2) (2004) S227–32.
- [15] L.M. Riby, A.S. Law, J. McLaughlin, J. Murray, Preliminary evidence that glucose ingestion facilitates prospective memory performance, *Nutr. Res.* 31 (2011) 370–377.
- [16] S.I. Sünram-Lea, J.K. Foster, P. Durlach, C. Perez, Glucose facilitation of cognitive performance in healthy young adults: examination of the influence of fast-duration time of day and pre-consumption plasma glucose levels, *Psychopharmacology (Berl.)* 157 (2001) 46–54.
- [17] K. Eckles-Smith, D. Clayton, P. Bickford, M.D. Browning, Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression, *Mol. Brain Res.* 78 (2000) 154–162.
- [18] L.W. Means, J.L. Higgins, T.J. Fernandez, Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning, *Physiol. Behav.* 54 (1993) 503–508.
- [19] S. Yanai, Y. Okaichi, H. Okaichi, Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats, *Neurobiol. Aging* 25 (2004) 325–332.
- [20] A.V. Witte, M. Fobker, R. Gellner, S. Knecht, A. Flöel, Caloric restriction improves memory in elderly humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 1255–1260.
- [21] M.W. Green, P.J. Rogers, N.A. Elliman, S.J. Gatenby, Impairment of cognitive performance associated with dieting and high levels of dietary restraint, *Physiol. Behav.* 55 (1994) 447–452.
- [22] H.-H. Tian, A.-R. Aziz, W. Png, M.F. Wahid, D. Yeo, A.-L. Constance Png, Effects of fasting during Ramadan month on cognitive function in Muslim athletes, *Asian J. Sports Med.* 2 (2011) 145–153.
- [23] M.W. Green, N.A. Elliman, P.J. Rogers, Lack of effect of short-term fasting on cognitive function, *J. Psychiatr. Res.* 29 (2015) 245–253.
- [24] T.V.E. Kral, M. Heo, L.M. Whiteford, M.S. Faith, Effects on cognitive performance of eating compared with omitting breakfast in elementary schoolchildren, *J. Dev. Behav. Pediatr.* 33 (2012) 9–16.
- [25] R.D. Martin, A review of the behaviour and ecology of the lesser mouse lemurs (*Microcebus murinus*), in: *Comp. Ecol. Behav., Primates*, 1973, pp. 1–68.
- [26] U. Radespiel, Sociality in the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*) in northwestern Madagascar, *Am. J. Primatol.* 51 (2000) 21–40.
- [27] M. Joly, M. Scheumann, E. Zimmermann, Wild mouse lemurs revisit artificial feeding platforms: implications for field experiments on sensory and cognitive abilities in small primates, *Am. J. Primatol.* 70 (2008) 892–896.
- [28] M. Joly, E. Zimmermann, Do solitary foraging nocturnal mammals plan their routes? *Biol. Lett.* 7 (2011) 638–640.
- [29] M.-L. Lühns, M. Dammhahn, P.M. Kappeler, C. Fitchel, Spatial memory in the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), *Anim. Cogn.* 12 (2009) 599–609.
- [30] S. Languille, S. Blanc, O. Blin, C.I. Canale, G. Devau, M. Dhenain, et al., The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies, *Ageing Res. Rev.* 11 (2012) 150–162.
- [31] S. Languille, A. Liévin-Bazin, J.-L. Picq, C. Louis, S. Dix, J. De Barry, et al., Deficits of psychomotor and mnemonic functions across aging in mouse lemur primates, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 446.
- [32] C.I. Canale, M. Perret, M. Théry, P.-Y. Henry, Physiological flexibility and acclimation to food shortage in a heterothermic primate, *J. Exp. Biol.* 214 (2011) 551–560.
- [33] C.I. Canale, E. Huchard, M. Perret, P.-Y. Henry, Reproductive resilience to food shortage in a small heterothermic primate, *PLoS One* 7 (2012) 1–10.
- [34] R.E. Dewar, A.F. Richard, Evolution in the hypervariable environment of Madagascar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13723–13727.
- [35] A. Dal-pan, F. Pifferi, J. Marchal, J.-L. Picq, F. Aujard, Cognitive performances are selectively enhanced during chronic caloric restriction or resveratrol supplementation in a primate, *PLoS One* 6 (2011).
- [36] J.-L. Picq, N. Villain, C. Gary, F. Pifferi, M. Dhenain, Jumpingstand apparatus reveals rapidly specific age-related cognitive impairments in mouse lemur primates, *PLoS One* 10 (2015) e0146238.
- [37] J.L. McGaugh, Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective, *Trends Neurosci.* 25 (2002) 456–461.
- [38] J.L. McGaugh, The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences, *Annu. Rev. Neurosci.* 27 (2004) 1–28.
- [39] Y. Hsu, Y.-Y. Huang, Y.-T. Wu, Multiple contest experiences interact to influence each other's effect on subsequent contest decisions in a mangrove killifish, *Anim. Cogn.* 17 (2014) 165–175.
- [40] S.-H. Zhou, D. Oetomo, Y. Tan, I. Mareels, E. Burdet, Effect of sensory experience on motor learning strategy, *J. Neurophysiol.* 113 (2015) 1077–1084.
- [41] S.B. Laughlin, R.R. de Ruyter van Steveninck, J.C. Anderson, The metabolic cost of neural information, *Nat. Neurosci.* 1 (1998) 36–41.
- [42] Q. Wen, D.B. Chklovskii, A cost-benefit analysis of neuronal morphology, *J. Neurophysiol.* 99 (2008) 2320–2328.
- [43] W. Kool, J.T. McGuire, Z.B. Rosen, M.M. Botvinick, Decision making and the avoidance of cognitive demand, *J. Exp. Psychol. Gen.* 139 (2010) 665–682.
- [44] N. Vnek, T.C. Gleason, L.F. Kromer, L.A. Rothblat, Entorhinal-hippocampal connections and object memory in the rat: acquisition versus retention, *J. Neurosci.* 15 (1995) 3193–3199.
- [45] N. Vnek, L.A. Rothblat, The hippocampus and long-term object memory in the rat, *J. Neurosci.* 16 (1996) 2780–2787.
- [46] R.J. McDonald, A.L. King, T.D. Wasiak, E.L. Zelinski, N.S. Hong, A complex associative structure formed in the mammalian brain during acquisition of a simple visual discrimination task: dorsolateral striatum, amygdala, and hippocampus, *Hippocampus* 17 (2007) 759–774.
- [47] S.J. Won, B.H. Yoo, T.M. Kauppinen, B.Y. Choi, J.H. Kim, B.G. Jang, et al., Recurrent/moderate hypoglycemia induces hippocampal dendritic injury, microglial activation, and cognitive impairment in diabetic rats, *J. Neuroinflammation* 9 (2012) 182.
- [48] R.N. Auer, T. Wieloch, Y. Olsson, B.K. Siesjö, The distribution of hypoglycemic brain damage, *Acta Neuropathol.* 64 (1984) 177–191.
- [49] J. Terrien, A. Zahariev, S. Blanc, F. Aujard, Impaired control of body cooling during heterothermia represents the major energetic constraint in an aging non-human primate exposed to cold, *PLoS One* 4 (2009) e7587.
- [50] S. Giroud, M. Perret, P. Stein, J. Goudable, F. Aujard, C. Gilbert, et al., The grey mouse lemur uses season-dependent fat or protein sparing strategies to face chronic food restriction, *PLoS One* 5 (2010).
- [51] F. Buckley, K. O'sullivan, J.F. Mee, R.D. Evans, P. Dillon, Relationships among milk yield, body condition cow weight, and reproduction in spring-calving Holstein-Friesians, *J. Dairy Sci.* 86 (2003) 2308–2319.
- [52] J.-D. Dutil, Y. Lambert, Natural mortality from poor condition in Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 (2011) 826–836.
- [53] A.G. Dulloo, R. Calokatisa, Adaptation to low calorie intake in obese mice: contribution of a metabolic component to diminished energy expenditures during and after weight loss, *Int. J. Obes.* 15 (1991) 7–16.
- [54] E.I. Kawahara, N.H.P.B. Maués, K.C. dos Santos, P.O. Barbanera, C.P. Braga, A.H. Fernandes, Energy restriction and impact on indirect calorimetry and oxidative stress in cardiac tissue in rat, *Indian J. Biochem. Biophys.* 51 (2014) 365–371.
- [55] K.-F. Storch, C.J. Weitz, Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 6808–6813.

Annexe 2 : Article sur la méthode du test de discrimination
visuelle publié dans la revue "PLOS One"

Jumping Stand Apparatus Reveals Rapidly Specific Age-
Related Cognitive Impairments in Mouse Lemur Primates

Jean-Luc Picq^{1,2,3}, Nicolas Villain⁴, Charlotte Gary^{2,3}, Fabien Pifferi⁴, Marc Dhenain^{2,3}

¹ Laboratoire de psychopathologie et de neuropsychologie, E.A. 2027, Université Paris 8, 2 rue de la liberté, 93000 St Denis, France

² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

³ Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département des Sciences du Vivant (DSV), Institut de médecine Biomédicale (I2BM), MIRGen, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ CNRS UMR 7179, MNHN, Adaptive Mechanisms and Evolution (MECADEV), 1 Av du petit château, 91800 Brunoy, France

RESEARCH ARTICLE

Jumping Stand Apparatus Reveals Rapidly Specific Age-Related Cognitive Impairments in Mouse Lemur Primates

Jean-Luc Picq^{1,2,3*}, Nicolas Villain⁴, Charlotte Gary^{2,3}, Fabien Pifferi⁴, Marc Dhenain^{2,3}

1 Laboratoire de psychopathologie et de neuropsychologie, E.A. 2027, Université Paris 8, 2 rue de la liberté, 93000 St Denis, France, **2** Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay UMR 9199, Neurodegenerative Diseases Laboratory, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France, **3** Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA), Département des Sciences du Vivant (DSV), Institut d’Imagerie Biomédicale (I2BM), MIRCen, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France, **4** CNRS UMR 7179, MNHN, Adaptive Mechanisms and Evolution (MECADEV), 1 Av du petit château, 91800 Brunoy, France

* jean_lucpicq@hotmail.com



Abstract

The mouse lemur (*Microcebus murinus*) is a promising primate model for investigating normal and pathological cerebral aging. The locomotor behavior of this arboreal primate is characterized by jumps to and from trunks and branches. Many reports indicate insufficient adaptation of the mouse lemur to experimental devices used to evaluate its cognition, which is an impediment to the efficient use of this animal in research. In order to develop cognitive testing methods appropriate to the behavioral and biological traits of this species, we adapted the Lashley jumping stand apparatus, initially designed for rats, to the mouse lemur. We used this jumping stand apparatus to compare performances of young ($n = 12$) and aged ($n = 8$) adults in acquisition and long-term retention of visual discriminations. All mouse lemurs completed the tasks and only 25 trials, on average, were needed to master the first discrimination problem with no age-related differences. A month later, all mouse lemurs made progress for acquiring the second discrimination problem but only the young group reached immediately the criterion in the retention test of the first discrimination problem. This study shows that the jumping stand apparatus allows rapid and efficient evaluation of cognition in mouse lemurs and demonstrates that about half of the old mouse lemurs display a specific deficit in long-term retention but not in acquisition of visual discrimination.

OPEN ACCESS

Citation: Picq J-L, Villain N, Gary C, Pifferi F, Dhenain M (2015) Jumping Stand Apparatus Reveals Rapidly Specific Age-Related Cognitive Impairments in Mouse Lemur Primates. PLoS ONE 10(12): e0146238. doi:10.1371/journal.pone.0146238

Editor: Michael Taffe, The Scripps Research Institute, UNITED STATES

Received: September 10, 2015

Accepted: December 15, 2015

Published: December 30, 2015

Copyright: © 2015 Picq et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Association France Alzheimer. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

As age-related cognitive impairment has become a major health problem in our societies, the need for valid animal model to investigate the biological basis of this decline and to develop efficient treatments is a crucial concern. For about two decades, there has been a growing interest in the use of a small nonhuman primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), for studying aging and age-associated diseases [1]. Indeed, with its mouse-like body size (body

length 12 cm, 60–120 g) rendering its breeding and housing cost-efficient, this nocturnal, rapidly maturing (puberty occurs at about 6–8 months) and short-lived (about a decade in captivity) primate offers a useful compromise between the practicalities and affordability of rodents and the evolutionary proximity to humans of monkeys or apes. This proximity was well illustrated by many studies that have brought out similarities of mouse lemurs and humans in the age-related changes occurring in brains, including amyloid plaque formation and neurofibrillary changes [2,3]; pathological tau metabolism [4]; neurochemical alterations [5]; neuronal loss in specific cerebral structures (e.g., the nucleus basalis of Meynert) [6]; iron accumulation [7]; and varying patterns of cerebral atrophy [8]. Interestingly, the atrophy of some brain regions such as septum, hippocampus or entorhinal cortex was only detected in a subcategory of aged mouse lemurs and was correlated with cognitive impairments, which suggests that it is related to pathological aging [9].

Concerning behavioral assessment, several studies have demonstrated that the pattern of age-related cognitive alteration in mouse lemurs [10,11] is strikingly reminiscent of that described in humans [12], namely a preserved procedural memory, a progressive and widespread decline in executive function and an impairment in declarative-like memory that is limited to a subpopulation of aged individuals. Nevertheless much work remains to be done in order to streamline the cognitive assessment of mouse lemurs. Indeed, many reports indicate insufficient adaptation of the mouse lemur to experimental devices mainly initially developed for rodents or large monkeys, leading to excessive duration of experimental trials and/or disproportionate elimination of individuals as non-responders during the training stages. For example, in a study by Ritchie et al. [13], more than 9 months of training were required for a single visual discrimination in a couple of animals. Regarding the rate of non-responders, high levels of attrition from 30 to more than 50% were often reported [14,15]. Moreover, a great inter-individual variability in the performance of control groups was frequently noted [16]. Such variability is likely to be more related to variable motivation or emotionality than to variable cognitive ability and can impede detection of subtle cognitive impairment in any experimental group. Recent progress was made to standardize cognitive testing in mouse lemurs by using an automated touchscreen-based procedure [17]. This approach has the main advantages of minimizing operator-subject interaction and facilitating cross-taxa comparisons as it can be used in a variety of species, including humans. The first publication on this apparatus reported that mouse lemurs need 24 days of training on average and more than 200 trials to reach the criterion of success assigned to a simple task of discrimination [17]. Another way to improve cognitive testing of mouse lemurs is to consider their specific behavioral and biological traits in order to design new devices enabling them to express their full cognitive potential. As mouse lemurs have an arboreal lifestyle and are powerful jumpers, developing apparatus and procedures allowing movements in the three-D space appears particularly well suited for an efficient behavioral testing of this species. In 1930, in order to study visual perception in rodents, Lashley designed a jumping stand apparatus [18]. To perform a discrimination task within this apparatus, rats had to jump from an elevated stand to one of two doors positioned in front of them. If the rat jumps to the correct door, the door swings open and the rat lands on a table behind and receives food or water reward. If it chooses wrongly, it strikes against the locked window and fall into a net slung beneath the apparatus. The jumping stand is rarely used today in rodents, because they are not prone to jumping and were forced to jump by being mildly shocked. On the contrary, mouse lemurs are jumping animals and our goal was to design a version of the jumping stand for lemurs. First, the test we designed was based on an elevated stand that can progressively be tilted downwardly causing a slippery slope pushing gently the mouse lemur to jump. Second, the target doors were replaced by target platforms that were stable for correct choices and

unstable, leading to the fall of the animals, for incorrect choices. In addition, a positive reward (*i.e.* the possibility to attain a safe nestbox) was maintained when the animal reached the correct platform. As underscored by Sutherland and Mackintosh [19] the jumping stand technique has the great advantage that it forces animals to look toward the stimuli before responding (usually for some time as they normally hesitate before leaping the gap) and it gives immediate positive or negative reinforcement after a correct or an incorrect jump. The main goal of the present study was to determine whether the jumping stand apparatus adapted to mouse lemurs allows obtaining fast and efficient learning and could be used as a reliable tool for testing cognition in this species.

The second goal of our study was to test whether the jumping stand apparatus can evaluate age-related cognitive alterations in mouse lemurs. The jumping stand apparatus can assess different cognitive abilities through a large panel of tasks such as simple discriminations, delayed matching (or nonmatching) to samples or shifting tasks. Acquisition and retention of simple discrimination learning task are differentially sensitive to medial temporal lobe lesions [20,21,22] and as temporal lesions are altered in a subcategory of old mouse lemurs [9], impairment was expected in retention but not in acquisition of discrimination problems. We thus designed discrimination and retention tasks based on the jumping stand apparatus to evaluate medial temporal lobe-dependent and non-medial temporal lobe-dependent cognitive performance in young and old mouse lemurs.

Materials and Methods

2.1. Ethics statement

The study was non-invasive and carried out in accordance with the European Communities Council Directive (2010/63/UE). The research was conducted under the approval of the CETEA-CEA DSV IdF ethic committee under the authorization number 12–089. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, “The use of non-human primates in research”, special attention was paid to the welfare of the animals. Neither nociceptive stimuli nor food deprivation were used during this work.

2.2. Animals

Twenty male grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*) were evaluated. The young adult group consisted of 12 animals ranging from 3 to 4.2 years (mean age = 3.3 years) and the aged adult group consisted of 8 animals ranging from 7 to 10 years (mean age = 7.5 years). These age categories were consistent with age classification in previous studies and were based on survival data of the breeding colony which has a mean and a maximum lifespan of 56 and 120 months, respectively [1]. The animals were born and reared in the Brunoy colony (MNHN, France, licence approval N° A91.114.1). They had no previous experience with cognitive testing nor with any drug trial or experimental surgeries. The mouse lemurs, solitary foragers in the wild, were housed in individual cages to reduce stress due to capture and transport to the separate experimental room. The cages were enriched with tree branches and wooden nests (nestbox) and were kept at standard temperature (24–26°C) and relative humidity (55%). The mouse lemurs were tested during the summer-like long day length (14:10 hours light-darkness) that corresponds to the active phase of the animals. Animals were raised on fresh fruits and a laboratory daily-made mixture of cereals, milk and eggs. Water and food were given *ad libitum*. The eyes of the mouse lemurs were examined by a veterinary ophthalmologist and no anomalies were detected that would affect visual acuity.

2.3. Apparatus

Experiments were performed in a separate testing room containing the apparatus. The apparatus (see Fig 1) was a big vertical cage (height = 150 cm) made of plywood walls except the front panel that was a one-way mirror to allow observation. It was illuminated by 50-W bulb attached to the center of the cage ceiling. The mouse lemur was placed inside the cage on the center of an elevated plastic starting platform (the jumping stand) through an open-ended dark cylinder that opened in the roof of the cage. After this cylinder was gently lifted, the mouse lemur was required to jump from the elevated stand onto one of two landing platforms (15 cm x 30 cm) across a 35-cm gap. If it did not jump within one minute the starting stand was progressively tilted downwardly causing a slippery slope pushing the mouse lemur to jump. If it jumped onto the correct platform, it could pass under an opaque Plexiglass screen to access its nestbox placed behind the wall of the cage. This opaque screen prevented mouse lemurs from jumping directly to the opening of the nestbox. If it jumped onto the incorrect platform, the platform swung down and the mouse lemur fell into the bottom of the cage on a wide soft pillow to avoid any risk of injury. A small door at the base of the right wall of the cage allowed to take back the mouse lemur and to put it back on the starting platform for another trial. The correct and the incorrect platforms were distinguished by visual stimuli placed on them. The training pairs of stimuli were randomly drawn from a pool of 20 pairs. Within each pair, stimuli were chosen to be easily discriminable as the goal was to test cognitive and not visual capacities. Accordingly the two stimuli of the same pair differed both in shape, texture, brightness or pattern. Practically, they were made of different materials (cardboard, plastic, polystyrene, fabric. . .).

No food reinforcement was used. The reward for positive choices consisted in allowing the mouse lemur to reach its nestbox and then to be "home safe" for some time. This reward is particularly efficient in mouse lemurs as they are very keen to find their nestbox, due to their habit in their natural environment to make use of tree holes as vital means to evade predation, ensure thermoregulation, and park infants during food foraging [23].

2.4. Testing procedure

2.4.1. Overview of the performed tasks. Two discrimination problems (D1 and D2) and a long term-memory test (retention phase) of the first discrimination problem (D1r) were used (see Fig 2). During the first discrimination problem (D1), the mouse lemurs had to discriminate two visual stimuli. The mouse lemurs were given each day a session of a maximum of 25 trials. Testing continued until the mouse lemurs reached a criterion of eight correct choices for ten consecutive trials. The long term-memory test (D1r) was performed one month after the first discrimination problem. The following day a new discrimination problem (D2) was performed. For each test, the score was the number of errors (wrong choices leading to a fall) before reaching the criterion. One day before the first discrimination test, each mouse lemur was given a habituation session to learn the task.

2.4.2. Habituation. The habituation session was composed of seven trials. For the first four trials, only one fixed central landing platform was attached just below the nestbox opening. On trial 1, a cylindrical rod connected the jumping stand to the landing platform so that no jump was required to attain the nestbox whose opening was visible from the starting stand. On trial 2, the rod was removed so that the mouse lemur had to jump onto the central landing platform to access its nestbox. On trials 3 and 4, an opaque vertical screen was added above the middle of the landing platform masking the nestbox opening. The mouse lemur had to jump onto the central landing platform then to walk under the screen to access its

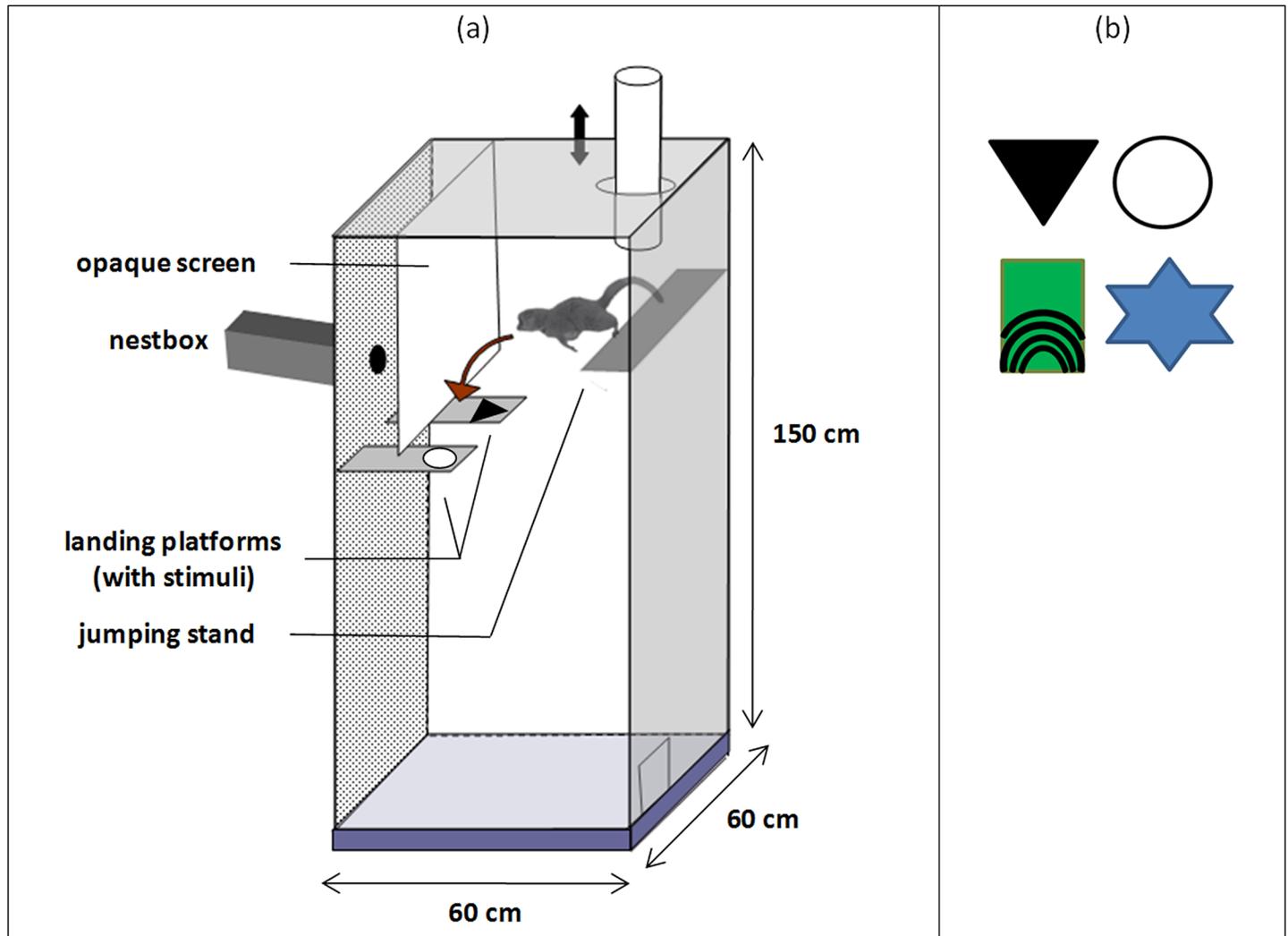


Fig 1. Jumping stand apparatus for mouse lemurs (a) and pairs of stimuli used for the two discrimination problems (b).

doi:10.1371/journal.pone.0146238.g001

nestbox. For the last three trials, the fixed landing platform was placed alternatively to the left or to the right of the nestbox opening which was masked by the opaque screen.

2.4.3. Discrimination tests. During the discrimination problems (D1, D1r, and D2), mouse lemurs were given each day a session of a maximum of 25 trials. On each trial, the mouse lemur faced two landing platforms. It had to choose the positive landing platform which gave access to a 2-min rest in its nestbox and to avoid the negative platform which resulted in the fall of the platform leading to the drop of the animal in the bottom of the cage. After a fall, the mouse lemur was left in the bottom for 20 seconds before being taking back for another trial. The discrimination was based on visual stimuli that differed in shape, texture, brightness or pattern. These stimuli (diameter about 15 cm) were interchangeably attached to the front of the landing platforms. The location of the stimuli on the right or left landing platforms was randomized with the restriction that the positive stimulus was not located on the same platform for more than three consecutive trials. Two different pairs of stimuli were selected for the two discrimination tests. One pair consisted of a black plastic triangle versus a white cardboard circle and the other pair consisted of a green rubber rectangle with black

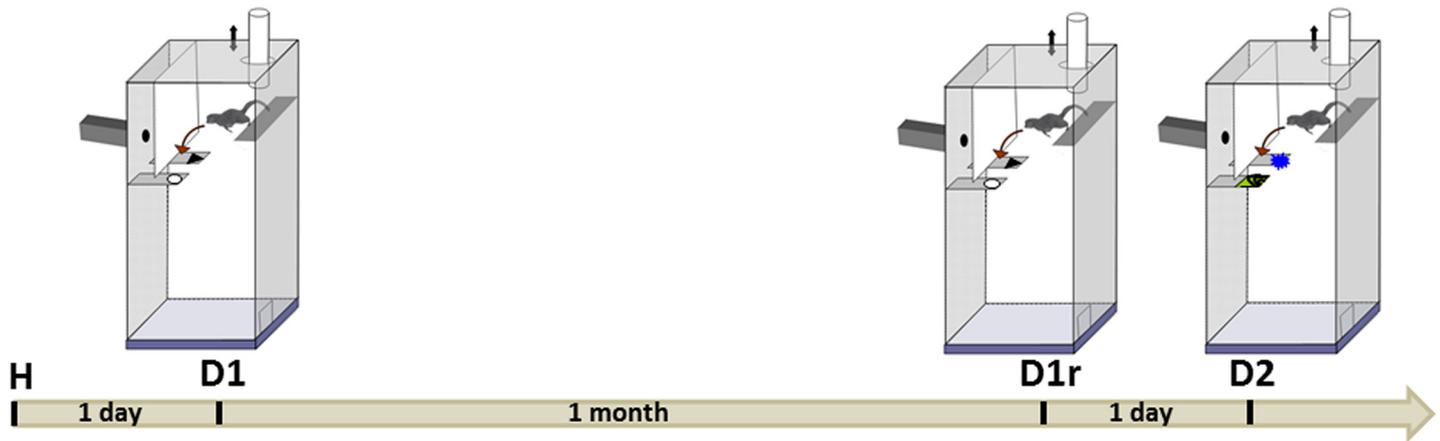


Fig 2. Timeline of tasks. H: habituation, D1: first discrimination problem, D1r: retention of the first discrimination problem, D2: second discrimination problem.

doi:10.1371/journal.pone.0146238.g002

concentric lines versus a blue star-shaped rigid paper (Fig 1b). The order of the two discrimination problems was reversed for half the animals.

2.5. Data analysis

All values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Performances between tasks (acquisition, retention, new acquisition) were compared in each age-group with paired Student’s t-test analyses and performances between young and old animals on each task were compared with unpaired Student’s t-test analyses. The level of statistical significance was $p < 0.05$.

Results

The general performances of young and old mouse lemurs in the D1, D1r and D2 tasks are presented in Table 1. All tested animals succeeded in acquiring the first visual discrimination (D1) in one or two sessions. The mouse lemurs needed from 13 to 41 trials to reach the criterion (median = 26 or 24 for young animals or aged animals, respectively). Thus the first discrimination could be learnt in only two days. Evaluation of the animals for the long term-memory test (D1r) or the new discrimination problem (D2) was also performed very rapidly, *i.e.* within one day (Table 1).

In the first visual discrimination (D1) the mean number of errors to criterion was 11.9 ± 1.2 for the young group and 10.9 ± 1.5 for the aged group (see Fig 3 and S1 Table). No group differences were observed between young and old individuals ($t = 0.53$, $p > 0.05$; Fig 3). On the retention phase of the first discrimination problem (D1r), both young and old animals succeeded faster than in the learning of the discrimination (D1) ($t = 9.68$ and 6.25 , respectively,

Table 1. Mean ± SEM number of days and trials to reach the success criterion in the jumping stand apparatus. The figures in brackets indicate the score range. Attrition rate was null for each task.

	D1		D1r		D2	
	Days	Trials	Days	Trials	Days	Trials
Youngs	2 (1/2)	26±2 (13/41)	1 (1/1)	9±0 (8/10)	1 (1/1)	15±1 (9/23)
Olds	2 (1/2)	24 (14/40)	1 (1/1)	12±1 (8/18)	1 (1/1)	14±1 (10/22)

doi:10.1371/journal.pone.0146238.t001

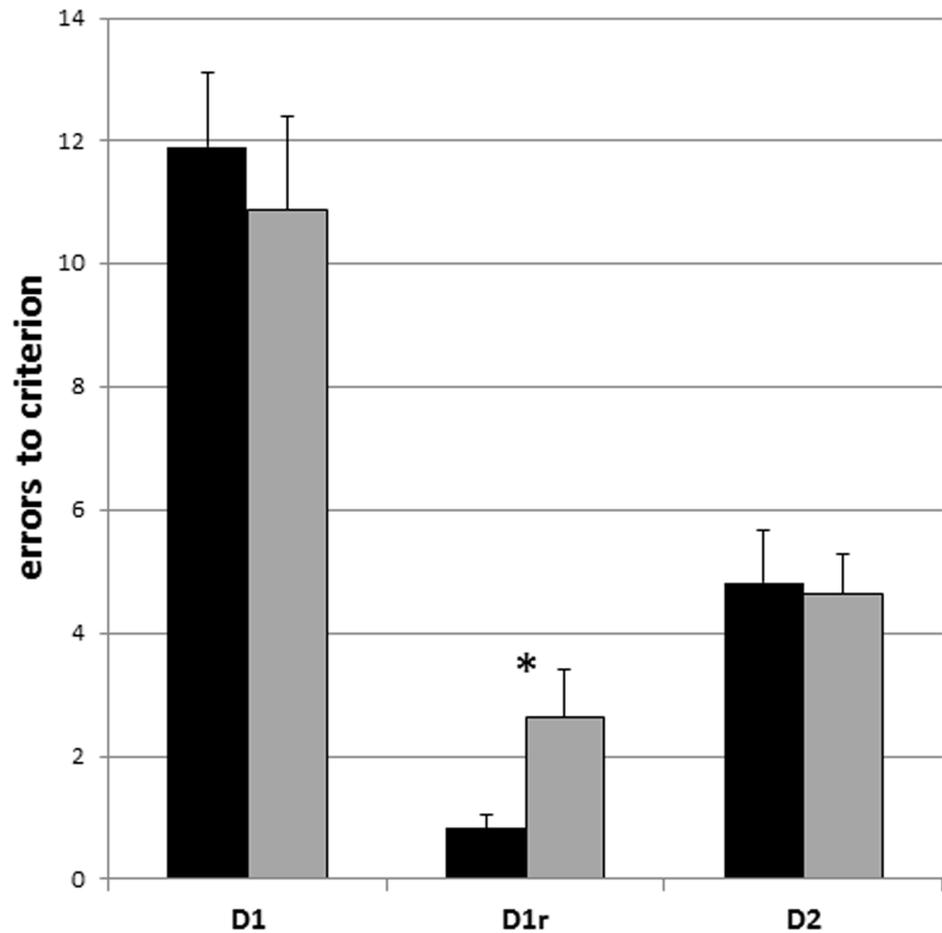


Fig 3. Mean scores on the first discrimination problem (D1), retention of the first discrimination problem (D1r) and second discrimination problem (D2) in young (black) and older (grey) adult animals. Errors bars depict SEM. * indicates a significant difference.

doi:10.1371/journal.pone.0146238.g003

$p < 0.001$). All young mouse lemurs immediately attained at least a 80% correct response level (criterion level) in the first ten trials (errors ≤ 2 , mean = 0.8 ± 0.2). The older animals made more errors before reaching criterion (mean = 2.6 ± 0.8) than the young ones ($t = 26$, $p = 0.018$) and only half of the aged mouse lemurs succeeded in reaching the criterion in the first ten trials (Fig 3). No differences between young and aged mouse lemurs were seen on the second discrimination problem (D2, $t = 0.17$, $p > 0.05$). The performances on D2 were significantly better than those recorded on D1 for both the young and old individuals ($t = 6.72$ and 4.64 , respectively, $p < 0.01$; Fig 3). The performances on D1r were significantly better than those recorded on D2 for the young individuals ($t = 5.07$, $p < 0.01$) but not for the aged individuals ($t = 2.25$, $p > 0.05$).

Discussion

The main goal of our study was to determine whether the jumping stand technique is an efficient way to test the cognitive capacities of mouse lemurs. Our findings demonstrate that naive mouse lemurs are able to master a visual discrimination task in a very small number of trials (13 to 41) after a short habituation session of only seven trials. Even though the

criterion to be reached was not the same, young adult mouse lemurs needed far fewer trials (median = 26) to acquire a pairwise discrimination in the jumping stand task than in earlier protocols involving odor discrimination [24], visual discrimination using the touchscreen procedure [17] or visual discrimination of illuminated vs. dark corridors [11], which required about 500, 200 or 80 trials, respectively. The cognitive demand being identical in all these discrimination tasks, the excellent performance of mouse lemurs in the jumping stand apparatus was likely based on sensory, motor, attentional and motivational parameters that make this procedure particularly appropriate to their biology. Indeed, in the jumping stand procedure, the visual stimuli were easily detectable and discriminable by mouse lemurs. Also attention was quickly focused on these stimuli as the mouse lemurs were strongly motivated to escape from the well-lighted and very exposed slippery stand and no other target was available. Moreover, the required jump response is a central part of the spontaneous locomotor behavior of this arboreal species. Finally, choices were instantly either rewarded (access to the nest-box) or punished (fall) making the conditioning procedure more powerful by combining positive and negative reinforcements across trials. Moreover rewards and punishments are ecologically significant for mouse lemurs in this protocol since falling from an unstable support is a natural risk for an arboreal jumping species. In accordance with the high performances of mouse lemurs in the jumping stand, which suggests that this test procedure is relatively straightforward for this species, the attrition rate recorded in the present study over the whole experiment was zero. Given the relatively limited number of mouse lemurs (in comparison to rats or mice) available for laboratory studies, it is important that as few animals as possible have to be excluded as non-responders before completing a cognitive test battery. Another advantage of the jumping stand apparatus is that simple cognitive tasks such as visual discrimination tasks carried out in this device did not result in excessive inter-individual variability in young adult control group. Indeed most young adult mouse lemurs (11 out of 12) needed from 20 to 40 trials to reach criterion. The variability among young individuals in the present study was even far more limited in the retention test (D1r), since all mouse lemurs needed only from 8 to 10 trials to reach criterion. Thus discrimination tasks in the jumping stand device seem sufficiently sensitive to detect mild cognitive deficit in aged subjects (or in any other experimental group) and to reach statistical significance with a relatively low number of animals. Another interest of the jumping stand apparatus is that it will be easy in further studies to test separately each dimension (shape, size, texture, color, pattern) of the visual stimulus and to determine which dimension is most relevant for the mouse lemur and whether one dimension can induce age-related impairment. Moreover intra-dimensional and extra-dimensional shift tasks, which are known to be especially vulnerable to aging in primates [25,26,27], could easily be carried out.

In our study, the older mouse lemurs learned the first visual discrimination problem with a level of performance similar to that of the young ones. All aged animals performed inside the range score of the younger group. Thus the motor requirement of the jumping stand procedure was moderate enough not to impede cognitive capacity expression in aged individuals. The lack of age-related cognitive impairment in discrimination learning is consistent with previous studies in mouse lemurs [9,11,24] and has been frequently reported in rodents [28] and monkeys [29,30,31]. To the extent that such tasks can be solved on the basis of acquisition of attentional and motor biases towards individual stimuli, there are thought to mainly involve procedural memory, a form of memory well preserved in the human aging process [32,33]. Nevertheless a recent study using a touchscreen device found that aged mouse lemurs are impaired in the acquisition of a visual discrimination between two images [17]. Strong differences between the jumping stand and the touchscreen procedures concerning many

parameters such as the required motor response, the type of reinforcers used and the nature of visual stimuli to discriminate can suffice to explain the contrasting observations.

Both young and aged mouse lemurs learned the second discrimination problem (D2) much more quickly than the first one and the two age groups showed a similar level of performance. This improvement in the second problem likely relies on memory of the general rules of the discrimination task (transfer effect) in the jumping stand apparatus, supporting rapid solutions of new problems of the same class. However, although both young and old animals performed better on the retention task (D1r) than on the first discrimination (D1), the performance of the young group was better than that of the old animals in the retention task (D1r). Young animals showed a perfect recall of the specific stimulus discrimination problem a month after criterion was met. This higher level of accuracy in the retention test of the first discrimination problem cannot be ascribed to rapid acquisition of a learning set in young animals because their performance decreased in the following second discrimination problem when compared to the retention problem. This suggests that long term retention of the general rules of discrimination problems and long term retention of a specific discrimination problem have to be differentiated. Our data show that, while all the young animals were able to reach the criterion in the first ten trials of the retention test, only half of the aged animals were able to do so. The old mouse lemurs with worse scores performed as well as the young adults in both the first and the second discrimination problems. These results suggest that some aged mouse lemurs can display deficit in long term retention of a specific stimulus discrimination problem and be perfectly capable to master discrimination learning and to acquire a learning set by retaining the general rules of these tasks. This acquisition-retention distinction in discrimination tasks has been supported by experiments that demonstrated that rats with entorhinal/hippocampal lesions acquired successive discrimination problems in the same amount of time as did controls but showed marked deficits in the retention phase of these discrimination problems after long intervals of time [22]. This selective retention impairment suggests that medial temporal lobe structures are important for retaining specific visual discriminations over long delay intervals but neither for mastering a discrimination task nor for improving performance over successive discrimination problems [21,34]. This gradual gain in performance across problems is probably partly due to progressive acquisition of the procedural aspects of testing with experience and more dependent on corticostriatal circuits [35]. The present findings are consistent with previous data from our team that revealed age-related hippocampal and entorhinal atrophy in a subpopulation of aged mouse lemurs and a relationship between that atrophy and poor spatial memory performance in the circular platform test [9]. Thus we hypothesize that poor performance in the retention test of specific discrimination problems after long delays is sensitive to entorhinal/hippocampal dysfunction. The procedure described in the present study might detect aged mouse lemurs affected by pathological aging processes involving these areas. Further magnetic resonance imaging and histological evaluations of the brain of mouse lemurs tested in the jumping stand will help to explore this hypothesis.

In conclusion, the jumping stand apparatus appears to be a powerful tool for testing cognition in mouse lemurs and for exploring age-related impairment. Its efficiency can be explained because the apparatus is designed for the arboreal lifestyle of the lemurs as well as for their sensorial and behavioral skills. We suggest that it can also be adapted to evaluate cognitive abilities of other arboreal animals.

Supporting Information

S1 Table. Individual performances of the mouse lemurs.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Sabine Chahory (National Veterinary School of Maison-Alfort) for performing the eye examinations of the animals as well as Fabienne Aujard (CNRS UMR 7179) for critical evaluation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JLP. Performed the experiments: JLP NV. Analyzed the data: JLP CG MD. Contributed reagents/materials/analysis tools: JLP NV CG FP MD. Wrote the paper: JLP MD.

References

1. Languille S, Blanc S, Blin O, Canale CI, Dal-Pan A, Devau G, et al. (2012) The grey mouse lemur: A non-human primate model for ageing studies. *Ageing Research Reviews* 11: 150–162. doi: [10.1016/j.arr.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.07.001) PMID: [21802530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21802530/)
2. Bons N, Mestre N, Petter A (1991) Senile plaques and neurofibrillary changes in the brain of an aged lemurian primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiology of Aging* 13: 99–105.
3. Mestre-Francés N, Silhol S, Bons N (1996) Evolution of β -amyloid deposits in the cerebral cortex of *Microcebus murinus* lemurian primate. *Alzheimer Research* 2: 19–28.
4. Delacourte A, Sautière P-E, Wattez A, Mourton-Gilles C, Petter A, Bons N (1995) Biochemical characterisation of tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III, Sciences de la Vie* 318: 85–89.
5. Jallageas V, Privat N, Mestre-Francés N, Bons N (1998) Age-related changes in serotonergic and catecholaminergic brain systems in the lemurian primate *Microcebus murinus*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839: 628–630. PMID: [9629227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9629227/)
6. Mestre N, Bons N (1993) Age-related cytological changes and neuronal loss in basal forebrain cholinergic neurons in *Microcebus murinus* (Lemurian primate). *Neurodegeneration* 2: 25–32.
7. Dhenain M, Duyckaerts C, Michot J-L, Volk A, Picq J-L, Boller F (1998) Cerebral T2-weighted signal decrease during aging in the mouse lemur primate reflects iron accumulation. *Neurobiology of Aging* 19: 65–69. PMID: [9562505](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9562505/)
8. Dhenain M, Michot JL, Privat N, Picq JL, Boller F, Duyckaerts C, et al. (2000) MRI description of cerebral atrophy in mouse lemur primates. *Neurobiology of Aging* 21: 81–88. PMID: [10794852](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10794852/)
9. Picq JL, Aujard F, Volk A, Dhenain M (2012) Age-related cerebral atrophy in nonhuman primates predicts cognitive impairments. *Neurobiology of Aging* 33: 1096–1109. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.009](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.09.009) PMID: [20970891](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20970891/)
10. Languille S, Lievin-Bazin A, Picq JL, Louis C, Dix S, De Barry J, et al. (2014) Deficits of psychomotor and mnesic functions across aging in mouse lemur primates. *Front Behav Neurosci* 8: 446. doi: [10.3389/fnbeh.2014.00446](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00446) PMID: [25620921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25620921/)
11. Picq JL (2007) Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. *Exp Gerontol* 42: 223–232. PMID: [17084573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17084573/)
12. Gabrieli JD (1996) Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13534–13540. PMID: [8942968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8942968/)
13. Ritchie K, Silhol S, Bons N (1997) Assessment of cognitive functioning in the lemurian primate *Microcebus murinus*: the development of the PAC-MM testing procedures. *Alzheimer's Research* 3: 37–41.
14. Trouche SG, Maurice T, Rouland S, Verdier JM, Mestre-Frances N (2010) The three-panel runway maze adapted to *Microcebus murinus* reveals age-related differences in memory and perseverance performances. *Neurobiol Learn Mem* 94: 100–106. doi: [10.1016/j.nlm.2010.04.006](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.04.006) PMID: [20403446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20403446/)
15. Vinot N, Jouin M, Lhomme-Duchadeuil A, Guesnet P, Alessandri JM, Aujard F, et al. (2011) Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. *PLoS One* 6: e20491. doi: [10.1371/journal.pone.0020491](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020491) PMID: [21666750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21666750/)
16. Joly M, Michel B, Deputte B, Verdier JM (2004) Odor discrimination assessment with an automated olfactometric method in a prosimian primate, *Microcebus murinus*. *Physiology & Behavior* 82: 325–329.

17. Joly M, Ammersdorfer S, Schmidtke D, Zimmermann E (2014) Touchscreen-based cognitive tasks reveal age-related impairment in a primate aging model, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*). *PLoS One* 9: e109393. doi: [10.1371/journal.pone.0109393](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109393) PMID: [25299046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25299046/)
18. Lashley KS (1930) The mechanism of vision I. A method for the rapid analysis of pattern vision in the rat. *Journal of Genetic Psychology* [Name in 1930: The pedagogical seminary and journal of genetic psychology] 37: 453–460.
19. Sutherland NS, Mackintosh NJ (1971) *Mechanisms of animal discrimination learning*: New York: Academic Press.
20. Epp J, Keith JR, Spanswick SC, Stone JC, Prusky GT, Sutherland RJ (2008) Retrograde amnesia for visual memories after hippocampal damage in rats. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, NY) 15: 214–221.
21. Levisohn LF, Isaacson O (1991) Excitotoxic lesions of the rat entorhinal cortex. Effects of selective neuronal damage on acquisition and retention of a non-spatial reference memory task. *Brain Res* 564: 230–244. PMID: [1810624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1810624/)
22. Vnek N, Gleason TC, Kromer LF, Rothblat LA (1995) Entorhinal-hippocampal connections and object memory in the rat: acquisition versus retention. *J Neurosci* 15: 3193–3199. PMID: [7722656](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7722656/)
23. Kappeler PM (1998) Nests, tree holes, and the evolution of primate life histories. *Am J Primatol* 46: 7–33. PMID: [9730211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9730211/)
24. Joly M, Deputte B, Verdier JM (2006) Age effect on olfactory discrimination in a non-human primate, *Microcebus murinus*. *Neurobiol Aging* 27: 1045–1049. PMID: [15955599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955599/)
25. Moore TL, Killiany RJ, Herndon JG, Rosene DL, Moss MB (2003) Impairment in abstraction and set shifting in aged rhesus monkeys. *Neurobiology of Aging* 24: 125–134. PMID: [12493558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12493558/)
26. Moore TL, Killiany RJ, Rosene DL, Prusty S, Hollander W, Moss MB (2002) Impairment of executive function induced by hypertension in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience* 116: 387–396. PMID: [12049319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12049319/)
27. Dias R, Robbins TW, Roberts AC (1997) Dissociable forms of inhibitory control within prefrontal cortex with an analog of the Wisconsin Card Sort Test: restriction to novel situations and independence from "on-line" processing. *Journal of Neuroscience* 17: 9285–9297. PMID: [9364074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9364074/)
28. Gilbert PE, Pirogovsky E, Brushfield AM, Luu TT, Tolentino JC, Renteria AF (2009) Age-related changes in associative learning for olfactory and visual stimuli in rodents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170: 718–724. doi: [10.1111/j.1749-6632.2009.03929.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.03929.x) PMID: [19686218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19686218/)
29. Bartus RT, Dean RL, Fleming DL (1979) Aging in the rhesus monkey: effects on visual discrimination learning and reversal learning. *Journal of Gerontology* 34: 209–219. PMID: [108323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/108323/)
30. Lai ZC, Moss MB, Killiany RJ, Rosene DL, Herndon JG (1995) Executive system dysfunction in the aged monkey: spatial and object reversal learning. *Neurobiology of Aging* 16: 947–954. PMID: [8622786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8622786/)
31. Rapp PR (1990) Visual discrimination and reversal learning in the aged monkey (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience* 104: 876–884. PMID: [2285486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2285486/)
32. Cohen NJ, Squire LR (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 210: 207–210. PMID: [7414331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7414331/)
33. Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review* 99: 195–231. PMID: [1594723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1594723/)
34. Vnek N, Rothblat LA (1996) The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J Neurosci* 16: 2780–2787. PMID: [8786453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8786453/)
35. Mishkin M, Petri HL (1984) Memories and habits: some implications for the analysis of learning and retention. In: Squire LR, Butters N, editors. *Neuropsychology of Memory*: New York: Guilford. pp. 287–296.

Rôle de la plasticité comportementale dans l'adaptation aux variations nutritionnelles chez un primate malgache

Afin de se maintenir au sein d'un environnement changeant, les individus doivent mettre en place une réponse adéquate. Il est connu que les animaux ont la capacité d'ajuster leur comportement à leur environnement. Cette plasticité comportementale, permet une réponse adaptée et relativement rapide aux variations de l'environnement, maximisant ainsi les chances de survie et de transmission des gènes. Elle met en jeu des processus cérébraux coûteux en énergie rendant ces adaptations particulièrement sensibles à des changements alimentaires. Le but de cette thèse a été de mieux comprendre les facteurs qui contraignent ces réponses chez une espèce à laquelle s'applique une forte pression de sélection. Pour ce faire, nous avons étudié les réponses comportementales d'un primate malgache, le microcèbe gris (*Microcebus murinus*), soumis à des changements dans la quantité ou la qualité des ressources alimentaires disponibles. La première partie de ce travail s'est intéressée aux effets à court terme d'une restriction alimentaire sans malnutrition. Cette partie comprenait deux études. La première s'intéressait aux effets d'une restriction alimentaire à 60% sans malnutrition sur la plasticité comportementale innée via l'étude de l'horloge biologique. Les résultats de cette étude montrent une diminution de la capacité à se resynchroniser après un décalage horaire en lien avec la perte de poids. Ainsi, les individus perdant le plus de poids sont le moins à même de se resynchroniser sur les cycles lumineux après un décalage horaire de 6 heures. La seconde s'intéressait aux effets d'une restriction alimentaire de 40% sans malnutrition sur la plasticité comportementale acquise et montre une diminution de la capacité d'apprentissage des individus restreints après 19 jours de traitement alimentaire sans influence sur la mémoire à long terme. La moindre capacité d'apprentissage chez les individus en restriction calorique est corrélée à la perte de poids, les individus perdant le plus de poids étant les moins performants. Dans une seconde partie j'ai étudié l'effet de modifications qualitatives de l'alimentation à travers une supplémentation à long terme des individus en acides gras polyinsaturés n-3. Cette partie m'a permis de mettre en évidence une amélioration des performances d'apprentissage chez les individus supplémentés après 18 mois de traitement alimentaire accompagnée d'une diminution de l'anxiété et d'une augmentation de la neurogénèse adulte dans trois zones cérébrales. Ces travaux démontrent que les variations nutritionnelles, qu'elles soient quantitatives ou qualitatives sont capables d'influencer les différentes formes de plasticité comportementale et donc les grandes fonctions cérébrales et constituent ainsi un paramètre clé dans l'adaptation et la survie des individus.

Mots clés : Acides gras polyinsaturés n-3, Microcèbe gris (*Microcebus murinus*), Plasticité comportementale acquise, Plasticité comportementale innée, Restriction calorique