

**Structures cérébrales impliqués dans le
comportement sexuel des béliers orientés
vers femelles et vers mâles**

Structures cérébrales impliqués dans le comportement sexuel des béliers orientés vers femelles et vers mâles

Le travail de ce chapitre a été soumis pour publication à Behavioural Brain Research

Introduction

L'identification des aires cérébrales qui interviennent dans le comportement sexuel mâle fait l'objet d'études depuis plus de cinquante ans. Par exemple, l'aire préoptique médiane (APOm) est, chez toutes les espèces, la structure clé dans le comportement sexuel mâle, de telle façon que sa lésion perturbe sévèrement le comportement sexuel mâle. En 1990, Barry Everitt suggère une dissociation entre les régions cérébrales qui contrôlent les phases appétitive et consommatoire chez le rat (Everitt, 1990). Il a montré, chez le rat, que la lésion de l'aire pré-optique médiane (APO) entraîne la disparition de l'accouplement, mais n'empêche pas de presser une barre qui a été associée par conditionnement à l'accès à la femelle en œstrus (Everitt et Stacey, 1987) et de préférer une femelle en œstrus plutôt qu'une qui ne l'est pas (Hugues et al., 1990) , tandis que la lésion de l'amygdale entraîne la disparition de la motivation sans gêner l'accouplement. La même distinction est faite chez la caille, par Taziaux et al. (2006). Néanmoins, cette dissociation n'est pas toujours évidente. D'autres études ont montré un effet des lésions de l'APOm sur la préférence du partenaire, la fréquence et la durée de poursuite de la femelle (Edwards et Einhorn, 1986; Paredes et al., 1993). McGinnis et al., (2002) ont trouvé qu'une implantation d'un antiandrogène dans l'APOm, chez les rats mâles, supprimait le comportement sexuel mais la préférence pour la femelle en œstrus (par rapport à une qui ne l'est pas) n'était inhibée que par une implantation anteroventrale antiandrogène et que l'implantation posterodorsale ne provoquait pas cette inhibition. Yeh et al., (2009) ont montré que l'extrait de ginkgo biloba stimule la fréquence d'éjaculation chez les rats mais pas la motivation sexuelle, et provoque une augmentation du nombre des neurones exprimant l'hydroxylase thyrosine dans l'APOm dorsale mais pas dans la région ventrale.

Ce double rôle est aussi assuré par le noyau paraventriculaire (NPV), par le noyau ventromédian de l'hypothalamus (NHVM) et par le noyau accumbens (Nacc).

Le NPV est un important centre d'intégration entre le système nerveux central et périphérique ; il est composé des neurones ocytocinergiques se projetant vers des aires extra-hypothalamiques comme la moelle épinière. Il possède deux subdivisions : magnocellulaire et parvocellulaire. Les lésions de la portion parvocellulaire diminuent les érections sans contact mais n'empêchent pas la copulation (Liu et al., 1997b, a). Elles diminuent également la quantité d'éjaculat (Ackerman et al., 1997). Par contre la lésion simultanée de la portion magnocellulaire et parvocellulaire entraînent des perturbations de la copulation et les érections sans contact (Liu et al., 1997b, a).

Le NHVM est une structure clé pour le comportement sexuel de la femelle (voir revue de Pfaff et al 1994). Mais c'est aussi un site dense en récepteur d'androgène (Simerly et al. 1990) et l'administration locale d'un antagoniste des androgènes, le flutamide, est capable de diminuer la proportion de rats mâles montrant montes, intromissions et éjaculations (McGinnis et al. 1996), ce qui révèle l'importance de cette zone dans la phase consommatoire chez le rat. Par contre l'insertion d'un implant de propionate de testostérone dans le NHVM, sur les rats castrés, ne rétablit pas les comportements de copulation, mais restaure la préférence pour la femelle en œstrus vis-à-vis d'une qui ne l'est pas. Ceci suggère un rôle dans la motivation du comportement sexuel chez les rats.

Le Nacc, lié à l'AMY, est impliqué dans l'éveil (l'excitation), dans la récompense du comportement sexuel ainsi que dans d'autres comportements de motivation (Everitt et al., 1989 ; Pfaus et Phillips, 1989). La concentration de dopamine y augmente avec l'exposition d'un stimulus sexuel en lien avec l'accouplement (Damsma et al., 1992 ; Mas et al., 1990 ; Mas et al., 1995). L'expression Fos y est plus élevée si le mâle a de l'expérience sexuelle (López et Ettenberg, 2002). Les lésions du Nacc ont des effets négatifs sur le comportement sexuel et la motivation (Liu et al., 1998; Kippin et al., 2004). Des connexions dopaminergiques existent entre le Nacc et le NPV, renforçant le double rôle de ces structures : motivationnelle et consommatoire (Melis et al., 2007).

L'AMY corticomédiale, et le noyau du lit de la strie terminale (BNST) avec lequel il forme l'amygdale élargie (« extended amygdala » : AMYe), sont les autres structures clés dans le contrôle du comportement sexuel. Leur lésion diminue la copulation chez le rat, le hamster et la gerboise, mais le déficit entraîné varie selon les espèces et la localisation précise de la lésion (Swann et al., 2009). Chez le hamster, la destruction de la subdivision antérieure de

l'amygdale médiale (AMe) élimine entièrement l'accouplement (Lehman et al., 1980) alors que chez le rat, sa lésion n'affecte le comportement copulatoire que si l'APOM est aussi lésée (Kondo et Arai, 1995). L'accouplement stimule l'expression Fos dans l'AMe chez plusieurs espèces différentes (pour revue voir Hull et al. 2006) et la quantité de Fos augmente avec la fréquence de copulation (Coolen et al., 1996 ; Veening et Coolen, 1998). Chez les rats, une sous division de neurones dans l'AMe paraît être spécifiquement associée à l'éjaculation et la satiété sexuelle (Parfitt et Newman, 1998 ; Coolen et al., 1997). Chez le rat, le hamster et la gerbille, l'expression Fos est aussi stimulée par l'amygdale élargie lors de la perception de signes chimiosensoriels femelles, ce qui suggère aussi un rôle dans le comportement appétitif.

Par contre, le noyau suprachiasmatique (NSCH) et le noyau supraoptique (NSO) sont plutôt liés à la phase consommatoire, chez le rat, car leur activation n'a été trouvée qu'après activité sexuelle intense, avec plusieurs éjaculations (Phillips-Farfán et Fernández-Guasti, 2007) ou après intromission (Caquineau et al., 2006). De même, Tsai et al. (1997) suggère la participation de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) dans la phase consommatoire. Une autre structure semblant être impliquée dans cette phase est le septum latéral (SL), car elle est associée à la satiété sexuelle (Phillips-Farfán et Fernández-Guasti, 2007).

L'état actuel des recherches sur les structures cérébrales impliquées dans le comportement sexuel montre qu'une grande majorité des études a été réalisée sur des animaux actifs. Les études sur le déficit de libido chez des animaux ayant un niveau normal de testostérone sont rares. De Garsparín-Estrada et al. (2008) ont montré que les mâles ayant un taux de testostérone normal dans le plasma mais qui ne copulent pas sont capables de distinguer l'odeur d'une femelle en œstrus d'une qui ne l'est pas, mais ne sont pas attirés par cette odeur. Ces mâles n'expriment pas de Fos dans l'APOM, le BNST et l'AMe, lorsqu'ils sont exposés à la litière d'une femelle en œstrus. Ces chercheurs ont donc supposé que la motivation réduite de ces mâles est causée par des altérations de l'activité neuronale dans les projections de l'organe vomeronasal lors de l'exposition à l'odeur de femelle en œstrus (Portillo et Paredes, 2004). En étudiant des rats classés comme léthargiques ou sluggish (S), Portillo et al. (2006) ont remarqué que ces animaux ont une préférence pour les femelles et pour l'odeur de femelles en œstrus comparable à celle de rats copulant, qu'ils n'ont pas de différence de niveau sérique de testostérone et d'œstradiol et que les projections neuronales de l'organe vomeronasal sont activées de la même façon à l'exposition à l'odeur de femelles en œstrus. Ces différences, entre rats non copulateurs (NC) et S, ont amené Portillo et al. (2006)

à proposer qu'ils ont un profil neurobiologique différent. Chez le bélier, les mâles avec une activité sexuelle faible présentent une expression Fos dans l'APOm et le BNST plus élevée lorsqu'ils sont exposés à des femelles que lorsqu'ils sont exposés à des mâles (Alexander et al., 2001a). Ces auteurs y voient l'activation de neurones inhibiteurs. En effet, l'activation d'une structure cérébrale peut amener à une inhibition du comportement sexuel. C'est le cas, chez les humains, du cortex orbitofrontal médial (Pfaus et Scepkowski, 2005; Stoléro et al., 2003). Lisk (1969) a montré que les rats avec une lésion du corps mamillaire réalisent plus de copulations qu'avant la lésion. Pour Phillips-Farfan et al. (2007) le septum latéral ventral (SLV) et l'AMYme présentent des neurones inhibiteurs, tandis que le cortex piriforme (CXpir), des neurones stimulateurs, et ces régions seraient liés à l'inhibition sexuelle qui caractérise la satiété sexuelle.

Des études sur les structures centrales impliquées dans une motivation sexuelle basse ou absente ont été réalisées chez les humains: aucun changement n'a été identifié dans l'APOm par la tomographie d'émission positron (PET) mais le désir sexuel hypoactif a été lié à une absence d'activation ou de désactivation du cortex somatosensoriel et des lobules pariétales inférieures, et à une activation continue du cortex orbitofrontal médian, en comparaison des sujets sains (Stoléro et al., 2003). Chez les rats Il a été montré que le NHVM est une structure importante, car lésions du NHVM des rats ont diminué leur motivation sexuelle (Nisbett, 1972) et l'administration des androgènes dans le NHVM, des rats castrés, a suffit pour rétablir leur motivation sexuelle (Harding et McGinnis, 2003). Le déficit d'œstradiol a aussi été proposé comme explication. La densité en récepteurs d'œstradiol (famille des récepteurs nucléaires) et l'activité aromatasase étaient plus bas dans l'APO des rats non copulateurs (NC) que chez les rats copulateurs (C) (Portillo et al. 2007 ; Portillo et al. 2006 ; Clark et al., 1985). Une proportion inférieure de récepteurs d'œstradiol fixés a aussi été observée dans l'APOm des béliers ayant une activité sexuelle faible en comparaison des béliers sexuellement actifs (Alexander et al., 1993).

Les études qui portent sur les structures centrales participant du choix du partenaire sexuel ont débuté dans les années 90. Elles indiquent une différence morphologique entre les individus préférant un partenaire de même sexe et ceux préférant un partenaire de sexe opposé chez les humains (Swaab et Fliers, 1985; Allen et Gorski, 1990; Swaab et Hofman, 1990; Levay, 1991; Allen et Gorski, 1992; Swaab et al., 1995; Swaab et Hofman, 1995; Zhou et al., 1995; Byne et al., 2001), chez les rats et ferrets (Swaab et al., 1990 ; Kruijver et at., 1993 ; Houtsmuller et al., 1994 ; Brand et Slob, 1991 ; Dominguez-Salazar et al., 2002 ; Cherry et

Baum, 1990; Paredes and Baum, 1995; Kindon et al., 1996; Paredes et al., 1998b; Paredes, 2003) ou chez les ovins (Alexander et al., 2001b; Roselli et al., 2004a; Roselli et al., 2004b). Une des premières structures à être étudiée c'était le NSCH que chez les homosexuels est 1,7 plus large et contient 2,1 fois plus de cellules que celui des hommes hétérosexuels (Swaab et Hofman, 1990). Plusieurs auteurs ont tenté de lier la différenciation sexuelle des structures cérébrales et le choix d'un partenaire sexuel à des stéroïdes périnataux (voir les revues de Baum 2006 et Henley et al., 2011). Chez les rats, les traitements périnataux à l'inhibiteur de l'aromatase (ATD) qui empêche la différenciation sexuelle du comportement ont entraîné une augmentation du nombre de neurones contenant de la vasopressine dans le NSC et favorisé l'orientation vers la bisexualité (Swaab et al., 1995). Néanmoins, Kruijver et al. (1993) ont montré que les lésions du NSCH n'ont pas eu des effets sur la préférence sexuelle des rats mâles, qui ont continué à préférer des femelles même après lésion du NSCH, ce qui laisse le rôle de cette structure sexuelle dimorphique (différente chez le mâle et chez la femelle) peu clair. L'APOM est devenu la zone principale d'intérêt en ce qui concerne la préférence du partenaire après la découverte, chez l'homme, d'un noyau sexuel dimorphique de l'APOM, l'INAH3, qui est plus petit chez les hommes homosexuels que chez les hommes hétérosexuels (Levy, 1991). Cependant, la différence n'était pas significative dans une autre étude (Byne et al., 2001). Chez les moutons, Roselli et al., (2004a) ont identifié un noyau sexuel dimorphique dans l'APOM (le oSDN) plus large et contenant plus de cellules chez les mâles orientés vers femelles (FO) que chez les mâles orientés vers mâles (MO). Les béliers FO avaient également un niveau d'activité aromatase plus élevé dans l'APOM (Roselli et al. 2004b ; Resko et al., 1996). Un traitement prénatal avec la testostérone, chez les brebis, masculinise le comportement sexuel, le volume de l'oSDN et l'expression d'aromatase (Roselli et Stormshak, 2010). Mais, Alexander et al. (2001b) n'ont pas remarqué de différences de densité ou de taille des neurones dans l'APOM ou l'AMY entre béliers FO et MO. Chez les rats, la taille du SDN – POA, après traitement périnatal avec un inhibiteur d'aromatase (ATD), a été significativement et positivement corrélée avec la préférence pour une femelle plutôt qu'un mâle dans une étude (Houtsmuller et al., 1994), mais ce traitement n'a pas perturbé la préférence de partenaire dans d'autres études (Brand et Slob, 1991 ; Dominguez-Salazar et al., 2002), et le traitement prénatal ATD n'a eu aucun effet sur les moutons (Roselli et al. 2006). Chez les rats et les furets il a été montré qu'une lésion bilatérale de l'APOM, incluant le noyau sexuel dimorphique (SDN POA) a entraîné une préférence pour des mâles ou pour l'odeur de mâle face à des femelles réceptives (Cherry et Baum, 1990; Paredes et Baum,

1995; Kindon et al., 1996; Paredes et al., 1998b; Paredes, 2003). Ces mâles ont présenté une activation Fos semblable à celle des femelles (Alekseyenko et al., 2007). Une inversion de la préférence du sexe du partenaire a aussi été observée chez les rats après une inactivation temporaire de APOm par l'administration de lidocaine (Hurtazo et al., 2008). Il a été montré par Allen et al. (1990 et 1992), chez les humains, que le BNST des hommes est 2,47 fois plus grand que celui des femmes (Allen et Gorski, 1990) et que la commissure antérieure (CA) des homosexuels est 18% plus large que celui des femmes hétérosexuels et 34% plus large que celui des hommes hétérosexuels. Le profil d'activité hypothalamique, démontré par PET, était semblable à celui des femmes quand des hommes homosexuels ont reçu une application sur la lèvre supérieure d'une odeur dérivée de la testostérone, présente dans la sueur mâle (Savic et al., 2005). D'autres études utilisant l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (fMRI) ont montré une activation hypothalamique inférieure pour les hommes homosexuels après la visualisation d'une vidéo érotique préférée que pour les hommes hétérosexuels (Paul et al., 2008), ainsi que chez les femmes hétérosexuelles en comparaison des hommes hétérosexuels (Karama et al. 2002) ou n'ont pas observé de différence significative (Safron et al. 2007). Quelques études ont aussi été dirigées vers l'amygdale. Cette structure était la seule dans laquelle les hommes homosexuels, lors d'une étude fMRI, ont manifestés une activité cérébrale plus élevée que chez les hommes hétérosexuels en réaction à des images sexuelles de leurs sexes préférés (Safron et al. 2007). Chez les moutons, les béliers attirés vers les mâles (MO) ont présenté un nombre inférieur de récepteurs à l'œstradiol dans l'AMY que celui des béliers attirés vers femelle - FO (Resko et al., 1996). Mais, l'expression de Fos n'a pas différencié entre ces deux gens de béliers quand exposés à des partenaires de leur préférence (Alexander et al., 2001a). Donc la question du rôle de ces structures reste encore ouverte.

De plus, il est frappant que la majorité des recherches sur le comportement sexuel du mâle est basé sur les rongeurs (Coolen et Hull, 2004), malgré le fait que les béliers sont un très bon modèle expérimental (Roselli et Stormshak, 2010). Chez les béliers, espèce très touchée par les troubles sexuels chez les mâles (à peu près 35% ont un comportement qui compromet la reproduction), l'implication des structures cérébrales dans le comportement sexuel est peu connue. Quelques recherches ont été menées pour comprendre les différences entre béliers FO actives (d'haute et basse performance) et inactives, et MO, au niveau hormonal (Perkins et Fitzgerald, 1992; Perkins et al., 1992; Alexander et al., 1993; Perkins et al., 1995; Resko et al., 1996; Alexander et al., 1999) et anatomique (Alexander et al., 2001b). Il a été montré que mâles MO exposés à d'autres mâles ou à des femelles n'ont pas eu de

différence du niveau basal et de la fréquence des pulses de LH (Perkins et al., 1992), par contre une baisse de la concentration des récepteurs à l'œstradiol au niveau de l'amygdale ou de l'activité aromatasase dans l'aire préoptique ou l'eminence médiane a été observée chez des béliers présentant un faible niveau d'activité sexuelle ou une préférence pour des partenaires du même sexe (Alexander et al., 1993; Perkins et al., 1995; Resko et al., 1996). Cependant, des traitements par des hormones stéroïdes de ces animaux à l'âge adulte ne modifient ni leur comportement ni leur orientation sexuelle (Pinckard et al., 2000). Et il a été, donc, suggéré que les mâles ayant une préférence pour des partenaires du même sexe n'ont pas la capacité d'identifier les signaux émis par une femelle en chaleur ou que ces signaux ne le sont pas suffisamment stimulants (Roselli et Stormshak, 2009).

En ce qui concerne l'implication fonctionnelle des aires cérébrales sur le comportement sexuel des béliers avec une haute et basse libido, FO et MO, le premier et unique travail réalisé était celui d'Alexander et al. (2001a). Mais ce travail n'a étudié l'expression de Fos que pendant la phase motivationnelle et ils n'ont étudié que deux zones de l'hypothalamus : l'APO et le NHVM ; et deux limbiques : l'AMYme et le BNST.

Donc, l'objectif de ce travail était de comparer l'activation au moyen du marqueur d'activation Fos (Hunt et al., 1987; Sagar et al., 1988; Morgan et Curran, 1991; Hoffman et al., 1993) technique qui a été prouvée utile pour la compréhension des réactions des brebis face à des béliers (Gelez et Fabre-Nys, 2006 ; Chanvallon et Fabre-Nys, 2009), des structures limbiques, hypothalamiques, thalamiques et corticales chez des béliers différant par leur niveau de motivation (haute versus basse libido) et leur préférence sexuelle (FO ou MO) chez des animaux en contact direct ou indirect avec le partenaire.

Matériel et Méthodes

Animaux

Pour l'étude immunohistochimique, nous avons utilisé 29 béliers, 22 sexuellement actifs et 7 classés comme inactifs, de race Île-de-France âgées de 1,5 à 7 ans, appartenant à la station de l'INRA de Nouzilly. Ils ont été choisis parmi 155 béliers qui ont été soumis à des tests de comportement sexuel vis-à-vis de femelles, de mâles à des tests de choix. Pour chaque test, chaque bélier a été exposé, à quatre reprises à deux femelles en œstrus (test avec

femelles), ou à deux mâles (test avec mâles) ou au choix entre la proximité de deux mâles ou celle de deux femelles (test de choix). Les femelles et mâles stimuli étaient changés à chaque session qui durait 10 minutes pour les tests avec femelles ou avec mâles et 3 minutes pour le test de choix. Tous les comportements étaient notés ainsi que leurs latentes. Les béliers étaient classés à la suite de ces tests selon leur niveau d'activité sexuelle et leur préférence pour un partenaire femelle ou mâle. 70 mâles présentaient un haut niveau de comportement sexuel vis-à-vis des femelles et de ce groupe 18 ont été choisis et exposés directement ou indirectement à des femelles ou indirectement à des mâles. 7 mâles n'ont pas eu des réactions vis-à-vis les femelles, ni vis-à-vis les mâles et au test de choix n'ont pas montré préférence et ont été classés comme ayant faible libido (FL). 4 mâles qui n'ont réalisé aucune approche latérale vis-à-vis des femelles, qui dans les tests de choix ont passé plus de temps à côté des mâles et qui lors des tests avec les mâles les ont chevauché ou été chevauché par les mâles, ont été classés dans le groupe MO.

Huit béliers adultes, de race Laucane, sexuellement expérimentés et huit brebis adultes, de race Île-de-France, ovariectomisés traités pendant une semaine à la progestérone intravaginale (CIDR Nouvelle Zélande) suivie par une injection intramusculaire de 60µg d'oestradiol 24 heures avant le début des tests, ont été utilisés comme stimuli.

Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées en accord avec les directives de la Communauté Européenne (86/609/ECC) et du Ministère de l'Agriculture (autorisation n° 006259) et ont été réalisés pendant l'automne lors de la saison de reproduction.

Protocole expérimental

Pour habituer les animaux aux tests le jour de l'abattage et ainsi minimiser le stress, une période d'habituation d'une semaine a été pratiquée.

Le jour de l'abattage, les béliers ont été placés dans une salle, avec les animaux stimuli, pendant 90 minutes, dans les groupes suivants:

- Béliers inactifs avec un contact direct avec 2 femelles (Faible Libido; n= 7)
- Béliers attirés par les femelles avec un contact direct avec 2 femelles (CDF ; n= 7)
- Béliers attirés par les femelles avec un contact indirect avec 2 femelles (CIF ; n= 6)
- Béliers attirés par les femelles avec un contact indirect avec 2 mâles (CIM ; n= 5)
- Béliers attirés par les mâles (mâle orienté) avec un contact indirect avec 2 mâles (MO n= 4)

Le contact indirect a été obtenu en plaçant les animaux stimuli séparés par une barrière, de telle façon que les béliers à abattre pouvaient voir et sentir les stimuli, mais ne pouvaient pas réaliser des montes ni éjaculations.

Tous les comportements exprimés ont été notés et aussitôt après la stimulation, les mâles ont été décapités par les bouchers expérimentés de l'hôpital-abattoir de l'INRA de Nouzilly. Deux béliers du groupe inactifs qui ont fait des approches latérales avant abattage ont été exclus de l'expérience. Les cerveaux des béliers ont été canulés au niveau des carotides et perfusés avec 2L de nitrite de sodium 1% dissout dans du tampon phosphate (PBS : 0,1M ; pH=7,4) puis 4L de paraformaldéhyde 4% dissout dans le même tampon phosphate. Les cerveaux ont ensuite été extraits de la boîte crânienne et laissés dans du paraformaldéhyde 4% pendant 24h puis conservés dans du tampon phosphate contenant 30% de saccharose et 0,1% d'azide de sodium, comme décrit par Chanvallon et Fabre-Nys (2009).

Traitements des tissus

Histologie

Après le traitement initial, chaque cerveau a été coupé, transversalement, en trois blocs égaux et le bloc central a été coupé transversalement en coupes de 40 µm d'épaisseur, à l'aide d'un microtome de congélation (Leica, Paris, France). Les coupes ont été conservées à -20°C dans une solution cryoprotectante contenant 9g/L de NaCl, 10g/L de polyvinyl pyrrolidone, 30g/L de saccharose, 30% d'éthylène glycol et 50% de tampon phosphate (0,1M ; pH 7,4) dilués dans de l'eau déminéralisée. Une coupe sur 10 a été montée sur lame gélatinée et après a subi une déshydratation dans des bains successifs d'éthanol, suivie d'une coloration par le violet de Crésil - 1g/L dissout dans de l'eau déminéralisée (immersion pendant 10 minutes). Montées sous lamelle avec du Depex®, après avoir été de nouveau déshydratées dans l'éthanol et le toluène, ces coupes colorées ont servi comme des repères pour délimiter les structures d'intérêt et de sélectionner les zones du cerveau qui seront marquées. L'atlas de Richard (1967) et l'atlas du Brain Biodeversity Bank (Johnson et al., 2010) ont servi pour ce repérage(Chanvallon et Fabre-Nys, 2009).

Fos immunohistochimie

L'étape suivante, le marquage immunohistochimique de Fos, a été réalisée comme décrit par Gelez et Fabre-Nys (2006): Les coupes sélectionnées ont été rincées dans du PBS. Elles ont ensuite été successivement incubées dans une solution de PBS contenant 1% d'H₂O₂ (1h, 4°C) pour éliminer l'activité peroxydase endogène (bruit de fond) ; dans du PBS seul (5min, 4°C) puis dans du PBS contenant 0,3% de Triton X-100, 0,1% d'azide de sodium et 138 2% de Bovine Serum Albumin (BSA) (PBS TA BSA ; 1h, température ambiante). Ensuite les coupes ont été incubées avec un anticorps de lapin dirigé contre la protéine Fos (PC38.100, VWR International, France, dilué au 1/60000ème dans du PBS TA BSA, 2 jours, 4°C). Les coupes ont été rincées dans du PBS et incubées avec le second anticorps, sérum de mouton anti-Lapin (SMAL ; dilué au 1/400ème dans du PBS, 3h, température ambiante). Les coupes ont de nouveau été rincées dans du PBS et incubées avec un anticorps de lapin peroxydase anti-peroxydase (PAP18, Chemicon, UK, dilué au 1/10000ème dans du PBS BSA, 4°C, 1 nuit). Les coupes ont été rincées dans du PBS puis dans du tampon Tris-HCl (0,05M ; pH=7,6). Le complexe peroxydase a été révélé après incubation de 10 à 15 minutes dans du tampon Tris-HCl contenant 0,01% d'H₂O₂ ; 0,3% de Nickel et 0,04% de 3-3'diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), produisant un précipité noir. La réaction a été stoppée par plusieurs rinçages au Tris-HCl. A pH 7,6, la peroxydase transforme l'H₂O₂ en eau et en dioxygène, or le DAB forme un précipité noir insoluble en présence de dioxygène produisant ainsi une coloration noire des noyaux des cellules exprimant la protéine Fos. Les coupes ont ensuite été montées sur lames gélatinées, laissées sécher une nuit puis contrecolorées dans une solution de violet de Crésyl à 0,05%. Enfin les coupes ont été déshydratées par des bains successifs dans l'éthanol puis le toluène, et recouvertes d'une lamelle avec du Dépex ® (Gelez and Fabre-Nys, 2006).

Plusieurs structures hypothalamiques, limbiques et corticales décrites dans des ouvrages comme impliquées dans le comportement sexuel mâle ont été étudiées et leur localisation est présentée sur la Figure 49. Pour chaque structure cérébrale, 2 à 5 sections représentatives ont été choisies à l'exception de l'OVLT, de l'oSDN et du septum latéral dans lesquels une seule section a été analysée (Tableau 31).

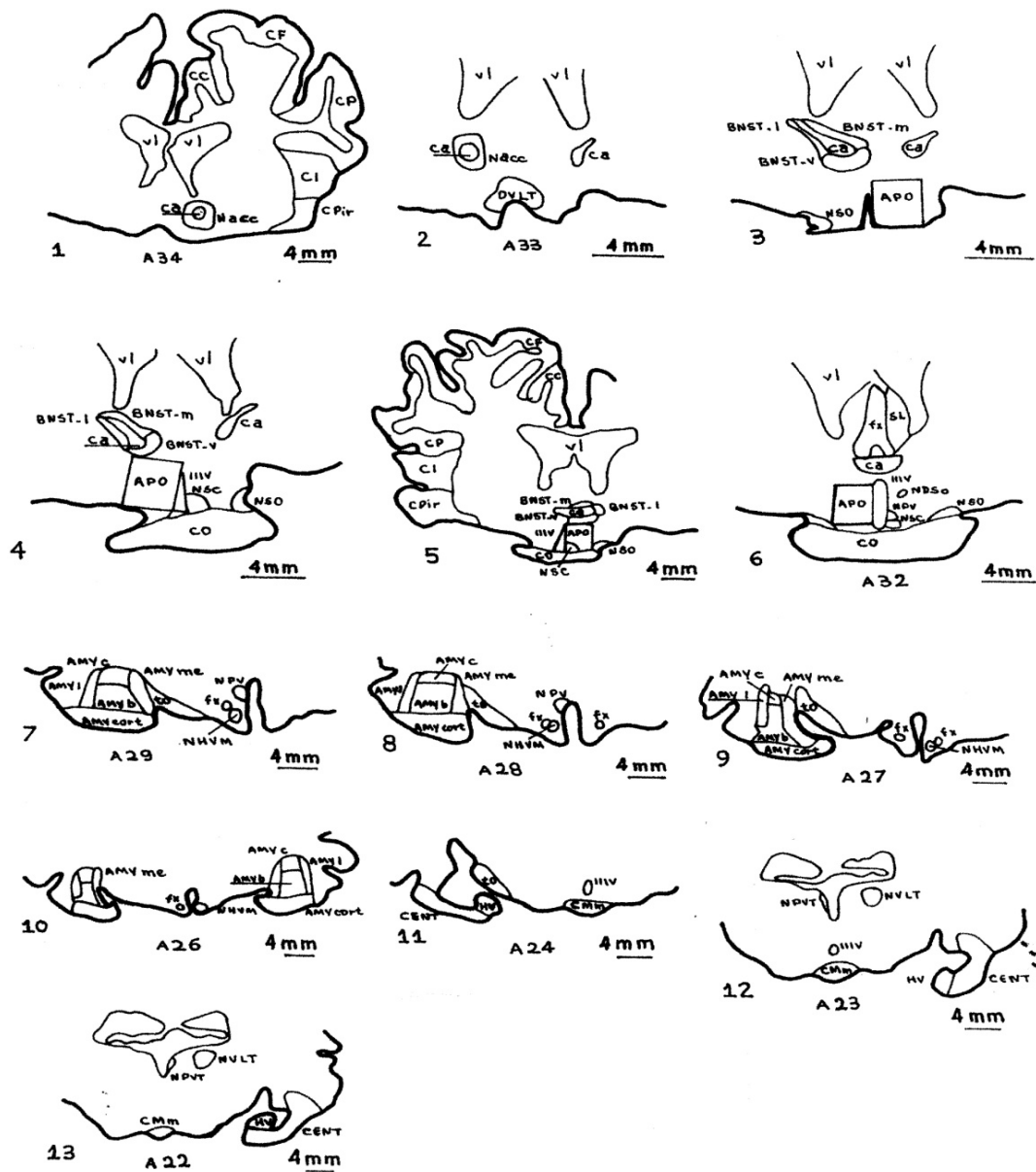


Figure 49. Dessins des coupes cérébrales de la partie rostrale (1) à la partir caudal (13). A34 a A22 – selon l'Atlas de Richard, P. (1967). AMYb – Amygdale basal, AMYc – Amygdale centrale, AMYcort– Amygdale corticale, AMYl – Amygdale latérale, AMYme – Amygdale médiane, APO – Aire pré-optique, BSTMI – Noyau du lit de la strie terminale latéral, BSTMm - Noyau du lit de la strie terminale médial, BSTMv - Noyau du lit de la strie terminale ventral, ca – Commissure antérieur, CC – Cortex cingulaire, Cent – Cortex Entorhinal, CF – Cortex Frontal, CI– Cortex insulaire, CMm – Corps mamillaire médial, CO – Chiasma optique, CP – Cortex pariétal, CPir – Cortex piriforme, Fx – Fornix, HV – Hippocampus ventral, IIIV – troisième ventricule, LS – Septum latéral, Nacc – Noyau accumbens, NDSO – Noyau sexuellement dimorphique de l'ovine, NHVM – Noyau Ventromedian, NPV – Noyau paraventriculaire, NPVt – Noyau paraventriculaire du thalamus, NSC – Noyau suprachiasmatique, NSO – Noyau Supraoptique, OVLT - Organe vasculaire de la lame terminale, to – tract optique, TVL – Thalamus ventrolatéral, vl – Ventricule latéral.

Analyse de l'Immunocoloration

La densité de cellules Fos immunoréactives (Fos-IR) (Chanvallon et Fabre-Nys, 2009) a été comptée avec l'aide d'un système d'image (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). Ce système est formé d'un microscope ayant une platine motorisée que permet un repérage bidimensionnel, ce microscope est connecté à une caméra vidéo et à un ordinateur équipé du logiciel Mercator qui permet l'identification et la sélection des cellules Fos-IR selon des paramètres de taille, forme et niveau de gris préalablement définis par l'expérimentateur pour chaque structure analysée. Le niveau de gris du fond de coupe est automatiquement estimé pour chaque section et soustrait de l'image originale. Tous les objets suspects étaient éliminés de façon manuelle par l'expérimentateur.

La spécificité du marquage Fos a été vérifiée par l'omission de l'anticorps secondaire ou du complexe peroxidase-antiperoxidase comme décrit par Gelez et Fabre-Nys (2006).

Analyses statistiques

La densité moyenne des cellules calculées pour chaque animal dans chaque région, puis la médiane et l'écart interquartile ont été calculés pour les cinq groupes. Comme les données ne suivaient pas une loi normale, les analyses non paramétriques ont été choisies. Les comparaisons entre les groupes ont été faites par des tests de Kruskal-Wallis (K W). Si les différences s'avéraient être significatives, les comparaisons deux à deux ont été réalisés à l'aide du test U de Mann-Whitney (M W). Le seuil de confiance a été fixé à 0,05. Les tests ont été effectués à l'aide du logiciel XLSTAT et/ou outils ANASTAT.

Résultats

Comportements avant abattage

Les comportements observés pendant les 90 minutes avant l'abattage sont montrés dans le tableau 30. Seuls les groupes CDF et FL ont eu la possibilité d'avoir un contact direct avec leur stimuli (femelles) et donc ont eu la possibilité de réaliser l'ensemble des comportements sexuels (flairages, approches latérales, montes et éjaculations), les autres groupes n'ayant pas de contact direct n'ont pu réaliser que des flairages et des approches latérales. Les CIM n'ont réalisés aucune approche latérale.

Les béliers avec une faible libido (FL) ont fait moins de flairages et approches que les CDF ($p = 0,003$; $p = 0,005$, respectivement) et non pas différer des CIM, ni quant aux flairages ($p = 1$), ni quant aux approches ($p = 0,06$).

Le comportement exprimé par les mâles attirés par des mâles (MO), vis à vis des mâles n'a pas différé de celui des mâles attirés par des femelles et exposés à des femelles (CIF). Vis-à-vis des mâles les MO ont réalisé la même quantité des flairages ($P = 0,43$) et d'approches latérales que les CIF ($p = 0,65$), autant de flairages ($p = 0,16$) et plus d'approches latérales que les CIM ($p = 0,048$).

Le niveau d'excitation, évalué par la fréquence des approches latérales, montré par les CDF a été plus important que ceux des CIF ($p = 0,005$), des CIM ($p = 0,004$) et des MO ($p = 0,01$).

Deux béliers appartenant au groupe faible libido ont réalisé beaucoup d'approches latérales, pendant les 90 minutes avant l'abattage, et à cause de ça ils ont été exclus des analyses statistiques.

Tableau 30. Médiane \pm interquartile des comportements réalisés par les béliers inactifs exposés à des femelles avec contact direct (FL), béliers actifs attirés vers femelles exposés à des femelles avec contact direct (CDF), béliers actifs attirés vers femelles exposés à des femelles avec contact indirect (CIF), béliers attirés vers mâles et exposés à des mâles sans contact direct (MO) et béliers actifs attirés vers femelles exposés à des mâles avec contact indirect (CIM) pendant le test de 1,5 heures avant abattage.

		Bélier exposé à					
		Femelles			Mâles		
		Avec Contact Direct		Sans Contact Direct	Sans Contact Direct		
Phase	Comportements	Faible Libido (FL)	Grand Libido (CDF)	Grand Libido (CIF)	Attirés vers Mâles (MO)	Attirés vers Femelles (CIM)	
Motivationnelle	Flairages	12 \pm 10 ^d	137 \pm 39,5 ^a	68 \pm 17	45,5 \pm 26,3	10 \pm 4	
	Approches	2 \pm 2 ^d	348 \pm 126,5 ^{a, b, c}	21,5 \pm 14,3 ^a	14,5 \pm 10,8 ^a	0 \pm 0	
Consommatoire	Montes		12 \pm 0 ^{a, b}				
	Éjaculations		6 \pm 1 ^{a, b}				
				NIVEAU COMPORTEMENT		PRÉFÉRENCE SEXUEL	

^a Diffère de CIM (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

^b Diffère de CIF (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

^c Diffère de MO (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

^d Diffère de CDF (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Marquage immunohistochimique de Fos

Les cellules Fos-IR étaient caractérisées par un précipité noir et dense à niveau du noyau cellulaire comme montre la Figure 50.

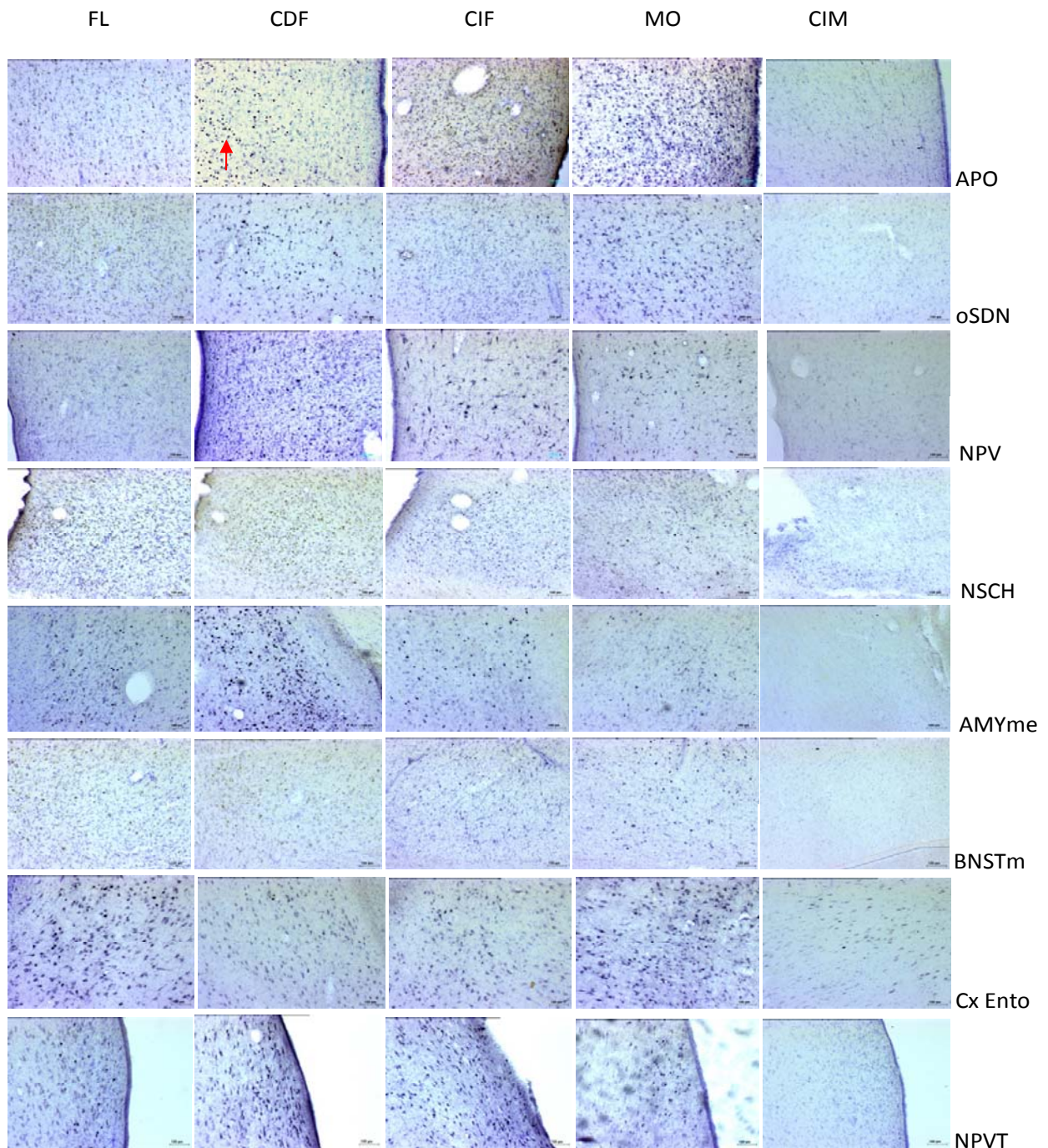


Figure 50. Photographies illustrant le marquage immunohistochimique de la protéine Fos réalisé dans plusieurs aires cérébrales chez des béliers représentatives de chaque groupe sur un grossissement de 100x. Flèche rouge représente un neurone Fos-IR.

Le tableau 31 contient l'ensemble des résultats concernant l'expression de la protéine Fos. De façon générale on constate que chez les CIM la densité de cellules Fos-IR, dans la grande majorité des structures, est toujours très faible par rapport aux autres groupes.

La densité de cellules FOS-IR dans l'APO des béliers CDF, CIF et MO est significativement plus importante que celle dans le groupe CIM ($p = 0,003$; $p = 0,017$ et $p = 0,03$, respectivement). Il en est de même dans l'oSDN dans lequel la quantité de cellules FOS-IR est significativement plus élevée chez les béliers CDF, CIF et MO que chez les CIM ($p = 0,004$; $p = 0,03$ et $p = 0,01$, respectivement). La même tendance existe dans le groupe FL mais la différence n'est significative ni pour l'APO ($p = 0,056$) et ni pour l'oSDN ($p = 0,07$). Les CDF montre aussi une stimulation plus forte que celles des FL dans l'APO ($p = 0,01$), mais pas dans l'oSDN ($p = 0,08$).

Toutes les autres structures hypothalamiques (NPV, NSCH, NSO, NHVM, Nacc, OVLT et CMM) des groupes CDF et CIF présentent une plus grande densité de cellules FOS-IR que le groupe CIM ($p < 0,05$). Par contre, pour le groupe FL cette tendance existe seulement dans le NHVM ($p = 0,008$), Nacc ($p = 0,01$) et le CMM ($p = 0,01$). Chez les MO la tendance est identique mais la différence n'est significative que dans le NSCH ($p = 0,03$), NSO ($p = 0,03$) et le CMM ($p = 0,016$). La densité de cellules FOS-IR dans le NPV des CDF est significativement plus élevée que celle des FL ($p = 0,03$).

La densité de cellules FOS-IR dans le BNST e l'AMY chez les FL, CDF et CIF (sauf l'AMYcent) est supérieure à celle des CIM ($p < 0,05$). Chez les MO cette différence s'exprime dans le BNSTmed ($p = 0,05$) et dans l'AMYbas ($p = 0,016$), par contre il n'y a pas eu de différence significative dans les structures limbiques entre les groupes MO et CIF. L'unique structure limbique qui montre plus de stimulation chez les CDF que chez les FL est le BNSTmed ($p = 0,05$). Le SL montre plus de cellules FOS-IR chez les CDF et chez les CIF que chez les CIM, mais cette tendance n'existe pas dans les FL et dans les MO. Le HV ne montre aucune variation de stimulation entre les groupes testés.

L'ensemble des structures corticales analysées montrent une densité de cellules Fos-IR supérieure ($p < 0,05$) chez les FL, chez le CDF (sauf le CxEnt, $p = 0,17$), chez CIF (sauf les:

Tableau 31. Densité (médiane± interquartile) de cellules Fos-IR dans les structures cérébrales chez les béliers inactifs exposés à des femelles avec contact direct (FL), les béliers actifs attirés par des femelles exposés à des femelles avec contact direct (CDF), béliers actifs attirés par des femelles exposés à des femelles avec contact indirect (CIF), béliers attirés par des mâles et exposés à des mâles sans contact direct (MO) et béliers actifs attirés par des femelles exposés à des mâles avec contact indirect (CIM).

	Structures	Nb Coupes	Groupe				
			FL (n = 5)	CDF (n = 7)	CIF (n = 6)	MO (n = 4)	CIM (n = 5)
	Aire Pré optique (APO)	4	4,5 ± 5 ^c	31,58 ± 17,4 ^{A,b}	13,9 ± 11,9 ^a	13,8 ± 9,6 ^a	0,58 ± 0,58
Hypophysaire	Ovine Sexually Dimorphic Nucleus (oSDN)	1	10,2 ± 11,3	41 ± 55 ^{A,b}	10 ± 9,6 ^{a,c}	13 ± 15 ^a	0 ± 1,2
	Organe Vasculaire de la Lamme Terminale (OVLTL)	1	6,84 ± 1,8 ^A	8,26 ± 6,29 ^A	7,16 ± 2,9 ^A	1,83 ± 1,27	0,71 ± 0,98
	Noyau Paraventriculaire (NPV)	5	2,61 ± 0,11 ^c	13,6 ± 16,97 ^A	18,5 ± 21,2 ^A	15,9 ± 16,96	1,24 ± 0,48
	Noyau Suprachiasmatique (NSCH)	4	13,1 ± 9,7	23,3 ± 14,46 ^A	27,7 ± 24,8 ^a	44,5 ± 15,2 ^a	4,7 ± 2,9
	Noyau Supraoptique (NSO)	3	0,32 ± 1,27	3,13 ± 6,9 ^a	2,14 ± 1,8 ^a	2,83 ± 2,09 ^a	0 ± 0
	Noyau Ventromédian (NHVM)	4	26 ± 28 ^A	13,25 ± 11,1 ^a	16,7 ± 20 ^a	23,8 ± 15,5	2,48 ± 1,31
	Noyau Accumbens (Nacc)	2	1,87 ± 1,19 ^A	3,43 ± 2,99 ^A	2,49 ± 1,63 ^a	4,36 ± 7,4	0 ± 0,48
	Corps Mamiliaire Médial (CMM)	3	10,9 ± 10 ^A	4,15 ± 5,56 ^A	4,57 ± 5,82 ^a	5,06 ± 6,59 ^a	0,11 ± 0,23
	Bed Nucleus of Striae Terminales Latéral (BNSTlat)	4	2,59 ± 1,54 ^A	6,06 ± 3,5 ^a	3,05 ± 4,6 ^A	2,62 ± 6,3	0 ± 0
	Bed Nucleus of Striae Terminales Médial (BNSTmed)	4	3,17 ± 1,63 ^{A,c}	6,32 ± 8,61 ^A	3,14 ± 2,85 ^a	13,7 ± 27,2 ^a	0 ± 0
	Bed Nucleus of Striae Terminales Ventral (BNSTvent)	4	3,67 ± 0,25 ^A	9,02 ± 9,06 ^A	3,6 ± 2,86 ^A	8,5 ± 16,32	0 ± 0,15
	Amygdale Noyau Médian (AMYmed)	4	5,65 ± 11 ^A	8,52 ± 5,51 ^A	3,88 ± 10,29 ^a	2,97 ± 2,1	0,09 ± 0,12
	Amygdale Noyau Latéral (AMYlat)	4	1,5 ± 2,2 ^a	0,65 ± 4,69 ^A	1,26 ± 1,83 ^a	1,08 ± 1,97	0 ± 0
	Amygdale Noyau Cortical (AMycort)	4	5,17 ± 13,2 ^A	6,06 ± 3,76 ^A	5,19 ± 4,64 ^a	3,47 ± 5,77	0,49 ± 0,24
	Amygdale Noyau Central (AMYcent)	4	1,6 ± 3,5 ^a	4,79 ± 4,02 ^A	5,19 ± 8,93	3,28 ± 4,53	0 ± 0,04
	Amygdale Noyau Basal (AMYbas)	4	7,3 ± 6 ^A	5,19 ± 3,94 ^A	5,2 ± 4,71 ^a	3,5 ± 6,35 ^a	0,09 ± 0,17
	Septum Latéral (SL)	1	0,4 ± 0,4	2,1 ± 1,25 ^a	2,56 ± 2,44 ^a	1,41 ± 3,16	0,01 ± 0,01
	Hippocampe Ventralis (HV)	3	3,12 ± 2,64	1,14 ± 1,36	2,26 ± 2,34	1,39 ± 2,4	0,45 ± 0,51
	Cortex Cingulaire (CxCing)	2	4,37 ± 1,11 ^A	5,53 ± 5,72 ^A	5,22 ± 3,05 ^A	3,48 ± 6,35 ^a	0,03 ± 0,06
	Cortex Frontal (CxFr)	2	0,74 ± 1,3 ^A	1,56 ± 1,14 ^A	0,9 ± 2,18 ^a	2,11 ± 2,43 ^a	0,06 ± 0,15
	Cortex Pariétal (CxPar)	2	0,37 ± 0,88 ^A	1,29 ± 1,46 ^a	0,38 ± 2,14	0,35 ± 1,24	0 ± 0
	Cortex Insulaire (CxIns)	2	2,9 ± 4,6 ^A	2,66 ± 8,23 ^A	3,43 ± 5,52 ^A	1,26 ± 0,93 ^a	0,06 ± 0,08
	Cortex Piriforme (CxPir)	2	1,3 ± 3,1 ^A	0,48 ± 4,97 ^a	2,31 ± 1,83 ^a	1,31 ± 1,06 ^a	0,21 ± 0,19
	Cortex Entorhinal (CxEnt)	3	3,2 ± 8,8 ^a	2,27 ± 1,41	1,61 ± 2,15	3,41 ± 0,6 ^a	0,89 ± 1,48
	Thalamus Ventro Latéral (TVL)	3	0,3 ± 4,3	0 ± 0,73	0 ± 0,26	0,55 ± 0,91	0 ± 0
	Noyau Paraventriculaire du Thalamus (NPVT)	2	10 ± 7,8 ^a	38,8 ± 52 ^a	40 ± 54,8 ^a	19,3 ± 27 ^a	0,54 ± 1,22

^a Diffère de CIM (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

^A Diffère de CIM (Mann-Whitney, $p < 0,01$)

^b Diffère de CIF (Mann-Whitney, $p < 0,02$)

^c Diffère de CDF (Mann-Whitney, $p < 0,05$)

Discussion

Notre étude est la première à réaliser une description aussi complète des structures hypothalamiques, limbiques, corticales et thalamiques impliquées dans la phase motivationnelle et consommatoire chez les béliers hétérosexuels, ainsi que leurs implications dans le choix d'un partenaire sexuel, ou encore dans le niveau de motivation sexuel, grâce à la protéine c-Fos comme marqueur de l'activité neuronale.

Parmi ces 26 structures cérébrales analysées, seuls le HV et le TVL présentent dans tous les groupes une densité de cellules FOS-IR très faible et constante. Le groupe CIM présente une densité dans la grande majorité des structures toujours très faible par rapport aux autres groupes. Il n'y a pas de différence de stimulation, dans toutes les aires analysées, entre les groupes CIF et MO. Les seules structures qui montrent plus de stimulation chez les CDF que chez les CIF sont l'APO et l'oSDN et les CDF ont une densité de cellules FOS-IR plus forte dans l'APO, le NPV et le BNSTmed que les FL. À l'exception d'AMYcent, le CxPar, le CxEnt, le HV et le TVL, toutes les aires étudiées semblent être impliquées dans la phase motivationnelle. L'AMYcent et le CxPar sont impliqués dans la phase consommatoire et l'APO et l'oSDN semblent être impliquées dans les deux phases.

Le contact direct ou indirect avec les femelles a provoqué, chez les mâles attirés par les femelles, la présence de cellules Fos-IR dans de nombreuses structures diencéphaliques et corticales. Mais le contact indirect avec les mâles n'a pas entraîné la présence de ces cellules chez les mâles attirés par les femelles, alors que des cellules Fos IR sont observées chez les mâles attirés par les mâles qui ont été exposés à d'autres mâles.

Le cortex enthorinal était la seule structure dans laquelle la densité FOS-IR était plus élevée chez les MO, mais il ne l'a pas été chez les CDF et ni chez les CIF, tandis qu'il l'a été chez les FL.

L'APO et l'oSDN

Les CDF ont eu une stimulation de l'APO 2,27 fois plus forte que celle trouvée chez les CIF, et la quantité de neurones Fos-IR chez les CIF et CDF est comparable à celle trouvée par (Alexander et al., 2001a) chez les béliers de haute et basse performance exposés sans contact direct à des femelles en chaleur. Pour plusieurs auteurs L'APO n'est impliquée que lors de la phase consommatoire (Everitt, 1990; Robertson et al., 1991; Baum et Everitt, 1992; Kollack et Newman, 1992; Wersinger et al., 1993; Fernandezfewell et Meredith, 1994; Liu et al., 1997b; Paredes, 2003). D'autres affirment qu'elle n'est stimulée que lors de la phase motivationnelle (Lloyd and Dixson, 1988; Paredes et al., 1993; Hurtazo et al., 2008) et d'autres encore qu'elle est impliquée lors des deux phases (Shimura et al., 1994; Pfaus, 1999; Yeh et al., 2009). Nos données montrent à la fois l'implication de l'APO dans la phase motivationnelle du comportement sexuel du bélier FO et MO et la relation étroite entre la stimulation de l'APO et la quantité d'approches réalisées, un indice indirect de la motivation sexuelle ($r = 0,65$, $p = 0,000$; Graphique 1). On remarque que plus les stimulations ont été nombreuses, plus on a eu d'approches latérales. Les CDF ont fait beaucoup plus d'approches latérales que tous les autres groupes et c'est chez eux que le nombre de cellules Fos-IR était le plus grand. Tandis que les FL et les CIM n'ont différé ni dans le nombre d'approches et ni dans leur stimulation de l'APO, les deux groupes étant les plus faibles pour les deux indices. Une faible stimulation de l'APO accompagne donc une faible libido. Cela peut montrer que l'APO est une importante structure pour la libido chez les béliers. Ceci concorde avec les données chez les rats qui montrent que L'APO stimulée accélère la copulation et diminue le temps précédent l'éjaculation (Malsbury, 1971; Merari et Ginton, 1975), tandis que son inactivation produit une inhibition sexuel (Hurtazo et al., 2008). Avec nos données, on ne peut rejeter l'hypothèse qu'un plus haut niveau de stimulation de l'APO soit impliqué dans la phase consommatoire, comme observé chez les CDF. Donc, chez les béliers l'APO est probablement impliquée dans la phase motivationnelle, mais elle peut aussi l'être dans la phase consommatoire et elle constitue une région clé pour la libido corroborant les résultats de nombreux auteurs (Shimura et al., 1994; Pfaus, 1999; Yeh et al., 2009, Malsbury, 1971; Merari et Ginton, 1975; Hurtazo et al., 2008).

Il a été démontré que l'APO est un site clé pour la choix du partenaire sexuel (Kindon et al., 1996; Paredes et al., 1998b; Paredes, 2003; Roselli et al., 2004b), car des mâles avec

une lésion bilatérale de l'APO ont préféré des mâles plutôt que des femelles réceptives. Chez les moutons, la taille du noyau sexuellement dimorphique dans la zone préoptique et son niveau d'aromatase mRNA sont plus élevés chez les mâles orientés vers les femelles que les mâles orientés vers les mâles (Roselli et al., 2004a,b). Nos études confirment ces résultats : nous avons trouvé une différence en surface entre les MO et les autres mâles (tous attirés vers femelles) ($MO = 0.31 \pm 0.13 \text{ mm}^2$ comparés aux autres mâles = $0.51 \pm 0.18 \text{ mm}^2$; $p < 0.007$).

Par contre, nous avons trouvé que l'activité de l'APO était de la même intensité chez les MO et chez les CIF ce qui est en accord avec les travaux de (Alexander et al., 2001a), qui n'ont pas trouvé de différence de stimulation de l'APO entre les béliers attirés par des mâles exposés à des mâles, et les béliers de haute performance exposés à des femelles en chaleur, les deux groupes n'ayant pas de contact direct avec les animaux stimuli.

La densité élevée de neurone Fos-IR dans les oSDN des béliers CDF, MO et CIF qui étaient les béliers sexuellement actifs et exposés à leurs partenaires préférés, est cohérente avec le rôle de ce noyau dans le comportement sexuel et le choix d'un partenaire sexuel sans pour autant être spécifique du choix.

Malgré des différences structurelles, la façon dont ces structures fonctionnent devant le stimulus sexuel signifiant semble la même. Cette conclusion devrait être tirée avec précaution à cause du petit nombre de béliers MO que nous avons eu pour notre étude et aussi à cause de la limite technique, car il est possible d'avoir une stimulation cellulaire sans expression de Fos (voir revue de Hoffman et al., 2000).

La comparaison entre nos données et celles d'Alexander et al. (2001a) montre quelques différences importantes. Dans leur travail, ils ont trouvé une plus forte expression de cellules Fos-IR chez les béliers ayant une faible performance, tandis que dans le notre les béliers ayant une faible libido présentaient une densité plus faible que ceux hautement motivés. Deuxièmement, contrairement à nous, ils n'ont observé aucune cellule Fos-IR chez les mâles qui préfèrent les mâles et exposés à des mâles. Une des différences principales dans le protocole est que, lors de leur étude, l'exposition à d'autres animaux a duré 4 heures alors que pour notre expérience, ils n'étaient exposés que 1h30. Il est possible que l'on n'étudie pas le même phénomène. Une autre différence concerne le nombre de coupes étudiées par zone.

Ils ont analysé une seule section par structure, tandis que nous avons fait 4 sections de l'APO, du BNST latéral, du VMH et de l'AMYm couvrant ainsi une zone plus large.

Noyaux hypothalamiques

Dans toutes les autres structures hypothalamiques la densité de cellules Fos-IR ne diffère pas significativement entre CDF et chez les CIF. Toutes ces structures semblent être impliquées dans la première phase du comportement chez les béliers attirés vers femelles.

Le NSCH n'a été impliqué, chez les rats, que lors de la phase consommatoire après activité sexuelle vigoureuse (Phillips-Farfán et Fernández-Guasti, 2007). D'après nos données, nous ne pouvons affirmer une implication de cette zone lors de cette phase. Par contre son implication paraît exister lors de la phase motivationnelle chez les béliers FO et MO. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas eu de stimulation du NSCH chez les FL, tandis qu'il y en a eu chez les CDF, CIF et MO. Ceci nous amène à penser une probable implication de ce noyau dans le processus de la motivation sexuelle. Chez les hommes, une différence morphologique du NSCH a été constatée par Swaab et Hofman, (1995) entre homosexuels et hétérosexuels (plus grand chez les homosexuels), mais la lésion du NSCH n'a pas affectée la préférence du partenaire chez les rats (Kruijver et al., 1993) et chez nos béliers il semble que ce noyau n'a pas d'implication dans cette préférence.

En ce qui concerne le NPV, aucune différence significative n'a été trouvée entre les béliers CDF et CIF. Ainsi nos données ne concordent pas avec les résultats de Liu et al., (1997b, a), car elles ne nous permettent pas d'affirmer une probable implication du NPV dans la phase consommatoire, mais seulement dans la phase motivationnelle. C'est peut être dû au fait que notre comptage a été réalisé de façon globale dans tout le NPV, ne tenant pas compte des spécificités anatomiques (subrégions magnocellulaire et parvocellulaire) (Caquineau et al., 2006) qui impliquent le NPV, chez les rats, dans les deux phases du comportement sexuel. Ce résultat contraste aussi avec le rôle de ce noyau sur le contrôle de l'éjaculation observé chez les rongeurs (Coolen et al., 2004). Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les mâles, dans les groupes sexuellement motivés et exposés à des femelles, aient montré une érection que nous n'ayons pas remarqué. Cette absence de différence pourrait aussi avoir une relation avec l'organisation du comportement sexuel chez les moutons. Chez cette espèce, le mâle éjacule presque à chaque intromission (Pepelko et Clegg, 1965 ; Dewsbury, 1972). Cette intromission peut arriver à la première ou la dixième monte, en fonction de la "dextérité" du mâle (en moyenne 1,6 selon Pepelko et Clegg 1965) et en général après seulement quelques

poussées pelviennes superficielles (Banks, 1964). Ainsi, la quantité de stimulation tactile du pénis est beaucoup plus faible et l'éjaculation est au moins partiellement contrôlée par des mécanismes différents chez le bélier et chez le rongeur. Par contre, le fait d'avoir trouvé une différence significative, dans le NPV, entre les FL et les CDF peut montrer une implication de cette aire dans la libido. La stimulation chez les FL a été beaucoup plus faible que celle des CDF, montrant que lorsque les neurones du NPV ont plus réagi, la motivation a été plus exprimée et s'est traduite par un plus grand nombre d'approches latérales, de montes et d'éjaculations. Ceci concorde avec les résultats de (Liu et al., 1997b, a). Ils ont montré qu'une lésion partielle ou totale du NPV entraîne une baisse de la libido. Le fait de trouver une stimulation semblable dans le NPV chez les MO et les CIF nous amène à penser que le niveau d'excitation dans ces deux groupes était semblable (Miyagawa et al., 2007). Le NPV semble donc être une structure impliquée dans la motivation pour un partenaire du même sexe chez les béliers.

Les différences de densité de Fos-IR dans le Nacc chez les CDF, CIF et MO ressemblent à celles observées dans le NPV, et le Nacc semble être impliqué dans la phase motivationnelle chez les béliers hétérosexuels et MOs. En revanche, l'absence de différence entre les CDF et les FL suggère qu'il n'existe pas de lien entre l'activation de cette structure et l'intensité de la motivation sexuelle. Ceci concorde avec les données de (Kippin et al., 2004) qui, en lésant le Nacc, n'ont pas observé de conséquence sur la motivation sexuelle chez le rat. Les mêmes résultats sont observés pour l'NHVM, l'OVLTL et le CMM chez tous les groupes testés. Ces structures peuvent être impliquées dans la phase motivationnelle chez les béliers hétérosexuels et MOs, mais ne sont probablement pas impliquées dans l'intensité de la motivation sexuelle. Les niveaux de stimulation trouvés dans le NHVM des CDF, CIF, FL et MO sont proches de ceux trouvés par (Alexander et al., 2001a) chez les béliers. Par contre, cette structure a été associée, chez le rat, à la satiété sexuelle (Fernandez-Guasti et al., 2003). Ce qui n'est probablement pas le cas dans les groupes qu'on a testé. Nous n'avons pas observé chez nos béliers l'effet inhibiteur du corps mamillaire sur la performance trouvé par Lisk (Lisk, 1969) chez le rat, car nous n'avons pas de différence de stimulation entre les groupes FL et CDF. Le comportement identique du NSO à celui du NPV, chez les CDF, CIF et MO, confirment leurs similitudes anatomiques, car les deux possèdent des neurones magnocellulaires à ocytocine (Caquineau et al., 2006). Nous ne pouvons cependant pas affirmer que le NSO soit impliqué dans la phase consommatoire chez le bélier, comme cela l'a été montré chez le rat (Honda et al., 1999; Caquineau et al., 2006), mais nos données nous

amènent à penser que le NSO est probablement impliqué dans la phase motivationnelle du comportement sexuel du bélier hétérosexuel et MO. La non stimulation du NSO chez les FL, et sa stimulation chez les CDF et chez les CIF sont des arguments suggérant l'implication du NSO dans l'expression de la motivation sexuelle. Une plus forte stimulation du NSO est accompagnée d'une plus forte libido. Cette donnée est en accord avec l'augmentation de la latence à la monte et à l'intromission observée par (Caquineau et al., 2006) chez les rats ayant reçu un blocage du NSO.

Structures limbiques

Les relations entre les structures limbiques (BNST et AMY) et hypothalamiques ont été bien montrées chez le rat par Baum et Everitt (1992). Ils ont remarqué que l'activation de l'APO suite aux interactions sexuelles disparaissait si le BNST et l'AMY étaient lésées. Nos données peuvent nous amener à penser que cette relation existe aussi chez les béliers. Nous avons trouvé une activation des BNST et des AMY dans les CDF et CIF (exception de l'AMYcent), comme pour l'APO. Plusieurs études indiquent que des lésions du BNST, chez les rongeurs, perturbent les comportements motivationnelles et/ou consommatoire (Been et Petrulis (2010) (voir Aste et al., 1998 ; Pfaus et Heeb, 1997)), indiquant une participation de cette structure lors des deux phases du comportement sexuel. Des chercheurs ont supposé que le BNST médial fait partie du circuit qui contrôle le comportement d'accouplement et que le BNST latéral est caractérisé par des connections réciproques avec des nucleus impliqués dans la régulation autonome central (Aste et al., 1998). Ces données suivent la tendance plus actuelle qui montre qu'une même structure cérébrale, selon ses subdivisions, peut participer aux deux phases du comportement sexuel. Nos données ne nous permettent pas d'affirmer une implication du BNST dans la phase consommatoire, mais on peut penser que les trois BNST étaient impliqués dans la phase motivationnelle. Ceci concorde avec les données d'Alexander et al., 2001a. Les BNSTlat et ventral semblent ne pas influencer sur le degré de motivation sexuelle, car ils étaient stimulés de la même façon chez les FL et chez les CDF. Par contre, le BNSTmed semble être impliqué, car les CDF ont présenté une stimulation supérieure à des FL, contrairement à ce qu'Alexandre et al., (2001a) ont trouvé. Cette discordance doit provenir du fait qu'ils ont compté les cellules de façon globale sur tout le BNST sans considérer ses divisions, tandis que nos résultats prennent en considération les sub-régions du BNST. La stimulation trouvée dans les trois subdivisions du BNST chez les MO était la même que celle des CIF, ainsi il paraît évident que les BNST (lat, med et vent) sont

probablement impliqués dans la phase appétitive chez les béliers attirés par des mâles. Même si les niveaux de stimulations trouvés dans les BNST chez nos animaux MO correspondent à ceux trouvés par Alexander et al., (2001a) chez ses béliers attirés par des mâles, ses données ne lui permettent pas d'affirmer une probable implication du BNST chez les béliers MO. Cette différence peut s'expliquer par la variation des critères utilisés pour sélectionner les béliers attirés par des mâles. Nos critères étaient beaucoup plus restrictifs que ceux utilisés par eux (voir matériel et méthodes).

Tous les noyaux amygdaliens observés ont montré le même comportement que celui des BNST chez les CDF, CIF, MO et FL, à l'exception de l'AMYcent chez les CIF. Ainsi, l'AMYmed, l'AMYlat, l'AMYcort et l'AMYbas semblent être impliqués lors de la phase motivationnelle chez les béliers hétérosexuels et MOs comme montré chez les rongeurs (Harris et Sachs, 1975; Kondo, 1992, Everitt, 1990).

L'AMYme des CDF, CIF et FL ont présenté une activation des cellules FOS-IR de la même intensité. Ceci nous permet de penser que cette activation est probablement liée aux comportements motivationnelles comme cela l'a été montré chez le rat (Harris et Sachs, 1975 ; Bressler et al., 1996 ; Paredes et al., 1998a). Mais nous ne pouvons pas exclure une possible implication de cette structure dans la phase consommatoire comme l'a démontré Collen (Coolen et al., 1996). L'AMYmed peut être impliquée lors des phases motivationnelle et consommatoire chez le rat (Kondo et Arai, 1995) et chez le furet (Wersinger and Baum, 1997). Cette participation distincte dépend de la région de l'AMYmed : la région dorsolatérale est impliquée dans la phase consommatoire, et la médiale dans la phase motivationnelle (voir Pfau and Heeb, 1997). Nous n'avons pas fait cette distinction anatomique dans l'AMYmed, ce qui a pu entraîner le manque de différenciation de FOS-IR entre les groupes CDF, CIF et FL.

Au sujet de L'AMY basolatérale et l'AMYcort, nos données sont en concordance avec les publications. L'AMY basolatérale n'est activée que pendant l'expression des comportements olfactifs chez le rat (Coolen et al., 1997; Kippin et al., 2003) et L'AMYcort a été citée comme impliquée uniquement lors de la phase appétitive, chez le rat (Melis et al., 2009).

En ce qui concerne l'AMYcent, nos résultats montrent une activation à la fois chez les CDF et les FL alors que ces n'ont réalisé ni monte et ni éjaculation. Donc, il est probable que cette stimulation soit plutôt causée par le contact direct que les mâles des deux groupes ont pu avoir avec les femelles. Alexander et al. (2001a), à partir des observations de Perkins et

Fitzgerald (1992), ont remarqué l'importance du contact physique sur la réponse physiologique chez les béliers attirés par des béliers. L'AMYcent fait partie du système limbique (Purves et al., 2011; Mahler, 2009) impliqué dans les conduites motivationnelles et émotionnelles (Purves et al., 2011), et l'amygdale peut avoir un double rôle : certains noyaux stimulent le comportement sexuel et leur lésion inhibe toute motivation sexuelle, tandis que d'autres ont une action inhibitrice et leur lésion se traduit par des troubles de l'état affectif de l'animal et par une hypersexualité (Dreifuss et al., 1968). Donc, le contact indirect peut probablement inhiber l'activation de l'AMYcent alors que le contact direct peut le stimuler.

Le septum Latéral (SL) est une aire importante pour le comportement sexuel mâle. Chez le rat (Kondo et al., 1990; Gogate et al., 1995) et chez la caille (Taziaux et al., 2006), son implication a seulement été observée lors de la phase consommatoire. Nos données ne nous permettent pas de confirmer l'implication de cette zone lors de cette phase, mais son implication paraît évidente lors de la première phase chez les béliers hétérosexuels et MO. De même, il semble que le SL, chez le bélier, est une zone importante pour la motivation sexuelle, car il n'y a pas eu de stimulation chez les FL, tandis qu'il y en a eu chez les CDF et CIF.

Structures corticales

Les cortex Cingulaire (CxCing), CXFr, CxIns et CxPir ont tous eu le même comportement, et pourtant il semble que ces cortex, chez nos béliers, ne soient impliqués que dans la phase motivationnelle chez les hétérosexuels et MOs. Étant donné qu'ils étaient stimulés chez les FL de la même façon que chez les CDF et les CIF, il semble que la stimulation de ces cortex n'agisse pas sur leur niveau de motivation sexuelle.

Nos données sont en accord avec la plupart des publications, car la majorité des auteurs citent ces cortex comme impliqués dans la phase motivationnelle : le CXFr (Stoleru et al., 1999; Bocher et al., 2001; Mouras et al., 2003; Hamann et al., 2004), et le CxCing (Stoleru et al., 1999; Karama et al., 2002) ont été excités, chez les humains, à partir des stimulus visuels. Chez les rats, la participation du CXFr a été observée lors des deux phases du comportement sexuel (Balfour et al., 2006), tandis que les lésions du CxCing ont entraîné des préjudices pour la phase consommatoire (Yamanouchi et Arai, 1992) mais Frohmader et al (2010) ont pu montrer que ce cortex est lié au système mesolimbique qui régule la motivation et la récompense, ce qui semble contradictoire.

Le CxPar n'a pas été stimulé chez les CIF ou chez les MO, mais il l'a été chez les CDF et FL donc seulement lorsque le contact entre les animaux était direct. Ainsi il est probable que le contact indirect inhibe le CxPar, tandis que le contact direct le stimule. L'effet du contact direct sur la réponse physiologique des béliers a été suggéré par Alexander et al (2001a).

Le cortex entorhinal était l'unique structure qui a été activée chez les MO mais pas chez les CDF ou les CIF; par contre il l'a été chez les FL. Une hypothèse est que cette activation soit liée à des neurones inhibiteurs du comportement hétérosexuel. D'une certaine façon cette tendance a été trouvée chez les hommes qui ont éjaculé, après masturbation. L'éjaculation a entraîné une diminution d'activation dans le cortex entorhinal (Holstege et al., 2003). Chez les hommes hypoactifs, une activation du cortex orbitofrontal est observée, tandis que chez les hommes qui ont une activité normale il n'est pas activé. Les chercheurs en déduisent que les hypoactifs présentent un manque de levée de l'inhibition exercée par le cortex orbitofrontal (Mouras et al., 2003). On en déduit que chez les béliers hétérosexuels, l'activation du CxEnt entraîne une baisse de la libido, et que les béliers FL souffrent d'un manque de levée de l'inhibition exercée par le CxEnt. Le CxEnt pourrait fonctionner comme un inhibiteur de la motivation hétérosexuelle.

Autres structures cérébrales

Aucune activation Fos n'est observée dans l'HV et le TVL. Ces structures semblent n'avoir aucun rôle dans les événements sexuels des béliers hétérosexuels et MOs, ce qui n'est pas le cas dans les observations de Taziaux et collaborateurs (Taziaux et al., 2006; Taziaux et al., 2007) chez la caille, qui ont constaté une implication de ces structures pendant la phase motivationnelle. Cette apparente contradiction peut-être due à l'éloignement des espèces.

Le NPVT semble être impliqué lors de la phase motivationnelle des béliers hétérosexuels et MO. Par contre la stimulation de cette structure ne semble pas avoir de relation avec le niveau de la motivation sexuelle, car elle était activée de la même façon chez les FL et chez les CDF. Pour (Sewards et Sewards, 2003), le NPVT, chez les rats, est impliqué dans la représentation du désir sexuel et (Sapolsky et Eichenbaum, 1980) ont montré

que les lésions affectant le NPVT, chez les hamsters, peuvent provoquer des comportements pré-copulatoires et copulatoires inappropriés et inefficients. Ces données, comme les notre, peuvent référencer le NPVT comme une importante aire pour la phase motivationnelle.

Conclusions

Nos résultats montrent que la réalisation des approches latérales, chez les béliers hétérosexuels, est accompagnée d'activations dans l'hypothalamus : APO, NPV, NSCH, NSO, NHVM, Nacc, OVLT et CMm ; dans les structures limbiques : BNST latéral, médial et ventral, AMY médiane, latérale, corticale et basal et le septum latéral ; dans les structures corticales : des cortex cingulaire, frontal, insulaire et piriforme. Et aussi dans le NPVT. Toutes ces structures semblent être impliquées dans la première phase du comportement sexuel du bélier Île-de-France.

Le déclenchement de la phase consommatoire fut, chez tous les béliers CDF, précédé de la phase motivationnelle. Une structure qui n'a pas été stimulée chez les CIF, qui l'a été chez les CDF, peut l'avoir été lors de montes et d'éjaculations, ce qui atteste de sa participation dans la phase consommatoire. On a observé que seuls l'AMYcent et le Cortex Parietal n'ont pas été stimulés chez les CIF, mais l'ont été chez les CDF. L'AMYcent et le CxPar n'étant pas stimulés chez les CIF, mais l'étant chez les CDF, témoignent de leur probable implication dans la phase consommatoire du comportement hétérosexuel du bélier.

L'APO et l'oSDN, chez les béliers, semblent être impliquées dans les deux phases du comportement sexuel. L'APO semble être une importante structure dans le niveau de la motivation sexuelle au même titre que le NPV et le BNSTmed. Concernant le CxEnt, il pourrait fonctionner comme un inhibiteur de la motivation hétérosexuelle.

Toutes les structures analysées sauf l'AMY centrale, le cortex pariétal et le thalamus ventrolatéral sont plus activées chez des CIF que chez les CIM. La plupart de ces structures sont également plus activées chez les MO que chez les CIM mais pour un certain nombre d'entre elles, la différence n'est pas significative, du fait de la variabilité et du faible effectif.

Par contre, il n'y existe aucune différence de densité de cellules Fos-IR entre le groupe MO et CIF.

Il semble que dans le comportement sexuel du bélier les relations entre les structures corticales, hypothalamiques, limbiques et thalamiques sont présentes. Mais les circuits responsables des deux phases (motivationnelle et consommatoire) paraissent être distincts. Par contre, il semble que quel que soit le partenaire sexuel préféré, l'exposition à ce partenaire provoque une activation des mêmes structures cérébrales. Et le niveau d'expression de la motivation sexuel semble avoir des sites spécifiques et bien précis dans l'APO, le NPV et le BNSTmed.