



HAL
open science

Plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs

Marine Siwiaszczyk

► **To cite this version:**

Marine Siwiaszczyk. Plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs. Neurobiologie. Université de Tours (UT), 2022. Français. NNT : . tel-03834670

HAL Id: tel-03834670

<https://hal.science/tel-03834670>

Submitted on 30 Oct 2022

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant
NeuroEthologie du Développement des Comportements SocioEmotionnels

THÈSE présentée par : Marine SIWIASZCZYK

soutenue le : 3 février 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs

THÈSE dirigée par :

Mme. CHAILLOU Élodie
Mr. LOVE Scott

Chargée de recherche HC, HDR, INRAE Centre Val de Loire
Chargé de recherche, INRAE Centre Val de Loire

RAPPORTEURS :

Mr. Cozzi Bruno
Mme. HOUDELIER Cécilia

Full professor, University of Padova
Maitre de conférences, HDR, Université de Rennes 1

JURY :

Mme. CHAILLOU Élodie
Mr. LOVE Scott
Mr. Cozzi Bruno
Mme. HOUDELIER Cécilia
Mr. ANDERSSON Frédéric
Mme. BOIS Évelyne
Mr DESTRIEUX Christophe

Chargée de recherche, HDR, INRAE Centre Val de Loire
Chargé de recherche, INRAE Centre Val de Loire
Full professor, University of Padova
Maitre de conférences, HDR, Université de Rennes 1
Ingénieur de recherche, INSERM, Université de Tours
Maitresse de conférences, Université d'Orléans
Professeur des universités, Praticien Hospitalier, Université de Tours

MEMBRES INVITES :

Mr. MULOT Baptiste
Mr. POUPON CYRIL

Directeur de recherche, Beauval Nature
Directeur de recherche, HDR, CEA NeuroSpin

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'unité mixte de recherche INRAE UMR PRC, Physiologie de la Reproduction et des Comportements à Nouzilly. Ce travail a bénéficié d'un financement de la Région Centre Val de Loire (APR Neuro2Co) et de la fondation Beauval Nature.

Je remercie Matthieu Keller et Florian Guillou pour m'avoir accueillie au sein de leur unité.

Je souhaite remercier Raymond Nowak pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour sa bienveillance et sa disponibilité.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Elodie Chaillou de m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse. Je la remercie pour m'avoir initiée à la joie des sciences participatives qui ont changé ma vision des sciences. Je la remercie également d'avoir partagé ses connaissances avec moi et d'avoir toujours tenté de faire ressortir le meilleur de mes capacités.

Je voudrais également remercier mon autre directeur de thèse Scott Love pour son écoute et son soutien. J'ai beaucoup appris à son contact, sur le plan professionnel et humain.

Je remercie les deux rapporteurs de cette thèse : Bruno Cozzi et Cécilia Houdelier pour l'intérêt porté à mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier les examinateurs : Christophe Destrieux, Frédéric Andersson et Évelyne Bois pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse : Roberto Toro, Katia Heuer, Baptiste Mulot et Cyril Poupon pour les précieux conseils apportés lors de cette réunion (la situation sanitaire n'ayant malheureusement pas permis des rencontres plus nombreuses).

Je remercie Baptiste Mulot pour l'intérêt porté à mes travaux, pour sa disponibilité à répondre à toutes mes questions. Ce fut un honneur de pouvoir discuter à propos de ses innombrables connaissances sur les animaux.

Je souhaite remercier Frédéric Andersson pour les nombreuses heures passées sur les images de cailles et sa patience face à mes nombreuses questions sur le post-traitement des images IRM.

Je voudrais remercier l'UEPEAT qui a fourni les cailles ayant permis la réalisation d'une partie de mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier les bergers de l'UEPAO, Didier Dubreuil, Olivier Lasserre, et tous les autres pour avoir pris soin de mes agneaux, de m'avoir partagé leurs connaissances sur la façon dont on s'occupe des agneaux et d'avoir toujours patiemment répondu à mes questions, même quand j'arrivais paniquée de la Vieille Ferme en pensant avoir un problème.

Je remercie le Laboratoire de phénotypage-endocrinologie, en particulier Anne-Lyse Lainé pour avoir dosé mes échantillons.

Je tiens également à remercier Hans Adriaensen pour m'avoir initié aux acquisitions IRM ainsi que Frédéric Elleboudt, Christian Moussu et Gilles Gomot pour avoir pris soin de mes agneaux lors de leur anesthésie et pour leur bonne humeur.

Je souhaite aussi remercier l'équipe STAR : Pascal Tondereau, Gaël Ramé, Albert Arnould, Jean Noël Couet, Benoit Bouhours d'avoir construit le parc pour mes agneaux malgré tous les problèmes rencontrés, d'avoir été disponibles même à 6h du matin lorsque le courant ne fonctionnait plus à la Vieille Ferme ou encore d'avoir été là au quotidien, que ce soit pour réparer le vélo de l'Unité pour que je puisse aller plus rapidement voir mes agneaux ou changer une poignée pour que je ne reste pas bloquée à la Vieille Ferme.

Je remercie Éric Ravaud, Frédéric Chaumont et Mathieu Charrier pour leur aide et leur disponibilité lors des ateliers Ciboulot. Ce fut enrichissant de partager ensemble ces ateliers.

Je remercie également tous les élèves des ateliers Ciboulot pour leur motivation et leur participation à ces ateliers.

Mes remerciements vont aussi à Ludovic Calandreau pour m'avoir permis de mieux comprendre les cailles japonaises en répondant à toutes mes questions.

Je remercie Raïssa Yebga Hot pour tous les échanges que l'on a pu avoir autour des cailles (pas facile de s'y retrouver avec toutes ces régions et ces fibres !).

Je voudrais également remercier l'équipe NDCS pour son soutien tout au long de ces années de thèse : Frédéric Lévy, voisin de bureau, qui a toujours pris soin de vérifier à travers le mur que j'allais bien, Aline Bertin et Cécile Arnould pour leurs échanges enrichissants, Maryse Meurisse pour sa bienveillance. Je remercie toute l'équipe d'avoir répondu présent lors de la manip MusicLamb, même lorsqu'il fallait nourrir les agneaux à 22h ou 6h du matin.

Je remercie également Céline Parias pour l'aide apportée lors de l'expérience MusicLamb et lors de l'analyse des vidéos de comportement.

Je tiens à remercier Sophie Mary, la « maman » d'INRAE pour sa gentillesse incomparable, son écoute, ses conseils et son aide précieuse pour gérer les ordres de missions et les réservations en tout genre (même lorsqu'on s'y prend en catastrophe à la dernière minute).

Je souhaite remercier Mélody Morisse pour tout ce qu'elle m'a apporté au cours de ces années de thèse. Ce fut un soutien quotidien, une oreille attentive toujours prête à aider, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Nos mois dans le même bureau resteront inoubliables (j'espère que tu continues les 2 minutes de chaise contre le mur même sans moi !) tout comme nos heures passées à segmenter ensemble (avec en fond sonore un blind test sur les cris des animaux). Je remercie également Julie Lemarchand, qui elle aussi, a été d'une aide précieuse, toujours présente de près ou de loin. Je n'oublierai pas nos debriefings en direct de Mariés au premier regard. Merci les filles, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Et surtout : Vive BabyShark !

Je voudrais remercier les doctorantes avec qui j'ai eu le plaisir de partager un bureau : Roberta, qui a fait de notre bureau un sauna et qui m'a fait découvrir l'Italie, Delphine et Camille, la relève, ce fut un bonheur de partager cette fin de thèse avec vous (Bon courage avec Dumdum et profitez bien de Mamour !).

Je remercie également les stagiaires avec qui j'ai eu l'occasion de travailler : Quentin Derian, l'homme qui segmente plus vite que son ombre et sans qui cette thèse n'aurait pas eu le même visage, Guillaume Ubiéma avec petite pensée pour toutes nos galères à la Vieille Ferme, mais aussi Martin Pham et Romain Boyer pour leur aide sur l'analyse des vidéos.

Je souhaite également remercier les stagiaires que j'ai pu croiser, Grégoire, Jules, Cassandre, Térérence, Cloé et tous les autres. Ce fut un plaisir de partager nos repas du midi ensemble, mais aussi des verres en ville, des picnics ou des escape games. Je remercie également Florin pour son sens de l'humour et ses petites piques quotidiennes (malgré mon grand âge, je retiens tout !).

Je tiens à remercier mes deux limougeauds préférés : Éric et Thibault qui m'ont été d'un soutien sans faille. Merci d'être vous, des génies incompris et des personnes incroyables. Je vous remercie pour tous ces weekends ensemble, ces soirées et ces discussions sans fins entrecoupées de blagues nulles et d'expressions berrichonnes.

Je voudrais aussi remercier les copains du Crossfit (David, Eddy, Laiha, Marion, Pixou et tous les autres). Qui aurait cru que je deviendrais une adepte de sport au cours de cette thèse ?! Vous m'avez permis de décompresser, de rire et surtout de progresser (même si nos after abdos et gros bras qui finissent souvent en n'importe quoi !)

Merci à ma famille pour son soutien sans faille. Une pensée particulière pour mes parents et pour les heures passées au téléphone à m'écouter vous raconter ma thèse, bien que vous n'y compreniez pas grand-chose. Vous m'avez toujours encouragée à suivre la voie qui me plaisait, je vous en serais toujours reconnaissante. J'espère vous rendre fiers.

J'adresse un remerciement particulier à Mathieu, mon pilier, grâce à qui j'ai gardé les pieds sur terre. Merci d'avoir été le tampon entre la thèse et le monde extérieur, d'avoir supporté

ces longues heures à m'attendre parce que j'avais toujours du travail à faire, d'avoir toujours eu confiance en moi et de me pousser à dépasser mes limites encore et toujours.

Résumé

Les comportements adaptatifs sont définis comme l'ensemble des réactions comportementales et physiologiques à un évènement particulier issu de l'environnement externe ou interne. Les comportements adaptatifs ont été étudiés à l'échelle des espèces mais aussi à l'échelle des individus ce qui a permis de montrer que ces comportements sont impactés par la sélection génétique, l'expérience précoce et la phylogénie. Pour comprendre les modifications engendrées par ces différents facteurs, il est nécessaire d'étudier le cerveau qui est le siège de ces comportements, notre hypothèse étant que les comportements adaptatifs sont liés à une organisation spécifique de l'encéphale. Dans le but d'étudier l'ensemble des substrats neurobiologiques des comportements adaptatifs, il est indispensable de considérer les régions cérébrales impliquées dans la perception de l'environnement, les émotions et les comportements sociaux. Pour étudier l'ensemble de ces régions, nous avons utilisé l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) qui est la méthode la plus appropriée pour étudier l'encéphale dans sa globalité et mener une approche comparative. Au cours de ma thèse, une étude en IRM de la morphologie des structures relatives aux processus sensoriels (olfactifs, auditifs,...) et aux processus socio-émotionnels (amygdale, hippocampe, substance grise périaqueducule, ...) a donc été menée afin de tester les hypothèses concernant la sélection génétique, l'expérience précoce et la phylogénie. Pour tester l'hypothèse de la sélection génétique, nous avons utilisé deux lignées de caille japonaise, STI (Short Tonic Immobility) et LTI (Long Tonic Immobility), sélectionnées sur leur durée d'immobilité tonique, comportement adaptatif traduisant l'émotivité des individus. Nous avons montré que la sélection génétique influence la morphologie de régions cérébrales impliquées dans les processus émotionnels mais aussi sensoriels. Pour tester l'hypothèse de l'expérience précoce, nous avons étudié l'influence de l'exposition précoce à la musique en tant qu'enrichissement du milieu pour des agneaux en allaitement artificiel pour lesquels nous savons que les comportements adaptatifs sont altérés. Nous avons mis en évidence que cette expérience modifie le profil d'activité (notamment la réactivité émotionnelle), l'axe endocrinien et la morphologie cérébrale de certaines structures telles que le noyau caudé. Pour tester l'hypothèse de la phylogénie, une étude de biologie comparée a été menée sur différentes espèces sauvages (cerf-souris, maki catta, otarie...) au cours de laquelle nous avons décrit les spécificités morphologiques des structures cérébrales connues pour être impliquées dans les comportements adaptatifs.

Ce travail de thèse montre donc l'implication de la sélection génétique, de l'expérience précoce mais aussi de la phylogénie dans la plasticité anatomique des régions associées aux comportements adaptatifs chez différentes espèces animales.

Mots-clés : caille, ovin, cerveau, IRM, comportement

Abstract

Adaptive behaviors are defined as the set of behavioral and physiological reactions to a particular event arising from the external or internal environment. These adaptive behaviors have been studied at the species level but also at the level of the individual, showing that these behaviors are impacted by genetic selection, early experience and phylogeny. To understand the changes caused by these different factors, we need to study the brain, which is the seat of these behaviors, our hypothesis being that adaptive behaviors are linked to a specific organization of the brain. In order to study all the neurobiological substrates of adaptive behavior, it is essential to consider the brain regions involved in the perception of the environment, emotions and social behavior. To study all of these regions, we used Magnetic Resonance Imaging (MRI) which is the most suitable method to study the whole brain and to conduct a comparative study. During my thesis, I conducted an MRI study of the morphology of structures relating to sensory (olfactory, auditory, etc.) and socio-emotional processes (amygdala, hippocampus, periaqueductal gray matter, etc.). To test the genetic selection hypothesis, we used two lines of Japanese quail, STI (Short Tonic Immobility) and LTI (Long Tonic Immobility), selected on their duration of tonic immobility, an adaptive behavior reflecting the emotionality of individuals. We found that genetic selection influences the morphology of brain regions involved in emotional but also sensory processes. To test the early experience hypothesis, we investigated the influence of early exposure to music as an environmental enrichment for lambs reared under mother-deprivation and with milk replacement, for which we know adaptive behaviors are altered. We have shown that this experience modifies their activity profile (especially emotional reactivity), the endocrine axis and the cerebral morphology of structures such as the caudate nucleus. To test the phylogenetic hypothesis, a comparative biology study was carried out on different wild species (deer mouse, cat-tailed lions, sea lions, etc.) during which we described the morphological specificities of brain structures known to be involved in adaptive behaviors.

This thesis work shows, in different animal species, the involvement of genetic selection, early experience but also phylogeny in the anatomical plasticity of regions associated with adaptive behaviors.

Keywords: quail, sheep, brain, MRI, behavior

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	7
Abstract.....	9
Table des matières	10
Liste des abréviations	13
Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Avant-propos.....	21
Introduction générale	23
Régions cérébrales impliquées dans les comportements adaptatifs	30
I. Régions impliquées dans les processus sensoriels.....	31
1. Régions impliquées dans les processus visuels.....	31
2. Régions impliquées dans les processus auditifs	32
3. Régions impliquées dans les processus olfactifs	33
II. Régions impliquées dans les processus socio-émotionnels	33
1. Régions participant à l'intégration et au traitement de l'information émotionnelle :.....	33
2. Régions participant à l'expression des réponses émotionnelles :	35
Imagerie par Résonance Magnétique.....	36
I. Généralités :.....	37
II. Fonctionnement de l'IRM :	37
III. Utilisation de l'IRM pour étudier le cerveau	40
1. Étude de la morphologie de régions cérébrales par IRM :	40
2. Étude de la connectivité entre les régions cérébrales par IRM de diffusion :.....	40
IV. Médiation scientifique : Comprendre les champs électromagnétiques pour s'initier à l'IRM.....	42

Hypothèse génétique : les cailles japonaises STI et LTI	50
I. La caille japonaise, un modèle d'intérêt pour l'étude de la sélection génétique :	52
1. Généralités :	52
2. Intérêt de la caille japonaise comme modèle expérimental :	53
a. Lignées LSR / HSR :	53
b. Lignées LS / HS :	53
c. Lignées STI / LTI :	53
3. Objectif de l'étude :	54
II. Selection of high-trait emotivity affects the volume of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails	55
1. Résumé de l'article	55
2. Selection of high-trait emotivity affects the volume of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails	56
III. Médiation scientifique : Comprendre et modéliser le comportement des lignées STI et LTI	90
1. Modéliser le comportement des lignées de caille à l'aide de robots	90
2. Segmentation des images IRM par les élèves de l'atelier Ciboulot	90
Hypothèse de l'environnement précoce : le modèle ovin	97
I. Le mouton, un modèle d'intérêt pour l'étude de l'environnement précoce :	99
1. Généralités	99
2. Écologie comportementale	99
3. La race Ile de France	100
4. Conditions d'élevage et expérience précoce :	100
a. Agneaux en allaitement maternel :	100
b. Agneaux en allaitement artificiel :	101
5. Comment contrecarrer les effets de l'allaitement artificiel ?	102
6. Objectif de l'étude :	103
II. Stimulation auditive chez les animaux	104
1. The use and impact of auditory stimulations in animals	104
2. Talking sheep – "Bah, Bah"	136
III. Impact de la musique sur les agneaux élevés en allaitement artificiel	144
1. Résumé de l'article	144
2. Impact of classical music on emotional reactivity and brain morphology of lambs bred by mother-deprivation with milk replacement	146
Hypothèse phylogénie : les animaux sauvages	187
I. Les animaux de la faune sauvage, un modèle d'intérêt pour l'étude de la phylogénie	188
1. Caractéristiques générales des spécimens	189
II. Méthodologie	194

1.	<i>Pièces anatomiques</i>	194
2.	<i>Acquisitions IRM</i>	194
a.	<i>Encéphale</i>	195
b.	<i>Régions d'intérêt</i>	195
III.	Résultats	196
1.	<i>Caractéristiques morphologiques des spécimens</i>	196
2.	<i>Morphologie des régions d'intérêt</i>	197
IV.	Améliorations de la préparation des pièces anatomiques	204
1.	<i>Gestion des prélèvements</i>	204
2.	<i>Préparation des pièces pour acquisition :</i>	205
V.	Perspectives	205
	Discussion – Conclusion générale	207
	Références bibliographiques	211

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ASL : Arterial Spin Labeling

BNST : Bed Nucleus of the Stria Terminalis (lit du noyau de la strie terminale)

BOLD : Blood Oxygenation Level Dependent

CA : Commissure Antérieure

CCCR : Communauté de Communes du Castel-Renaudais

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

CP : Commissure Postérieure

EEG : Électroencéphalogramme

FA : Fraction d'Anisotropie

HAB : High Anxiety-related Behavior

HPA : Hypothalamo-Pituitary-Adrenal axis

HS : High Stress

HSR : High Social Reinstatement behavior

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

IRMd : Imagerie par Résonance Magnétique de diffusion

IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

LAB : Low Anxiety-related Behavior

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LIFAT : Laboratoire d'Informatique Fondamentale et Appliquée de Tours

LS : Low Stress

LSR : Low Social Reinstatement behavior

LTI : Long Tonic Immobility

MPLS : Maison Pour La Science

PAG : PeriAqueductal Grey (Substance grise périaqueducule)

PIXANIM : Phénotypage et Imagerie in/eX vivo de l'ANImal à la Molécule

PRC : Physiologie de la Reproduction et des Comportements

RF : Radiofréquence

SE : Spin Echo

STI : Short Tonic Immobility

TE : Temps d'Écho

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TR : Temps de Résonance

UMR : Unité Mixte de Recherche

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau représentant les temps de relaxation T_1 et T_2 (en ms) pour différents tissus cérébraux dans une IRM 1,5 Tesla. Issu de (Houdé et al., 2002).	40
Tableau 2 : Tableau indiquant les différentes caractéristiques des spécimens étudiés : âge, poids corporel, poids et volume de l'encéphale.....	196
Tableau 3 : Récapitulatif du volume de l'encéphale, de la PAG, du noyau caudé ainsi que du pourcentage du volume de la PAG et du noyau caudé en fonction du volume de l'encéphale pour chaque espèce	204

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du circuit neuronal des émotions d'après (LeDoux, 2000; Rolls, 2000), issue de (Menant et al., 2016). V1-V2-V3, aires corticales visuelles ; NTS, noyau du tractus solitaire ; Cf, cortex frontal ; Amy, amygdale ; HIPP, hippocampe ; NPV, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; NVM, noyau ventromédian de l'hypothalamus ;LH, aire latérale hypothalamique ; PAG, substance grise périaqueducale.	28
Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une acquisition en IRM anatomique. Source : CEA	38
<i>Figure 3 : Images IRM de cerveau de mouton, pondérée en T1 (à gauche) et en T2 (à droite), acquisition réalisée à Pixanim sur un scanner IRM Siemens Magnetom Verio® scanner (Erlangen, Allemagne) à 3 Tesla</i>	<i>39</i>
Figure 4 : Une image IRM d'un cerveau est présentée à côté d'une coupe histologique....	42
Figure 5 : Formation de lignes de champs à l'aide de limaille de fer et d'un aimant.....	43
Figure 6 : Fabrication d'un champ électromagnétique à l'aide d'une bobine constituée d'un fil de cuivre enroulé autour d'un bouchon de liège, de fils électriques et d'une pile de 9V.	43
Figure 7 : Les collégiens de l'atelier Ciboulot échangent avec un spécialiste de l'IRM.....	44
Figure 8 : Exemple d'une expérience permettant de comprendre le principe de diffusion à l'aide d'un bécher rempli d'eau et de colorants.....	44
Figure 9 : Photo d'une caille japonaise (<i>Coturnix japonica</i>)	52
Figure 10 : Photos d'agneaux élevés avec leur mère.....	100
Figure 11 : Photo d'agneaux âgés de 3 jours en allaitement artificiel.....	101
Figure 12 : Photo d'un groupe de sitatungas prise au ZooParc de Beauval (Saint Aignan, France)	189
Figure 13 : Photo d'un bongo (<i>Traglaphus eurycerus</i>)	190
Figure 14 : Photo d'un cerf souris (<i>Tragulus javanicus</i>) prise au ZooParc de Beauval (Saint-Aignan, France).....	191
Figure 15 : Photo d'un cerf souris se toilettant (ZooParc de Beauval).....	191
Figure 16 : Photo d'un maki catta (<i>Lemur catta</i>).....	192
Figure 17 : Photo d'un jaguar (<i>Panthera onca</i>)	192
Figure 18 : Photo d'un tigre (<i>Panthera tigris</i>)	193

Figure 19 : Photo d'un groupe d'otaries de Californie (<i>Zalophus californianus</i>).....	193
Figure 20 : Répartition des différentes espèces animales en fonction du poids de leur encéphale et de leur poids corporel.....	196
Figure 21 : Répartition des différentes espèces animales en fonction du volume (mm ³) et du poids (kg) de leur encéphale	197
Figure 22 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de bongo superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 7 Tesla à NeuroSpin.....	198
Figure 23 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de cerf souris superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin.	199
Figure 24 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de jaguar juvénile superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin	200
Figure 25 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de maki catta superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin	201
Figure 26 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale d'otarie superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 7 Tesla à NeuroSpin.....	202
Figure 27 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de tigre superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin.....	203

Liste des publications

1. Uses and impacts of auditory stimulation in animals, Guillaume Ubiéma*, **Marine Siwiaszczyk***, Céline Parias Roman Bresso, Christophe Hay, Baptiste Mulo, Scott Love# and Elodie Chaillou# (co-première auteur), Journal of Interdisciplinary methodologies and issues in science (en revision)
2. Selection of high-trait emotivity affects the morphology of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails, **Marine Siwiaszczyk***, Raïssa Yebga Hot*, Mélody Morisse, Ludovic Calandreau, David Barrière, Justine Beaujoin, Baptiste Mulo, Frédéric Andersson, Cyril Poupon, Scott A. Love, Elodie Chaillou (co- premier auteur), Brain structure and function (soumis)
3. Talking sheep – “Bah, Bah”, **Marine Siwiaszczyk**, Scott A. Love, Elodie Chaillou (première auteure), Frontiers for young minds (soumis)
4. A novel male Japanese quail structural connectivity atlas using ultra-high field diffusion MRI at 11.7T, R. Yebga Hot*, **M. Siwiaszczyk***, S.A. Love, F. Andersson, L. Calandreau, F. Poupon, J. Beaujoin, B. Herlin, F. Boumezbeur, B. Mulo, E. Chaillou, I. Uszynski, C. Poupon, (co-première auteur), Brain structure and function (en révision)

Liste des communications

31^e colloque Biotechnocentre : Impact de la sélection d'un comportement de peur sur l'anatomie de l'encéphale de caille. Utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) *ex vivo*. **Siwiaszczyk, M.**, Yebga Hot, R., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 11-12 Octobre 2018, Seillac, France (Poster)

ISMRM 27th Annual Meeting : A novel 11.7T ultra-high field dMRI connectivity atlas of the Japanese quail. **Yebga Hot, R.**, Siwiaszczyk, M., Beaujoin, J., Barrière, D.A., Uszynski, I., Love, S.A., Calandreau, L., Mulot, B., Chaillou, E., Poupon, C. 11-16 Mai 2019, Montréal, QC, Canada (Communication orale)

24^{ème} Journée Thésards, Physiologie de la Reproduction et des Comportements : Création d'un atlas IRM de l'encéphale de caille japonaise. **Siwiaszczyk, M.**, Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 6 Juin 2019, Nouzilly, France (Communication orale)

2019 OHBM Annual Meeting : A novel 11.7T ultra-high field diffusion MRI structural connectivity atlas of the Japanese quail. **Yebga Hot, R.**, Siwiaszczyk, M., Beaujoin, J., Barrière, D.A., Uszynski, I., Love, S.A., Calandreau, L., Mulot, B., Chaillou, E., Poupon, C. 9-13 Juin 2019, Rome, Italie (Poster)

2019 School on Brain Connectomics : A comparative investigation of the plasticity of the socio-emotional behavior connectome, **Siwiaszczyk, M.**, Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 24 septembre 2019, Vérone, Italie (Communication orale)

32^e colloque Biotechnocentre : Premier atlas IRM de l'encéphale de caille japonaise pour l'étude des connexions cérébrales de deux lignées divergentes STI et LTI. **Siwiaszczyk, M.**, Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 10-11 octobre 2019, Seillac, France (Poster)

Forum CCSTI : Atelier Ciboulot – Sciences participatives, Siwiaszczyk, M., Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Nowak, R., Lévy, F., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 29 janvier 2020, Orléans, France (Communication orale invitée, table ronde)

Journée scientifique en neurosciences : Facteurs influençant la neurobiologie des comportements socio-émotionnels, Siwiaszczyk, M., Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 2 décembre 2020, Tours, France (Communication orale)

25^{ème} journée thésards de l'unité PRC : Impact de la musique sur le développement des agneaux élevés en allaitement artificiel, Siwiaszczyk, M., Parias, C., Morisse, M., Lainé, A.L., Lasserre, O., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 16 juin 2021, Nouzilly, France (Communication orale)

Journée scientifique de la SFR FED 4226 « Neuroimagerie Fonctionnelle) : Comment l'émotivité affecte-t-elle la morphologie de régions cérébrales impliquées dans les fonctions sensorielles et dans le traitement des émotions chez des caillies japonaises mâles ? Siwiaszczyk, M., Yebga Hot, R., Morisse, M., Poupon, C., Calandreau, L., Mulot, B., Love, S.A., Chaillou, E. 14 octobre 2021, Tours, France (Communication orale)

Avant-propos

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet Neuro2Co (**N**euro**b**io**l**ogie des **C**omportements des animaux, démarche de sciences participatives au Collège), financé par la Région Centre Val de Loire et la fondation Beauval Nature. Ce travail a été mené à l'unité mixte de recherche Physiologie de la Reproduction et des Comportements (UMR PRC, INRAE) en collaboration avec NeuroSpin (CEA), l'unité iBrain (INSERM), le LIFAT (Université de Tours), la communauté de communes du Castel-Renaudais (CCCR), Centre•Sciences et la Maison Pour La Science (MPLS Val de Loire).

Ce projet intègre une démarche de sciences participatives telles qu'elles sont définies par la Charte des sciences participatives en France : « Les sciences et recherches participatives sont des formes de production de connaissances scientifiques auxquelles participent des acteurs de la société civile, à titre individuel ou collectif, de façon active et délibérée » (INRAE, 2017). D'autres actions s'inscrivent dans les sciences participatives, telles qu'elles sont proposées dans le livre blanc (Alliss, 2017) dès lors qu'elles font intervenir le grand public :

- Médiation scientifique (Ex : Semaine du cerveau, Fête de la science etc...)
- Collecte de données (Ex : projet CiTIQUE, <https://www.citique.fr>)
- Projets co-construits, co-réalisés, co-analysés et co-valorisés (Ex : projet 3L, Living Lab Lapin, <https://www.inrae.fr/actualites/living-lab-lapins-projet-innovant-bien-etre-animal>).

Parmi ce large panel d'actions, j'ai mené des actions de médiation et de culture scientifiques, un travail de collecte et d'analyse de données, et la valorisation de pratiques innovantes, avec un public non scientifique tout au long de mon projet doctoral. Ces actions ont été principalement réalisées au sein du collège André Bauchant de Château-Renault (Indre-et-Loire, 37), invité à rejoindre le projet Neuro2Co par la CCCR en mai 2017. Sous l'impulsion de trois professeurs du collège (Mathieu Charrier, sciences de la vie et de la terre ; Frédéric Charron, sciences physique et chimie ; Eric Ravaud, technologie) et le soutien de la direction de l'établissement, un atelier scientifique a été créé en septembre 2017. L'atelier était hebdomadaire et concernait un maximum de 16 élèves recrutés à la fin de l'année précédente sur la base d'une demande motivée, d'un engagement à l'année et sans exigence de niveau scolaire. Dans ces conditions, les ateliers ont réuni des élèves de la 5^{ème} à la 3^{ème} avec pour

objectifs de les familiariser aux neurosciences du comportement des animaux en leur proposant des mini-conférences, des mises en pratique, des visites de laboratoire et la participation au travail de recherche. Mon implication dans ces ateliers s'est faite dès mon recrutement en mai 2018, d'abord comme co-animatrice puis comme co-organisatrice.

La démarche de sciences participatives a, ainsi, concerné les différentes questions de recherche abordées lors de mon projet doctoral et a fait l'objet de valorisations (<https://www.echosciences-centre-valde Loire.fr/communautes/un-cerveau-dans-toutes-les-tetes>) qui seront présentées au même titre que les articles de recherche.

Introduction générale

Au fil des époques et des études, plusieurs définitions des émotions ont été proposées (Bindra, 1970; Leventhal & Patrick-Miller, 2000; Zelena et al., 2018). Pour Darwin, l'émotion est une réaction à un événement particulier qui existe chez toutes les espèces dont l'expression comportementale est conservée au cours de l'évolution. Il considère les émotions comme un processus adaptatif évolutif (Darwin, 1872). L'émotion est aussi définie comme un processus mental qui provoque une réponse affective et fugace de l'organisme en réponse à un événement particulier (Kirouac, 2004). Cet événement peut être d'origine externe, interne ou mnésique (Serratrice, 2005). Dans l'étude des émotions il est nécessaire de distinguer le ressenti émotionnel et la réponse émotionnelle ; ce qui a conduit à définir les émotions au travers de trois composantes : l'expérience subjective (capacité de décrire, d'identifier et/ou de nommer l'émotion ressentie), l'expression communicative (réaction ou réponse comportementale visible compréhensible par les autres) et les modifications physiologiques (endocriniennes et/ou neurovégétatives) (Dantzer, 2002). Par ailleurs, plusieurs théories ont cherché à modéliser la genèse des émotions (Zelena et al., 2018), l'appraisal theory, ou théorie de l'évaluation, étant la plus adaptée à l'étude des émotions des animaux (Boissy et al., 2007), en particulier pour étudier le rôle du système nerveux central, siège des émotions (Menant et al., 2016; Zelena et al., 2018). Dans ce contexte, les émotions et leurs corrélats neurobiologiques sont étudiés à travers tout le règne animal, et sont vus comme des processus adaptatifs qui ont permis aux différentes espèces d'évoluer et de s'adapter à des écosystèmes différents (Anderson & Adolphs, 2014).

Du point de vue de l'écologie comportementale, les espèces animales peuvent se distinguer selon que les processus adaptatifs concernent les comportements mis en œuvre pour l'accès à la nourriture (herbivores, prédateurs, charognards...), pour l'occupation du territoire (territoriaux, sédentaires...) et pour la vie en groupe (grégaire, monogame...). A ces caractéristiques d'espèces, il faut aussi prendre en compte le niveau d'autonomie du petit à la naissance qui est étroitement lié aux comportements précédemment cités. Par exemple, les espèces nidicoles donnent naissance à des petits immatures qui vivent en nid (caille japonaise, souris, etc...) à l'opposé des espèces nidifuges qui donnent naissance à des petits plus matures, capables de se déplacer (mouton, cheval, chien etc...). L'ensemble de ces processus adaptatifs a été questionné par les neurosciences afin d'identifier ou de

comprendre la spécificité de l'encéphale humain (Herculano-Houzel, 2011; Toro et al., 2008) et constitue l'hypothèse phylogénique (Tendler et al., 2021).

Les processus adaptatifs, tels que présentés ci-dessus, se sont également traduits à l'échelle des individus d'une même espèce. Par exemple, face à un prédateur, un individu peut fuir, « faire le mort » ou l'affronter. Ces trois expressions comportementales se retrouvent au travers de l'évolution dans la plupart des espèces animales, elles sont propres à chaque individu et traduisent des stratégies d'adaptation comportementale¹ différentes. Ces dernières dépendent aussi de l'environnement externe et de l'environnement interne. Les éléments de l'environnement externe sont par exemple les facteurs sociaux comme la taille du groupe, l'habitat en tenant compte des risques de prédation ou encore la photopériode. Les éléments relatifs à l'environnement interne sont liés par exemple aux statuts physiologiques tels que la gestation ou la lactation. Les stratégies d'adaptation comportementale tiennent également compte de la personnalité de l'individu (Dingemans et al., 2010). La personnalité (aussi connue sous le terme de tempérament) correspond à l'ensemble des tendances comportementales affectant les réactions dans des contextes différents, elle est propre à chacun et est cohérente au cours du temps (Biro & Stamps, 2008). Elle comporte cinq types de traits différents : l'activité, la timidité ou l'audace (en situation de risque), l'exploration (en situation de nouveauté), l'agressivité et la sociabilité (Biro & Stamps, 2008). Dans ce cadre conceptuel, en reprenant l'exemple des réponses comportementales exprimées face à un prédateur, les auteurs ont défini la stratégie d'adaptation comportementale passive, l'individu réagit en « faisant le mort », et la stratégie d'adaptation comportementale active, l'individu réagit en affrontant le danger ou en prenant la fuite (Bandler et al., 2000). D'un point de vue expérimentale, plusieurs auteurs ont cherché à caractériser ces deux stratégies d'adaptation comportementales en considérant des composantes physiologiques telles que les réponses endocriniennes et neurovégétatives (Bandler et al., 2000; Koolhaas et al., 1999). Il a été montré que la stratégie d'adaptation comportementale active est associée à une faible activité et réactivité de l'axe HPA (Axe Hypothalamo-hypophysio-surrénalien), une excitation du système sympathique (hypertension et tachycardie) (Bandler et al., 2000), une faible réactivité du système parasympathique et un haut niveau de testostérone (Koolhaas et al., 1999). Au contraire, la

¹ *En anglais, les auteurs parlent de coping style que nous avons traduit par stratégies d'adaptation comportementale.*

stratégie d'adaptation comportementale passive est associée à une forte réactivité de l'axe HPA, une faible réactivité de l'axe sympathique (hypotension, bradycardie) (Bandler et al., 2000), une forte réactivité de l'axe parasympathique et un faible niveau de testostérone (Koolhaas et al., 1999). Dans ce contexte, Koolhaas a proposé de définir les comportements adaptatifs comme l'ensemble des réactions comportementales et physiologiques en réponse à un stimulus aversif de l'environnement (Koolhaas et al., 1999). C'est cette définition des comportements adaptatifs que nous avons retenue en considérant aussi la valence positive de l'environnement.

Les comportements adaptatifs jouent donc un rôle majeur dans l'adaptation des espèces et des individus à leur environnement (Biro & Stamps, 2008; Dingemanse et al., 2010; Réale et al., 2007). En élevage, qu'il s'agisse des productions animales à des fins alimentaires, des animaux de compagnie, ou des animaux de travail (activités de transport, travaux agricoles, animaux guides...), l'être humain a cherché à sélectionner des comportements adaptatifs répondant aux attentes des différents types d'utilisation. Ainsi en élevage agricole, des programmes de sélection génétique ont été développés aussi bien pour les mammifères, les poissons que les volailles (Canario et al., 2013). Cela concerne les réponses comportementales à la fois aux facteurs de stress aigus et chroniques dans l'environnement physique (alimentation, température...) mais également dans l'environnement social (autres membres du groupe, progéniture, êtres humains) (Canario et al., 2013). Pour répondre à ces problématiques, les animaux sont sélectionnés pour leur faible sensibilité au stress, pour leur forte sociabilité, pour leur forte capacité de reproduction ou encore pour leur forte capacité à être maternel (Mignon-Grasteau et al., 2005). Dans le domaine de la recherche, des sélections génétiques sont également réalisées sur différentes espèces telles que le rat. C'est le cas des deux lignées de rat, HAB (High Anxiety-related Behavior) et LAB (Low Anxiety-related Behavior), qui ont été sélectionnées sur la base de leurs stratégies d'adaptation comportementale lors du test du labyrinthe en croix surélevé. Les rats de la lignée HAB passent moins de temps dans les bras ouverts que les rats de la lignée LAB (Pellow et al., 1985). Ces lignées diffèrent sur d'autres paramètres tels que la locomotion (les rats HAB étant moins actifs que les rats LAB) (Wigger et al., 2001) ou l'activation de l'axe HPA (l'axe HPA des rats HAB étant hyper-réactif comparé à celui des rats LAB) (Landgraf et al., 1999). Ainsi, les comportements adaptatifs et systèmes neurobiologiques associés peuvent être modifiés par la sélection génétique.

A l'instar des facteurs génétiques, il ne faut pas négliger l'impact de l'environnement, en particulier l'expérience précoce. Par exemple, chez l'Homme, de nombreuses études ont été menées pour comprendre l'impact de l'allaitement maternel par rapport à un allaitement avec du lait artificiel. Il a été montré que l'allaitement maternel entraîne une amélioration des capacités cognitives par rapport à un allaitement artificiel (Deoni et al., 2018), impacte la maturation de la substance blanche (Deoni et al., 2013) et influence le bon développement du système immunitaire des enfants (Schack-Nielsen & Michaelsen, 2007). Des recherches ont également été menées sur l'environnement familial. Il a été montré, chez l'Homme et le primate non humain, que la qualité des soins maternels est importante, surtout pour le développement des caractéristiques sociales (Pryce, 1994). De plus, chez les primates non humains, des études ont montré que le manque de soins maternels peut entraîner de l'anxiété, augmenter les comportements agressifs lors de la puberté ou encore perturber les comportements maternels (Suomi, 1997). De manière générale, le manque de soins maternels à la naissance ou lors du développement entraîne des troubles comportementaux (lors de la reproduction notamment), de l'agressivité mais aussi des stéréotypies (Latham & Mason, 2008), ce qui influence de manière plus générale les comportements adaptatifs. Ces différents exemples montrent que les comportements adaptatifs et systèmes neurobiologiques associés peuvent être modifiés par l'expérience précoce.

L'idée principale à retenir à ce stade de l'introduction générale, est que les comportements adaptatifs peuvent être étudiés au travers de trois prismes que sont l'évolution (*hypothèse phylogénie*), la sélection génétique et l'expérience précoce. Comme nous l'avons vu précédemment, les comportements adaptatifs rassemblent l'ensemble des comportements qui caractérisent une espèce du point de vue de l'écologie comportementale, à savoir l'accès à la nourriture, l'occupation d'un territoire et la vie en groupe. A l'échelle de l'individu, nous avons illustré que ces comportements adaptatifs s'apparentent aussi à l'ensemble des composantes qui caractérisent l'état émotionnel. Dans ces conditions, pour étudier l'ensemble des substrats neurobiologiques des comportements adaptatifs, il est indispensable de considérer les structures cérébrales selon qu'elles sont impliquées dans la perception de l'environnement (externe ou interne), dans les émotions (réponses comportementales, endocriniennes ou neurovégétatives) et dans les comportements sociaux. Ainsi quelle que soit l'hypothèse considérée, phylogénie, génétique ou concernant

l'expérience précoce, je me suis intéressée au cours de ma thèse, à la plasticité anatomique des structures relatives aux processus sensoriels (olfactif, auditif...) et aux processus socio-émotionnels (amygdale, hippocampe, substance grise périaqueducale) (Bandler et al., 2000; Menant et al., 2016; Nowak et al., 2016; Zelena et al., 2018) (Figure 1).

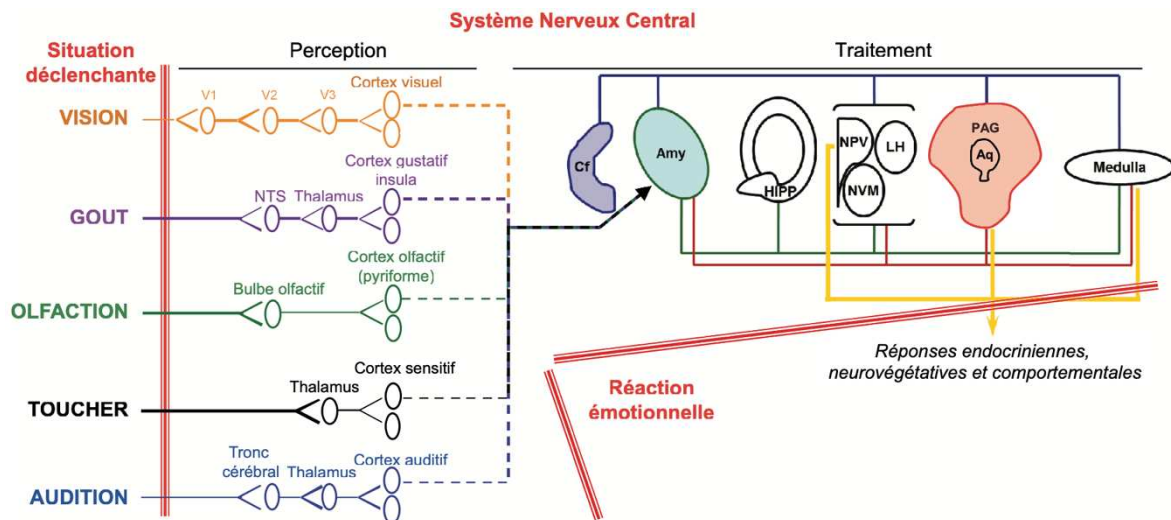


Figure 1 : Représentation schématique du circuit neuronal des émotions d'après (LeDoux, 2000; Rolls, 2000), issue de (Menant et al., 2016). V1-V2-V3, aires corticales visuelles ; NTS, noyau du tractus solitaire ; Cf, cortex frontal ; Amy, amygdale ; HIPP, hippocampe ; NPV, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; NVM, noyau ventromédian de l'hypothalamus ; LH, aire latérale hypothalamique ; PAG, substance grise périaqueducale.

L'étude d'un système neuronal consiste à explorer les acteurs neurobiologiques qui le composent comme les structures cérébrales mais aussi les neuropeptides et les neuromédiateurs voire les différents types cellulaires. Différentes approches ont été développées pour explorer les différents acteurs neurobiologiques, certaines permettant aussi d'étudier la dynamique des systèmes qu'ils composent. Pendant de nombreuses années, la technique majoritairement utilisée était l'histologie ou plus précisément, l'immunohistochimie. Cette technique permet d'étudier l'organisation cellulaire des régions cérébrales (types cellulaires, nombre de cellules). Elle permet également d'étudier les connexions entre différentes régions cérébrales grâce au traçage de voie (Menant et al., 2018). Cependant, cette méthode pose différents problèmes. D'un point de vue éthique, cette technique impose l'euthanasie des animaux puisqu'elle est réalisée sur tissu. Limite d'autant plus importante pour l'étude de phénomènes dynamiques qui impose d'euthanasier des individus à différents moments du processus développemental. Par ailleurs, cette technique doit être adaptée à chaque espèce animale (les anticorps utilisés en immunohistochimie ne sont pas disponibles pour toutes les espèces par exemple), elle est peu adaptée à l'étude de l'encéphale dans sa globalité compte tenu de son caractère chronophage, notamment pour

les grands animaux, et manque de répétabilité malgré les efforts de standardisation des protocoles. Des techniques *in vivo* se sont ensuite développées pour imager le cerveau (Berridge, 2003). Elles permettent notamment d'étudier le métabolisme et/ou l'activité des structures cérébrales : la TEP (Tomographie à Émission de Positrons), l'EEG (Electro-EncéphaloGraphie) ou encore l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Par exemple, l'activité cérébrale peut être mesurée par IRM fonctionnelle (IRMf), TEMP ou TEP. Si la TEMP et la TEP permettent d'étudier l'encéphale dans sa globalité et de cibler spécifiquement des acteurs biochimiques (métabolisme du glucose, système dopaminergique), elles nécessitent d'être adossées à des techniques d'imagerie anatomique pour identifier les zones activées. De plus ces techniques, pour cibler les acteurs biochimiques, nécessitent l'injection de traceurs radioactifs dont l'usage est très limité chez les animaux de grande taille pour des raisons de radioprotection (locaux spécifiques pour les animaux injectés, circuits de collectes des milieux biologiques contaminés (urine, fèces), gestion des déchets, productions des molécules marquées à proximité des imageurs...). Dans ce contexte, l'IRM est le meilleur compromis puisqu'elle permet d'étudier l'encéphale dans sa globalité, d'explorer la plasticité anatomique des structures cérébrales (IRM anatomiques) et de leurs connexions (IRM de diffusion), et d'explorer l'activité cérébrale (IRM fonctionnelle : BOLD, ASL...) (Chaillou et al., 2012). Par ailleurs, selon les caractéristiques du scanner IRM utilisé, le niveau d'investigation de la plasticité anatomique peut se faire à l'échelle macroscopique (évaluation des volumes des structures cérébrales) jusqu'à l'échelle microscopique (évaluation des diamètres axonaux, (Assaf et al., 2013). Dans le cadre de mon projet doctoral, nous avons donc choisi l'IRM quelle que soit l'hypothèse testée (génétique, expérience précoce ou phylogénie) en adaptant les conditions d'acquisition à chaque modèle animal, pour évaluer la plasticité anatomique.

Avant de décrire les travaux réalisés au cours de ma thèse, un rappel des connaissances relatives aux régions cérébrales impliquées dans les comportements adaptatifs sera réalisé et une brève description de l'IRM sera présentée. Après ce rappel de bases de connaissances communes à l'ensemble des travaux que j'ai menés, je présenterai les travaux relatifs à chacun des modèles originaux étudiés : le modèle génétique de la caille japonaise, le modèle de l'expérience précoce de l'agneau élevé en allaitement artificiel, et le modèle de la phylogénie.

Régions cérébrales impliquées dans les comportements adaptatifs

Les comportements adaptatifs rassemblent l'ensemble des comportements qui caractérisent une espèce du point de vue de l'écologie comportementale (accès à la nourriture, occupation d'un territoire et vie en groupe). Ces comportements adaptatifs existent aussi à l'échelle de l'individu : ils s'apparentent à l'ensemble des composantes qui caractérisent l'état émotionnel. De fait, pour étudier ces comportements adaptatifs, il est indispensable d'étudier les structures cérébrales impliquées dans la perception de l'environnement (externe ou interne), dans les émotions (réponses comportementales, endocriniennes ou neurovégétatives) et dans les comportements sociaux.

I. Régions impliquées dans les processus sensoriels

Chez les animaux d'élevage, les régions cérébrales impliquées dans les processus sensoriels sont essentiellement étudiées dans le cadre des relations sociales (reconnaissance entre individus par exemple) et de la reconnaissance de l'environnement physique (préférences alimentaires).

1. Régions impliquées dans les processus visuels

Chez les oiseaux, la vue joue un rôle important notamment en ce qui concerne la nourriture. En effet, les rapaces ont une excellente résolution spatiale (Mitkus et al., 2018) ce qui leur permet de voir de loin une petite proie. Chez la caille japonaise, il a été montré que la perception des couleurs est dominante par rapport à la perception des formes (A. Mills et al., 1997). Il a notamment été montré chez les cailleteaux une préférence pour différentes couleurs et intensité (A. Mills et al., 1997). Il a également été montré qu'une lésion de structures telles que le *nucleus rotundus* entraîne une diminution de la préférence pour la couleur rouge (Csillag et al., 1995). Ce noyau semble donc impliqué dans les processus visuels.

Chez les ovins, animaux sociaux et grégaires, la vue joue un rôle important dans la reconnaissance des congénères, une simple séparation visuelle des congénères pouvant engendrer un stress important (Coulon et al., 2013). Lors d'une expérience d'isolement social, la vue de visages familiers par rapport à d'autres individus inconnus réduit différents indicateurs comportementaux, autonomes et endocriniens de stress chez le mouton : diminution de l'activité, des vocalisations, des battements cardiaques, du cortisol et de

l'adrénaline (da Costa et al., 2004). Cela induit également une diminution de l'expression d'ARNm de gènes dans des régions spécialisées dans la reconnaissance faciale (cortex temporal, amygdale basolatérale) (da Costa et al., 2004). Chez le mouton éveillé, il a été montré que des cellules se trouvant dans le cortex temporal répondaient à des stimulations visuelles (notamment la présentation de visages homospécifiques) (Kendrick & Baldwin, 1987).

2. Régions impliquées dans les processus auditifs

Pour percevoir un son, cela passe dans un premier temps par le système auditif périphérique qui va permettre la traduction des oscillations acoustiques (Evans, 1992) pour le système auditif central. Ce système auditif central va recevoir l'information au niveau du noyau cochléaire qui va la transmettre via des projections bilatérales au noyau olivaires latéral et médian. Le signal est ensuite transmis vers le colliculi inférieur (grâce à des projections ipsilatérales) qui va lui-même transmettre le signal au niveau du cortex auditif (Evans, 1992; Šuta et al., 2008).

Une étude sur la caille japonaise a montré qu'une simulation acoustique entraînait une inhibition motrice ainsi qu'une activation cardiaque (Valance et al., 2007). De plus, chez les cailles des lignées STI et LTI, il a été montré qu'une simulation auditive induisait une forte activation sympathique pour les cailles LTI tandis que cela entraînait une activation à la fois parasympathique et sympathique que les cailles STI (Valance et al., 2007).

Chez le mouton, il a été montré que les brebis utilisent les vocalisations pour reconnaître leur petits et que les agneaux utilisent eux aussi ces vocalisations pour reconnaître leur mère (Sèbe et al., 2007). Cette communication vocale favorise l'allaitement préférentiel entre la brebis et son petit (Sèbe et al., 2008), la brebis n'acceptant que son petit à la tétée. Les agneaux peuvent également faire la distinction entre les vocalisations familières et inconnues de leurs congénères (Ligout & Porter, 2004). En ce qui concerne le système auditif du mouton, une seule étude de traceur neuronal a mis en évidence la localisation anatomique de ce qui pourrait constituer le cortex auditif du mouton (Michaloudi et al., 1986).

3. Régions impliquées dans les processus olfactifs

L'olfaction est le sens majeur qui intervient dans la mise en place du comportement maternel (Lévy et al., 2017). En effet, une brebis anosmique ne développera pas son comportement maternel (Lévy et al., 1995). Chez le mouton, il a été montré que lors de la période post-partum, la neurogénèse diminue au niveau olfactif (Brus et al., 2014). Au niveau du bulbe olfactif, la longueur dendritique est améliorée lorsque la mère interagit avec son petit (Brus et al., 2014). La reconnaissance de l'agneau passe par la reconnaissance de son odeur : l'odeur de l'agneau est traitée par le bulbe olfactif qui va transmettre l'information à l'amygdale (Keller & Lévy, 2012). Une étude de traçage de voies a montré que le noyau cortical de l'amygdale reçoit des entrées du bulbe olfactif principal et du bulbe olfactif accessoire tandis que le noyau médial de l'amygdale est innervé seulement par les cellules du bulbe olfactif accessoire (Meurisse et al., 2009).

L'ensemble des données rapportées dans cette partie I montre comment les systèmes sensoriels peuvent intervenir dans l'expression des comportements socio-émotionnels et plus largement les comportements adaptatifs *via* notamment les connexions neurales établies entre les structures cérébrales, certaines structures pouvant être impliquées à la fois dans les processus sensoriels et les processus socio-émotionnels. C'est le cas, par exemple, du thalamus, qui transmet les informations sensorielles (notamment visuelles) à l'amygdale (Barson et al., 2020; Ward, 2013), structure connue pour son rôle dans les émotions.

II. Régions impliquées dans les processus socio-émotionnels

Les régions impliquées dans les processus socio-émotionnels peuvent être considérées selon qu'elles participent à l'intégration et le traitement des informations de l'environnement interne ou externe ou qu'elles participent à l'expression des réponses émotionnelles.

1. Régions participant à l'intégration et au traitement de l'information émotionnelle :

Chez la caille, une lésion électrolytique endommageant la partie postérieure de l'arcopallium/amygdale postérieure entraîne une augmentation des comportements de peur (augmentation du temps passé immobile) dans le test de l'open-field. Lorsque la lésion

endommagement la partie antérieure de l'arcopallium, cela entraîne une diminution du score global de peur (calculé à partir du score obtenu à quatre tests de comportements : open-field, nouvel objet, immobilité tonique ainsi que le test du trou dans le mur) comparé aux caillies avec des lésions bilatérales au niveau du nidopallium (Saint-Dizier et al., 2009). Ces résultats indiquent une implication différentielle des parties antérieure et postérieure de l'arcopallium/amygdale postérieure dans les comportements de peur.

Chez les mammifères, les régions cérébrales les plus documentées en matière d'intégration et de traitement de l'information dans les processus socioémotionnels sont le cortex frontal et l'amygdale (Berridge, 2003; Menant et al., 2016). Cette dernière a été tout particulièrement étudiée chez les rongeurs dans les paradigmes de peur conditionnée (LeDoux, 2000). L'amygdale est une structure composée de plusieurs noyaux ayant des rôles complémentaires : les noyaux latéral, basolatéral et central. Le noyau latéral de l'amygdale reçoit des afférences issues des aires corticales permettant l'intégration des informations sensorielles. Ces informations sont ensuite transmises au niveau du noyau basolatéral puis au niveau du noyau central de l'amygdale (Calandreau et al., 2005; LeDoux, 2000). Certaines de ces connexions ont aussi été décrites chez la brebis adulte (Meurisse et al., 2009). D'autres études ont également été menées chez les animaux d'élevage, notamment chez la brebis, pour comprendre l'implication de l'amygdale dans les comportements sociaux (Poindron et al., 2007). Face à un prédateur (par exemple, un chien qui aboie) ou en condition d'isolement social, l'amygdale permet la régulation des émotions chez la brebis. Face à un prédateur, une augmentation de la quantité de corticolibérine libérée dans l'amygdale a été relevée chez la brebis (Cook, 2001), cet effet diminuant lorsqu'elle peut s'enfuir (Cook, 2002). Chez des brebis placées en isolement social mais auxquelles on montre une photographie de mouton, les réponses émotionnelles (cortisolémie, vocalisation et locomotion) diminuent par rapport aux réponses émises par les brebis placées en isolement seul. Cette variation de réactivité émotionnelle est liée à une activation neuronale différente dans le cortex préfrontal mais aussi dans les noyaux de l'amygdale (da Costa et al., 2004).

2. Régions participant à l'expression des réponses émotionnelles :

Plusieurs régions cérébrales sont impliquées dans l'expression des réponses émotionnelles, notamment comportementales : les aires corticales motrices, le noyau central de l'amygdale ou encore la PAG. La PAG est impliquée dans différentes réactions émotionnelles telles que la fuite, l'agressivité ou l'immobilité (Bandler et al., 2000; Benarroch, 2012). De manière plus générale, la PAG est impliquée dans les stratégies d'adaptation comportementale (Bandler et al., 2000; Benarroch, 2012). Elle est constituée de différentes subdivisions dont les subdivisions rostrolatérale, caudolatérale ou encore caudoventrolatérale (Linnman et al., 2012; Menant et al., 2016), chaque subdivision ayant un rôle différent. Les subdivisions rostrolatérale (comportement de confrontation) et caudolatérale (comportement de fuite) sont impliquées dans les stratégies d'adaptation comportementale dites actives tandis que la subdivision caudoventrolatérale est impliquée dans les stratégies d'adaptation comportementale dites passives (Keay & Bandler, 2001). Chez différentes espèces (rongeur, primate non humain et humain), des études sur les émotions positives ont aussi permis de mettre en évidence l'implication d'autres régions dans l'expression des réponses émotionnelles : cortex frontal, cortex cingulaire, noyau accumbens, noyau parabrachial et pallidum ventral (Berridge, 2003).

Ce bref aperçu des régions cérébrales impliquées dans les processus sensoriels et les processus socio-émotionnels suffit à montrer la complexité d'étudier l'ensemble du réseau neuronal impliqué dans les comportements adaptatifs. Au cours de ma thèse, l'utilisation de l'IRM a permis de mener deux approches différentes pour étudier ces régions : une approche globale pour le modèle de la sélection génétique (caille japonaise) et une approche ciblée pour les modèles de l'expérience précoce (mouton) et de la phylogénie (animaux issus de la faune sauvage).

Imagerie par Résonance Magnétique

I. Généralités :

L'IRM a été inventée dans les années 70 par Paul Lauterbur (Université d'Urbana, Illinois, USA). Ayant une bonne résolution spatiale et n'utilisant pas de source de rayonnement ionisant (comme c'est le cas pour le scanner à rayons X), l'IRM est notamment devenue majoritaire pour les diagnostics en neurologie mais aussi en recherche. L'IRM est une technique qui permet d'étudier de différentes façons l'organisation et le fonctionnement du cerveau (mais aussi d'autres organes), que ce soit *in vivo* ou en *ex vivo*.

II. Fonctionnement de l'IRM :

Le principe de l'IRM est fondé sur les propriétés électromagnétiques des atomes qui constituent la matière. L'IRM cible les atomes d'hydrogène (H) que l'on retrouve dans la majorité des molécules organiques. Le corps humain est composé en grande quantité d'eau (le cerveau contient 80% d'eau (H₂O)). Chaque molécule d'eau contient 2 atomes d'hydrogène dont le noyau est composé d'un seul proton. Ce sont les caractéristiques de ces protons qui vont être manipulés et étudiés dans l'IRM : l'IRM repose sur l'excitation des spins des protons de l'eau des tissus (Figure 2).

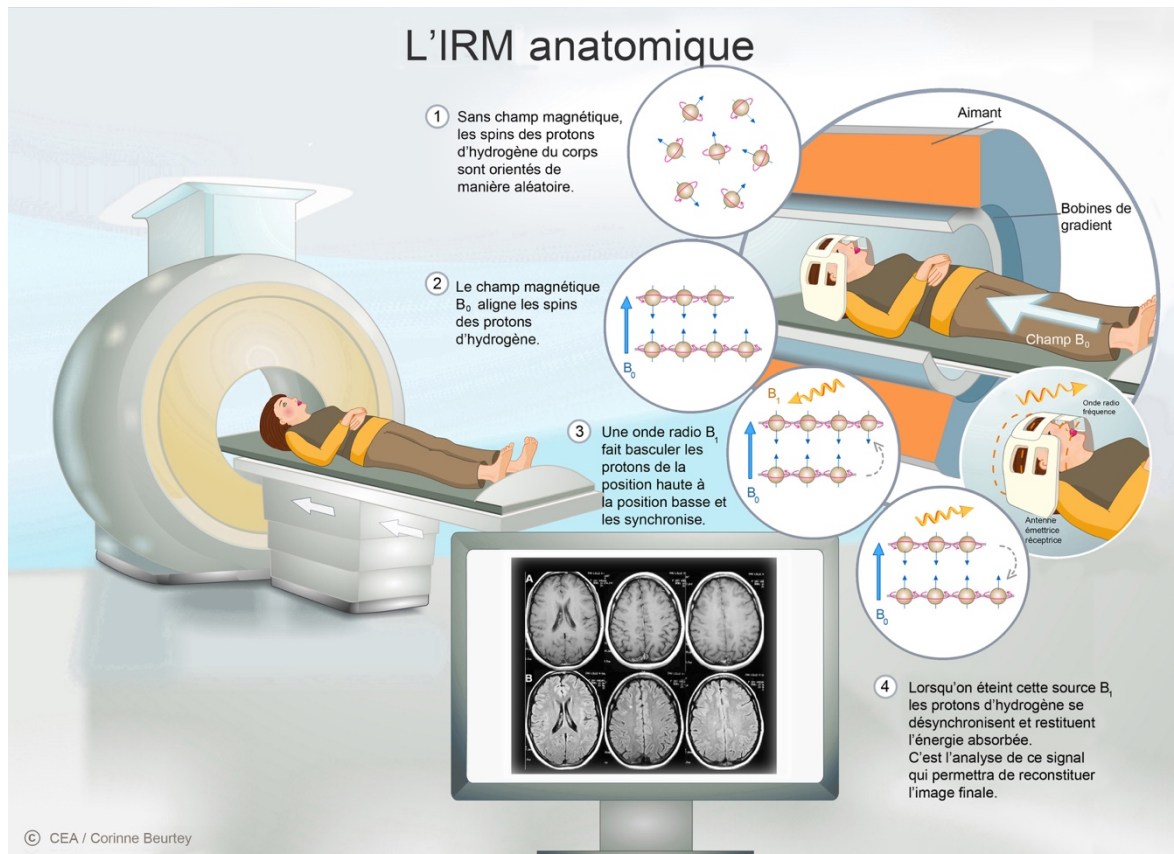


Figure 2 : Principe de fonctionnement d'une acquisition en IRM anatomique. Source : CEA

Le fonctionnement de l'IRM peut être découpé en 3 parties : l'aimantation, la résonance et la relaxation. Pour réaliser une acquisition IRM, une antenne de radiofréquence (RF) doit être placée au niveau de l'organe à imager.

Avant que le sujet (*ex* : Homme, mouton, œuf de poule etc...) ne soit placé dans l'IRM, aucun champ magnétique n'est émis sur le sujet à part le champ de gravité terrestre. La direction de l'axe de rotation des protons (les spins) est aléatoire. Leur résultante, aussi appelée moment magnétique est nulle. Lors de l'acquisition IRM, le sujet est placé dans l'IRM, il est donc soumis au champ magnétique de l'IRM appelé B_0 (chez l'Homme, il est orienté le plus souvent des pieds vers la tête). Sous l'effet de ce champ magnétique B_0 , les spins, qui étaient jusque-là aléatoires, vont s'aligner soit dans la direction du champ B_0 (parallèle) soit dans le sens inverse (antiparallèle). C'est la phase d'aimantation. La fréquence de l'impulsion RF (due à l'antenne RF) doit être la même que la fréquence des protons d'hydrogène en rotation. Cela va leur permettre d'échanger de l'énergie. C'est la phase de résonance. La résonance va permettre aux protons d'absorber suffisamment d'énergie de l'impulsion RF pour éloigner leurs axes du champ B_0 , cela entraîne donc un

changement de direction de l'axe de rotation des protons. Une fois cette impulsion RF arrêtée, on mesure la phase de relaxation, c'est-à-dire le temps que les spins mettent pour revenir à leur position d'origine. Cette phase de relaxation se déroule en deux temps : T_1 et T_2 . Le temps de relaxation T_1 (dit longitudinal ou temps de relaxation spin-réseau) est parallèle au champs B_0 tandis que le temps de relaxation T_2 (dit transversal ou temps de relaxation spin-spin) est perpendiculaire au champs B_0 . Les images basées sur les propriétés T_1 sont appelées images pondérées en T_1 tandis que les images basées sur les propriétés T_2 sont appelées pondérées en T_2 (Figure 3).

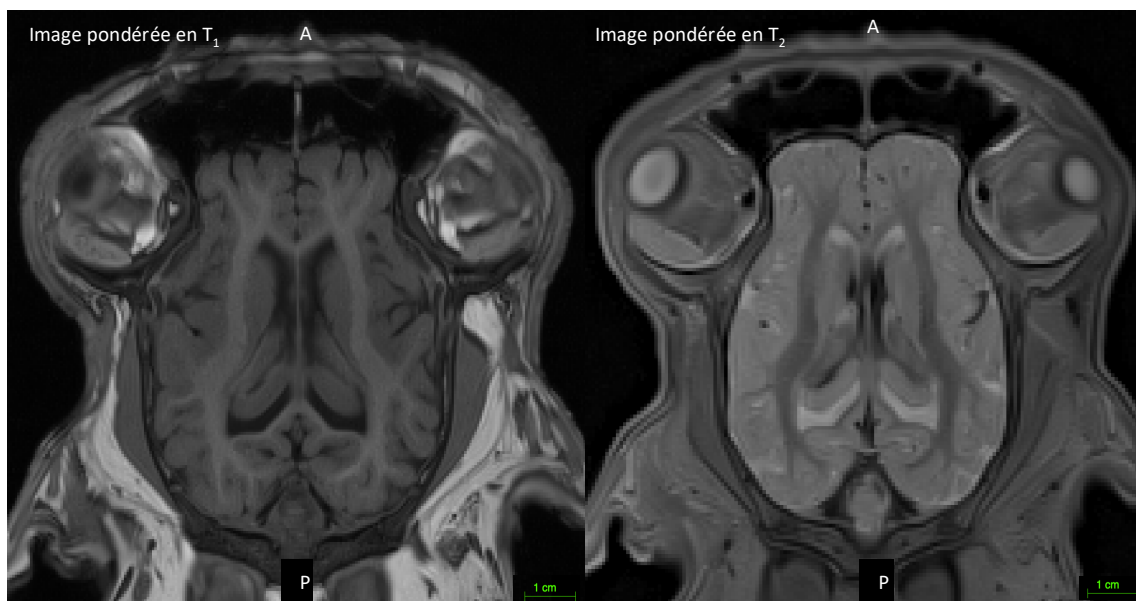


Figure 3 : Images IRM de cerveau de mouton, pondérée en T_1 (à gauche) et en T_2 (à droite), acquisition réalisée à Pixanim sur un scanner IRM Siemens Magnetom Verio® scanner (Erlangen, Allemagne) à 3 Tesla

Les acquisitions IRM sont possibles en *ex vivo* mais également en *in vivo*. L'acquisition *ex vivo* offre la possibilité d'acquérir des données sur de longues périodes de temps, ce qui contribue à augmenter la résolution et la qualité des données. Cependant, l'extraction et la fixation des tissus peuvent être problématiques. De plus, cela empêche de regarder des processus dynamiques (par exemple, le vieillissement) au sein d'un individu puisqu'il n'est possible d'obtenir qu'un point de temps par individu. En revanche, l'imagerie *in vivo* permet d'imager le même individu à plusieurs moments différents. L'inconvénient est la durée d'acquisition est plus courte et ne peut dépasser quelques heures. L'imagerie *in vivo* permet également de faire de l'imagerie fonctionnelle.

Selon les performances du scanner, les caractéristiques de l'antenne RF et les paramètres d'acquisition, plusieurs modalités d'imagerie sont possibles, adaptées à l'organe étudié et à la question posée.

III. Utilisation de l'IRM pour étudier le cerveau

1. Étude de la morphologie de régions cérébrales par IRM :

Les acquisitions IRM pondérées en T_1 ou en T_2 , dépendent également du temps d'écho (TE) et du temps de relaxation (TR). TE correspond au temps entre l'impulsion de 90° et le recueil de l'écho de spin et TR correspond au temps écoulé entre deux impulsions de 90° . Pour les images en T_1 , le TR et le TE sont courts tandis que pour les images en T_2 , le TR et le TE sont longs. Ce sont les temps de relaxation qui sont à l'origine des contrastes des images IRM. Ces temps de relaxations sont différents en fonction des tissus, ils auront donc des contrastes différents permettant de les distinguer (Tableau 1).

Tissu	T_1	T_2
Matière grise (cortex)	1000	100
Matière blanche	718	80
Liquide céphalo-spinal	2060	250
Sang	1200	250
Eau pure	4760	3500

Tableau 1 : Tableau représentant les temps de relaxation T_1 et T_2 (en ms) pour différents tissus cérébraux dans une IRM 1,5 Tesla. Issu de (Houdé et al., 2002).

Ces différents types d'acquisition (pondéré en T_1 ou T_2) permettent d'étudier la morphologie des régions cérébrales. Pour cela, différents paramètres peuvent être analysés tels que le volume des régions, leur intensité ou leur fraction d'anisotropie (FA) (Lee et al., 2015).

2. Étude de la connectivité entre les régions cérébrales par IRM de diffusion :

L'IRM de diffusion (IRMd) est une technique utilisée pour étudier la connectivité anatomique de l'encéphale, elle rend compte de l'organisation des connexions cérébrales (Le Bihan, 2003). L'IRMd s'intéresse donc surtout aux fibres blanches (axone entouré d'une

gaine de myéline). Cette technique d'imagerie étudie le déplacement des molécules d'eau le long des axones, cela permet de définir l'orientation des fibres en exploitant la mobilité des molécules d'eau, cette mobilité va être différente en fonction du milieu et de la direction. Les molécules d'eau présentes soit dans les fibres soit au niveau extracellulaire (visible seulement lorsque la résolution de l'acquisition IRM est forte), vont être restreintes dans leurs mouvements et vont se déplacer majoritairement le long des gaines de myéline, on parle alors de diffusion anisotrope. Dans le cas contraire, lorsque les molécules d'eau sont libres de se déplacer dans toutes les directions de l'espace, on parle de diffusion isotrope, c'est le cas surtout dans la substance grise.

A partir de ce type d'acquisition IRM, il est possible d'étudier la connectivité entre différentes régions cérébrales en utilisant plusieurs modèles. Par exemple, il est possible d'utiliser la tractographie qui permet de modéliser le connectome structurel ou anatomique de l'encéphale. Un code coloré permet de représenter les déplacements des fibres sur les axes de l'image en 3 dimensions : les déplacements latéraux (axe des X) sont représentés en rouge, les déplacements d'avant en arrière (axe des Y) en vert et les déplacements en hauteur (axe des Z) en bleu. Cette représentation permet de connaître la direction dans laquelle se déplacent les fibres mais elle ne permet pas d'en connaître le sens (de droite à gauche ou de gauche à droite). Il est également possible de représenter la connectivité en utilisant des matrices de connectivité ou des diagrammes circulaires. Ces méthodes permettent de quantifier le nombre de connexions entre deux régions cérébrales. Dans le cas des matrices de connectivité, si deux régions sont très connectées, elles seront représentées en rouge ; si elles sont peu connectées, elles seront représentées en bleu.

Les différentes caractéristiques de l'IRM en font donc une excellente méthode pour étudier l'impact de la sélection génétique, de l'expérience précoce et de la phylogénie sur la plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs. C'est cette méthode qui sera utilisée pour mener les différentes études de ma thèse. Pour tester l'hypothèse de l'expérience précoce, nous avons réalisé des acquisitions *in vivo* sur la plateforme PIXANIM à INRAE de Nouzilly. Pour tester les hypothèses de la sélection génétique et de la phylogénie, nous avons réalisé des acquisitions *ex vivo* à NeuroSpin (CEA, Gif-sur-Yvette).

IV. Médiation scientifique : Comprendre les champs électromagnétiques pour s'initier à l'IRM

Si lors de la présentation du projet Neuro2Co aux élèves de l'atelier Ciboulot (Figure 4), tous les élèves connaissaient le mot « IRM » et savaient que cette machine permet de faire des images des organes du corps humain, dont le cerveau, le principe caché derrière leur était inconnu ! Pour leur permettre d'appréhender la notion de champ électromagnétique, principe de base de l'IRM, les élèves de l'atelier Ciboulot ont d'abord manipuler des aimants puis fabriqué une bobine à partir de fil de cuivre et d'un circuit électrique.



Figure 4 : Une image IRM d'un cerveau est présentée à côté d'une coupe histologique

Pour aborder la notion d'aimantation, les élèves ont exposé différentes limailles (acier, fer, cuivre) à des aimants. Ils ont constaté que toutes les limailles n'étaient pas magnétiques. Cette observation a permis de les sensibiliser au fait qu'il ne fallait utiliser des objets amagnétiques dans les salles IRM. En exposant la limaille de fer à l'aimant, les élèves ont pu observer les lignes de champ suivies par la limaille de fer et constater que l'aimantation était forte à proximité de l'aimant et qu'elle diminuait à distance de l'aimant (Figure 5). De cette manière, nous avons pu expliquer aux élèves la signification des lignes de champ dessinées au sol autour de l'IRM pour donner des indications sur la force du champ

électromagnétique en fonction de la position des manipulateurs, des expérimentateurs ou des patients dans la salle.



Figure 5 : Formation de lignes de champs à l'aide de limaille de fer et d'un aimant

La fabrication d'un champ électromagnétique a été réalisée par les élèves en enrollant du fil de cuivre autour d'un bouchon en liège, chaque extrémité du fil étant maintenue par un clou sur lequel était pincé un fil électrique relié à une pile électrique de 9 Volt (Figure 6). Pour vérifier qu'un champ magnétique était généré, les élèves approchaient un sachet de limailles de fer et pouvaient constater l'attraction produite par la bobine. De plus, ils ont pu sentir la chaleur produite par la bobine de cuivre. Ce constat a permis aux élèves de comprendre la nécessité de coupler les IRM à des systèmes de refroidissement et pourquoi les objets imagés pouvaient être chauds après une acquisition IRM.

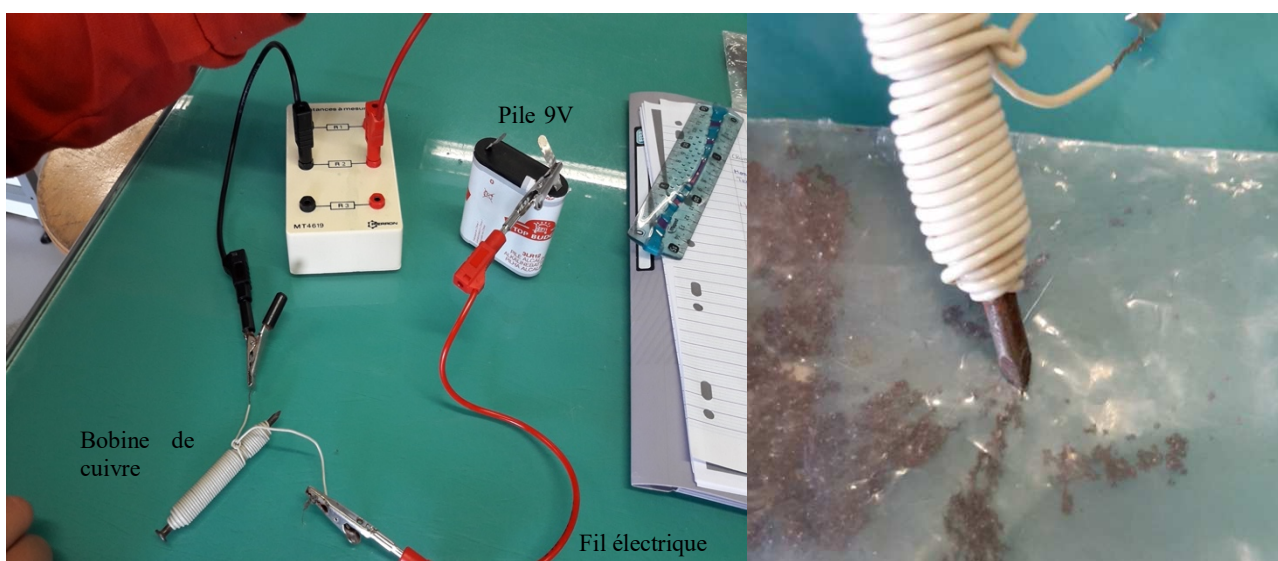


Figure 6 : Fabrication d'un champ électromagnétique à l'aide d'une bobine constituée d'un fil de cuivre enrollé autour d'un bouchon de liège, de fils électriques et d'une pile de 9V.



Figure 7 : Les collégiens de l'atelier Ciboulot échangent avec un spécialiste de l'IRM

Une visite de la plateforme PIXANIM à INRAE de Nouzilly a permis aux élèves de voir « en vrai » comment les images RM sont acquises (Figure 7). A cette occasion, les élèves ont été sensibilisés à l'organisation des connexions cérébrales étudiées par IRM de diffusion, par la modélisation de la diffusion de l'eau dans les tissus. Pour leur permettre d'appréhender la question de la diffusivité de l'eau, ils ont réalisé une expérience très simple en mettant une goutte de colorant dans un bécher rempli d'eau (Figure 8). Ils ont constaté que le colorant se dispersait dans toutes les directions, qu'il diffusait librement.



Figure 8 : Exemple d'une expérience permettant de comprendre le principe de diffusion à l'aide d'un bécher rempli d'eau et de colorants

Les élèves de l'atelier scientifique Ciboulot du collège André Bauchant, animateurs de la semaine du cerveau !

Rédaction : Marine Siwiaszczyk, Elodie Chaillou avec la complicité des élèves de l'atelier Ciboulot

Article publié le 8 juillet 2019

<https://www.echosciences-centre-valdeloire.fr/communautes/un-cerveau-dans-toutes-les-tetes/articles/les-eleves-de-l-atelier-scientifique-ciboulot-du-college-andre-bauchant-animateurs-de-la-semaine-du-cerveau>



Pour la deuxième année consécutive, les élèves de l'atelier Ciboulot (APR Neuro2Co) du collège André Bauchant de Château-Renault ont accueilli des élèves de CM2 à l'occasion de la semaine du cerveau.

Les élèves de CM2 ont pu découvrir le cerveau des animaux et une des méthodes les plus utilisées pour l'étudier, l'imagerie par résonance magnétique.

Chaque atelier était animé par des élèves de l'atelier Ciboulot épaulés par Mathieu Charrier, professeur de SVT, et Frédéric Chaumont, professeur de sciences physiques et de chimie.

La découverte du cerveau des animaux

Les élèves de CM2 ont commencé cet atelier par un petit jeu dans lequel ils devaient deviner le nom des différentes parties du système nerveux (cerveau, moelle épinière, nerfs) puis le nom de différentes parties de l'encéphale (hémisphères, cervelet, tronc cérébral).

Après ce petit jeu, les élèves ont pu observer un encéphale de veau et retrouver les régions découvertes pendant le jeu. Ils ont pu visualiser les hémisphères, le cervelet, le tronc cérébral. Ils ont aussi identifié les circonvolutions du cerveau de veau, et constaté que l'encéphale était hétérogène composé de substance grise et de substance blanche.



Découverte du cerveau par les élèves de CM2



Découverte du cerveau à l'échelle macroscopique

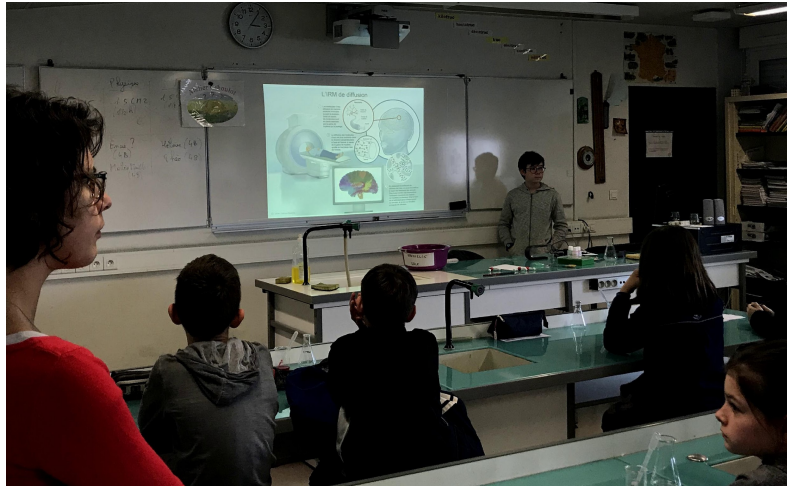
Pour poursuivre la découverte de l'encéphale, les enfants ont pu utiliser les microscopes du collège pour observer des coupes de cerveau et découvrir les cellules que sont les neurones. Après cette phase d'observation, les élèves de CM2 ont légendé un schéma illustrant les différentes parties d'un neurone.



Découverte du cerveau à l'échelle microscopique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Cette méthode est celle utilisée dans le projet Neuro2Co pour décrire l'organisation des connexions de fibres blanches cérébrales et étudiée par les collégiens de l'atelier scientifique



Présentation de l'IRM par les élèves de l'atelier Ciboulot

Ciboulot. Pour comprendre le principe de l'IRM, et plus particulièrement celui de l'IRM de diffusion utilisée pour décrire les fibres blanches, les élèves de CM2 ont d'abord assisté à une petite présentation réalisée par un des collégiens de l'atelier Ciboulot.

Pour illustrer le principe de l'aimant de l'IRM, les élèves de CM2 ont ensuite manipulé un aimant pour attirer de la limaille de fer enfermée dans un petit sachet plastique. Puis, pour illustrer le principe de la diffusion de l'eau le long des fibres blanches explorée par l'IRM de diffusion, les élèves de CM2 ont pu réaliser l'expérience suivante : mettre quelques gouttes de colorants dans un verre d'eau et observer la propagation de la couleur dans l'eau.



Mise en pratique du principe de diffusion

A la fin des ateliers, les élèves de CM2 et leurs enseignants n'ont pas manqué de remercier les collégiens et les professeurs pour leur accueil et la qualité des activités proposées aux élèves de CM2. De quoi motiver encore plus les élèves de l'atelier Ciboulot pour poursuivre ces rendez-vous de médiation scientifique dont ils deviennent les principaux acteurs !

Hypothèse génétique : les cailles japonaises STI et LTI

Comme nous l'avons vu en introduction générale, la première hypothèse que nous avons testée est l'hypothèse de la sélection génétique. La sélection génétique des animaux influence la mise en place et/ou l'expression des comportements adaptatifs (Pellow et al., 1985; Wigger et al., 2001), entraînant aussi des modifications au niveau cérébral. C'est le cas du coq doré (*Gallus gallus*), chez lequel une sélection divergente sur le niveau de peur face à des humains a été réalisée (Katajamaa & Jensen, 2020). Il a été montré que la taille relative des cerveaux en fonction du poids corporel est plus petite pour les coqs sélectionnés pour leur faible peur des humains par rapport aux coqs ayant une forte peur des humains (Katajamaa & Jensen, 2020). Il en est de même pour la taille du tronc cérébral en fonction de la taille du cerveau, qui est aussi plus petite chez les coqs sélectionnés pour leur faible peur des humains que chez les coqs sélectionnés pour leur forte peur des humains (Katajamaa & Jensen, 2020). De plus, cette sélection basée sur la peur des humains entraîne une différence de réaction à d'autres situations. En effet, les coqs sélectionnés pour leur faible peur des humains vont mieux réagir à un stimulus effrayant auquel ils ont déjà été confronté que les coqs sélectionnés pour leur forte peur des humains. Ces derniers vont alors réagir de la même manière que des coqs n'ayant jamais été confronté à ce stimulus (Katajamaa & Jensen, 2020).

L'hypothèse de notre étude est que la plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs des animaux fait l'objet d'une sélection génétique. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser le modèle de la caille japonaise avec deux lignées issues d'une sélection génétique divergente.

I. La caille japonaise, un modèle d'intérêt pour l'étude de la sélection génétique :

1. Généralités :



Figure 9 : Photo d'une caille japonaise (*Coturnix japonica*)

La caille japonaise (*Coturnix japonica*) (Figure 9) est une espèce d'oiseaux qui appartient à l'ordre des Galliformes et plus précisément à la famille des *Phasianidés* (A. Mills et al., 1997). C'est une espèce originaire de pays de l'est asiatique tels que le Japon, la Mongolie, la Sibérie, la Chine ou encore la Corée. Elle se retrouve principalement dans des habitats ouverts tels que des prairies, des cultures, des steppes mais également des

clairières forestières. Cette espèce, à ne pas confondre avec la caille des blés (*Coturnix coturnix*), est l'espèce couramment utilisée dans les élevages de volailles domestiques, elle est principalement élevée pour ses œufs mais aussi en tant qu'animal de compagnie. Sa taille est d'environ 15 cm. En raison d'un dimorphisme sexuel, les mâles et les femelles sont facilement distinguables : le mâle possède un plumage roux sur la poitrine tandis que les plumes de la femelle ont des petits points sombres. De plus, le mâle est plus petit que la femelle.

La caille japonaise est une espèce qui est généralement monogame. Cependant, de façon opportuniste, des copulations hors de la paire monogame sont possibles (A. Mills et al., 1997). Cette espèce, nidicole, niche d'avril à juin, cette période pouvant varier en fonction de la localité et donc du climat. Pour réaliser son nid, la femelle caille creuse une cuvette dans le sol qu'elle borde de tiges herbacées. Une fois les œufs pondus (en moyenne 8 par ponte), la couvaison est essentiellement assurée par la femelle bien que le mâle y participe parfois. Les œufs seront couvés entre 16 à 18 jours. Lors de cette couvaison, les œufs vont être camouflés afin d'être protégés des prédateurs. Les oisillons seront sevrés 4 semaines après la naissance. Les cailleteaux atteignent leur maturité sexuelle à 40 jours, c'est à partir de cette période que la première ponte va être possible.

2. Intérêt de la caille japonaise comme modèle expérimental :

De par sa petite taille et son mode d'élevage facile, la caille japonaise est couramment utilisée en recherche scientifique. Des lignées génétiques ont été créées grâce à des sélections divergentes sur différents critères tels que la motivation sociale ou l'émotivité dans le but d'établir un lien entre génétique et comportement.

a. Lignées LSR / HSR :

Les lignées LSR (Low Social Reinstatement behavior) / HSR (High Social Reinstatement behavior) ont été sélectionnées à partir d'un test rendant compte de leur motivation sociale. Le test consiste à placer l'individu sur un tapis roulant à l'extrémité duquel sont placés des congénères. Pour les rejoindre, les cailles doivent courir dans le sens opposé du défilement du tapis. Les cailles qui parviennent à rejoindre leurs congénères constituent la lignée HSR, considérée à forte motivation sociale. A l'inverse, les cailles qui ne parviennent pas à rejoindre leurs congénères constituent la lignée LSR, considérée à faible motivation sociale (A. D. Mills & Faure, 1991). Ainsi, la motivation sociale a été étudiée à travers ces lignées de cailles japonaises. Des travaux se sont, par exemple, intéressés à leur capacité à discriminer un congénère familial d'un congénère inconnu. Il a été montré qu'un niveau de motivation social élevé chez les cailles mâles adulte facilite la reconnaissance de la familiarité, ce qui suggère que la motivation sociale influence le développement des relations sociales chez la caille japonaise (Schweitzer et al., 2009).

b. Lignées LS / HS :

Les lignées LS (Low Stress) / HS (High Stress) ont été sélectionnées sur la base d'un critère physiologique : le taux de corticostérone plasmatique en réponse à une contention dans un environnement nouveau. Les cailles de la lignée HS ont un fort taux de corticostérone après la contention ainsi qu'une faible durée d'immobilité tonique (R. Jones, 1992). Les cailles de la lignée LS ont quant à elles un plus faible taux de corticostérone après la contention ainsi qu'une plus longue durée d'immobilité tonique.

c. Lignées STI / LTI :

Les lignées STI (Short Tonic Immobility) et LTI (Long Tonic Immobility) ont été sélectionnées à la fin des années 80 par (A. D. Mills & Faure, 1991). Ces lignées ont été sélectionnées à partir d'un test rendant compte de leur émotivité. Le test consiste à placer un

individu sur le dos dans un module en forme de U, l'individu est alors en immobilité tonique. Le temps passé en immobilité tonique est mesuré. Les cailles de la lignée STI vont rester peu de temps en immobilité tonique tandis que les cailles LTI, dites émotives, vont rester longtemps sur le dos (R. B. Jones et al., 1991). L'immobilité tonique est une position qui met en tension de nombreux muscles de l'animal (Gentle et al., 1989). Certains auteurs considèrent que l'immobilité tonique pourrait correspondre à une simulation de mort afin d'échapper à des prédateurs (Rovee & Luciano, 1973). En simulant une mort, un prédateur pourrait se désintéresser de sa proie qui survivra donc. L'immobilité tonique serait donc un caractère adaptatif du comportement. En effet, le taux de mortalité face à un prédateur est moins important pour les cailles qui réalisent une immobilité tonique que pour les cailles qui n'en font pas (Thompson et al., 1981). Ces lignées sélectionnées sur la base de comportements adaptatifs différents sont donc un excellent modèle pour étudier l'impact de la sélection génétique sur la plasticité anatomique des régions cérébrales associées à ces comportements adaptatifs.

3. Objectif de l'étude :

Cette étude porte sur les deux lignées de caille japonaises : STI et LTI. L'objectif est de voir si la sélection génétique qui a été réalisée en fonction d'un comportement adaptatif (leur émotivité) impacte la morphologie cérébrale de régions impliquées dans les processus émotionnels mais également sensoriels.

II. Selection of high-trait emotivity affects the volume of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails

1. Résumé de l'article

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les émotions, diverses lignées de cailles japonaises ont été sélectionnées sur la base de paramètres physiologiques et/ou comportementaux. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé les lignées STI (Short Tonic Immobility, non émotive) et LTI (Long Tonic Immobility, émotive) (A. D. Mills & Faure, 1991). Ces lignées, sélectionnées pour leur différence d'émotivité, diffèrent également au niveau de leur microbiote, de leurs capacités d'apprentissage mais aussi sur leur utilisation des différents types de mémoire (Kraimi et al., 2019; Lormant et al., 2018). Des différences ont également été trouvées en ce qui concerne des mécanismes neurobiologiques pouvant être impliqués dans les comportements émotionnels. L'hypothèse de cette étude est que la sélection génétique basée sur l'émotivité pourrait avoir impacté l'anatomie de régions cérébrales impliquées dans les processus sensoriels (audition, olfaction, vision) et émotifs.

Pour tester notre hypothèse, nous avons étudié 20 cailles mâles à maturité sexuelle (10 cailles STI et 10 cailles LTI). Chaque tête de caille a été imagée à l'IRM 11.7 Tesla (NeuroSpin, CEA Saclay). Les images anatomiques des têtes de cailles ont été réalisées en utilisant une séquence Spin Echo (SE) pondérée en T₂. À partir de ces images SE, un template (moyennant les 20 images de cailles) a été créé. Ce template a ensuite été utilisé pour segmenter manuellement l'atlas de l'encéphale de caille japonaise. Cet atlas a été recalé chez chaque individu ce qui a permis d'étudier les volumes des régions cérébrales pour chaque lignée.

Cette étude a permis la création d'un template accompagné de l'atlas complet de l'encéphale de caille japonaise. Ces données sont en accès libre (<http://doi.org/10.5281/zenodo.4700522>). Le template permet d'avoir une image moins bruitée et d'améliorer les contrastes ce qui facilite la segmentation manuelle des différentes régions de l'encéphale. L'atlas IRM de l'encéphale de caille japonaise mâle comprend 194 régions segmentées : 191 régions cérébrales (9 régions inter-hémisphériques, 91 régions dans l'hémisphère droit et 91 régions dans l'hémisphère gauche), le système ventriculaire et les glandes pinéale et pituitaire. Le volume globale de l'encéphale ne diffère pas entre les

lignées. Sur 81 régions testées, 33 présentaient un volume relatif différent entre les lignées. Des différences entre les lignées ont été trouvées en ce qui concerne le volume relatif de régions impliquées dans les processus sensoriels tels que la vision (Ex : le tectum optic), l'olfaction (Ex : le tract olfactif) et l'audition (Ex : le noyau dorsal du lemniscus latéral). Cette étude a également permis de mettre en évidence une différence entre les lignées STI et LTI au niveau de régions impliquées dans les processus émotionnels tels que le BNST, la PAG ou encore le cervelet.

Cette étude montre donc pour la première fois, chez la caille japonaise mâle, que la sélection génétique basée sur l'émotivité modifie la morphologie de régions cérébrales impliquées dans les processus sensoriels et émotionnels. Cette étude confirme également la latéralisation de certaines régions de l'encéphale de caille japonaise.

2. Selection of high-trait emotivity affects the volume of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails

Selection of high-trait emotivity affects the volume of sensory and emotional-related brain regions in male Japanese quails

Marine Siwiaszczyk^{1,*a}, Raïssa Yebga Hot^{2,*}, Mélody Morisse¹, Ludovic Calandreau¹, David André Barrière^{1,2}, Justine Beaujoin², Baptiste Mulo³, Frédéric Andersson⁴, Cyril Poupon², Scott A. Love^{1,#}, Elodie Chaillou^{1,#,a}

¹CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, Nouzilly, France

²Université Paris-Saclay, CNRS, CEA, NeuroSpin, BAOBAB, Gif-sur-Yvette, France

³Zooparc de Beauval, Beauval Nature, Saint-Aignan, France

⁴UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France

* Contributed equally

Contributed equally

a Corresponding authors:

Marine Siwiaszczyk : marine.siwia@gmail.com

Elodie Chaillou : elodie.chaillou@inrae.fr

Article soumis pour publication le 20 octobre 2021
dans Brain Structure and Function

Abstract

Japanese quails (*Coturnix japonica*) divergently selected based on their behavior during a tonic immobility test are an excellent model to study the link between brain morphology and behavior expression. The LTI (Long Tonic Immobility) and STI (Short Tonic Immobility) quail lines differ in their level of emotivity, with LTI quails being selected for their high-trait emotivity. Here, comparing the brain regions of the LTI and STI lines of male Japanese quails, we test the hypothesis that this divergent selection could have influenced brain anatomy, in particular, those regions involved in sensory and emotional processing. The heads of twenty, 10 weeks old male Japanese quails (10 STI and 10 LTI) were imaged *ex-vivo* using ultra high-resolution (11.7 Tesla) magnetic resonance imaging. The resulting images were used to create a population-averaged quail brain template and manually segmented 3D whole-brain atlas (openly available: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4700522>). The atlas is composed of 191 brain regions, the ventricular system, pineal and pituitary glands. Thanks to this atlas, an exploratory analysis was conducted to compare brain regions between the two lines: the relative volumes of 33 regions were impacted (with 24 larger relative volumes being found in STI). This demonstrates for the first time in male Japanese quail that genetic selection for a specific emotional behavior (tonic immobility) modifies the anatomy of brain regions involved in sensory and emotional processing.

Keywords

Bird - Brain - Behavior - Coping Style - MRI - Atlas

Acknowledgements

We are grateful to all the members of the Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours and Paul Constantin for taking care of the birds. We also wish to thank Cécile Arnould for her helpful input on quail behavior.

Introduction

To understand the biological mechanisms underlying emotion in birds, diverse lines of Japanese quails (*Coturnix japonica*) have been selected based on a variety of behavioral and physiological parameters: Low and High Stress genetic lines were selected for their level of corticosterone in reaction to an unfamiliar environment (Satterlee and Johnson 1988) or STI (Short Tonic Immobility) and LTI (Long Tonic Immobility) lines selected based on their response to a tonic immobility test (Mills and Faure 1991). In line with their behavioral and physiological responses, the STI and LTI lines are recognized to have low and high emotivity, respectively (Jones et al. 1991; Hogg et al. 1994; Richard et al. 2000; Hazard et al. 2005; Faure et al. 2006; Boulay et al. 2013; Bertin et al. 2018). During the tonic immobility test, a quail is held in place on its back inside a U-shaped cradle for ten seconds. Then the time taken for the quail to turn over and stand up is measured (i.e., tonic immobility duration). The LTI line quails display high-trait emotivity during this test by remaining on their back often for the maximum duration of the test (5 min), whereas STI quails often stand up almost immediately (Mills and Faure 1991). During an emergence test, latency is higher for LTI quails than STI (Jones et al. 1991) and LTI quails spend significantly more time in freezing than STI quails during an open-field test (Jones et al. 1991). It has also been shown that these lines have different microbiota, learning abilities and that they use different forms of memory (Lormant et al. 2018; Kraimi et al. 2019). There is also some evidence of the neurobiological mechanisms that could support the difference in emotional behavior between these lines: LTI quails have a higher number of GnIH-related peptide-2 neurons in the median portion of the paraventricular nucleus than STI quails (Poissenot et al. 2019) and they display decreased hippocampal neurogenesis compared to STI quails (Lormant et al. 2020b).

Based on the differences between the LTI and STI lines of quail, we hypothesize that this genetic selection for high-trait emotivity could have more globally influenced the anatomy of brain regions involved in sensory (olfactory, auditory and visual) and emotional processing. In line with this hypothesis, the selection of Red Junglefowl (*Gallus gallus*) based on their divergent levels of fear of humans (tameness) is also known to modify brain anatomy (Agnvall et al. 2017). The Red Junglefowl selected for high-trait tameness had a lower total brain weight. However, the modifications to brain anatomy were also region

dependent: high-trait tameness led to a lower relative telencephalon weight but to a higher relative cerebellum weight (Agnvall et al. 2017).

To test our hypothesis, we measured the volume of anatomical regions of the quail brain using ultra high-resolution (11.7 Tesla) magnetic resonance imaging (MRI). To be able to investigate the brain in this way an anatomical atlas is required (for example in humans, Talairach and Tournoux 1988). A cerebral MRI atlas is a 3D digital space providing a standard system of anatomical coordinates and a segmentation (total or partial), voxel by voxel of the anatomical regions. It can represent a single region (human hypothalamus, Baroncini et al., 2012), a single hemisphere (marmoset, Liu et al. 2018; pig, Saikali et al. 2010), an individual brain (human, Tzourio-Mazoyer et al. 2002) or a population-averaged brain (Van Essen and Dierker 2007; Cabezas et al. 2011; Evans et al. 2012; Love et al. 2016). In birds, several atlases exist, such as for pigeon (Güntürkün et al. 2013), starling (De Groof et al. 2016), zebra finch (Poirier et al. 2008) and canary (Vellema et al. 2011). But, due to the specificities of these birds that could be songbird, migratory etc., it is necessary for the current work to have an atlas and template specific for the Japanese quail. However, for Japanese quail, only a paper-based stereotaxic atlas created from colored brain sections exists (Baylé et al. 1974), which is not optimal for use with MRI. In this context, we created a population-averaged quail brain template and manually segmented it to create an MRI-based quail whole-brain atlas. These tools enabled us to achieve the main aim of this work, which was to compare the brain regions of the LTI and STI lines of Japanese quails.

Materials and methods

Compliance with Ethical Standards

Animal care and experimental treatments complied with the guidelines of the French Ministry of Agriculture for animal experimentation and European regulations on animal experimentation (86/609/EEC). They were performed in accordance with the local animal regulation (authorized C37-175-1) of the French Ministry of Agriculture in accordance with EEC directive and with the ethical committee Val de Loire (agreement N° 1848).

Animals

Twenty 10 weeks old (at sexual maturity) male Japanese quails (*Coturnix japonica*) were included in this work. Half of the quails came from the STI line while the other half came from the LTI line (Mills and Faure 1991); all came from the 65th generation of selection. Male quails were chosen because in females the reproductive cycle and laying are associated with changes in hormones that may interact with brain function and anatomy. Quails were selected and bred at the INRAE poultry experimental facilities (INRAE 1295 Unité Expérimentale Pôle Expérimental Avicole de Tours, F-37380 Nouzilly, France, doi:10.15454/1.5572326250887292E12). On day 21 after hatching, sex was determined by feather dimorphism and males were reared in individual cages in a battery (41 cm × 51 cm × 25 cm) under a 12:12 h light dark schedule (light on 06:00 h). A piece of artificial turf was placed on the cage floor to allow animals to exhibit dust bathing behavior. Ambient temperature was maintained at approximately 20 ± 2 °C. Food and water were provided *ad libitum*. At 10 weeks of age, each quail was euthanized with an overdose of intravenously injected pentobarbital 6% (36mg/100g) before transcardiac perfusion with 400 mL of ice cold 4% paraformaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer for brain fixation. After perfusion, the head was severed and kept in the same fixative solution until MRI acquisition.

MRI acquisition

To prevent interference with the MR signal by the presence of air in the feathers, the quails' heads were plucked. Before acquisition, the heads were rehydrated in phosphate buffer to recover T₂-signal and maintained in a Falcon tube filled with Fluorinert. *Ex-vivo* structural MRI were acquired using a preclinical Bruker BioSpec 11.7 T MRI scanner at NeuroSpin (Gif-sur-Yvette, France). The MR scanner was equipped with a strong gradient set (G_{max}=780 mT/m, slew-rate=9500 T/m/s) and a 40 mm Bruker ¹H transmit-receive volume coil. Anatomical MR images of the quail heads were realized using a T₂-weighted 2D spin echo (SE) sequence with the following parameters: isotropic 150 μm voxel resolution, flip angle FA=90°, echo time TE=16 ms, repetition time TR=9000 ms, read bandwidth=65789.5 Hz, 8 averages and 1 repetition, total scan duration of 2h45 min.

Template creation

From the MRI SE images, brain masks were manually drawn using ITK-Snap software (version 3.6, <http://www.itksnap.org>, Yushkevich et al. 2006) to enable 'skull-stripping', before being realigned in the AC-PC plane (anterior commissure – posterior commissure).

These 20 brain images were used to create the population-average using the `antsMultivariateTemplateConstruction2.sh` function of the ANTS toolkit (Avants et al. 2008; Avants et al. 2011; Avants and Gee 2004). Briefly, template construction involved:

- 1) Creating an initial target template by averaging the skull-stripped images;
- 2) Pairwise normalization of each skull-stripped image to the target template;
- 3) Create new target template by averaging the normalized images output during step 2;
- 4) Transform the new target template by the average inverse affine transform and the average inverse warp field multiplied by a scaling factor (0.2);
- 5) Iterate steps 2 to 4 four times.

Atlas creation

Segmentation

The segmentation was manually completed by three experts in neuroanatomy (MS, MM, EC) using the ITK-Snap software. During segmentation contrast level, colormap and zoom level were modified to optimize the delineation of each region. The entire right hemisphere was segmented before the left.

The brain is commonly segmented into telencephalon, diencephalon, etc. according to the embryonic vesicles development in the aim to compare the bird and mammalian brains (Reiner et al. 2004; Jarvis et al. 2013; Puelles et al. 2019). However, in the current work we used a combination of MRI contrast, anatomical landmarks and other sources of neuroanatomy, in particular Puelles et al., 2019, to complete the segmentation (Fig 1). For example, based on MRI contrast and external landmarks, we were able to identify the apical and ventral part of the hyperpallium. Dorsally, the apical hyperpallium appeared as a gray area visible on the sagittal plane. Ventrally, its limit was not easy to identify, especially in its lateral borders. Yet, we could see a thin, weaker contrast layer (about 2 to 4 voxels thick) that forms the ventral hyperpallium. The limit between these two parts was easily visible by the shape of the brain that forms the vallicula. However, we were unable to completely segment some known brain regions using this procedure. Subsequently, some brain nuclei were segmented as a unique region of interest, such as for the parts of mesencephalic

substantia nigra or for the accessory oculomotor nuclei (see Table 1 for more details). In addition, based on image contrast we were able to distinguish different subparts of several regions (*e.g.*, hindbrain and optic tectum) but we were unable to individually label these parts based on other sources of neuroanatomy.

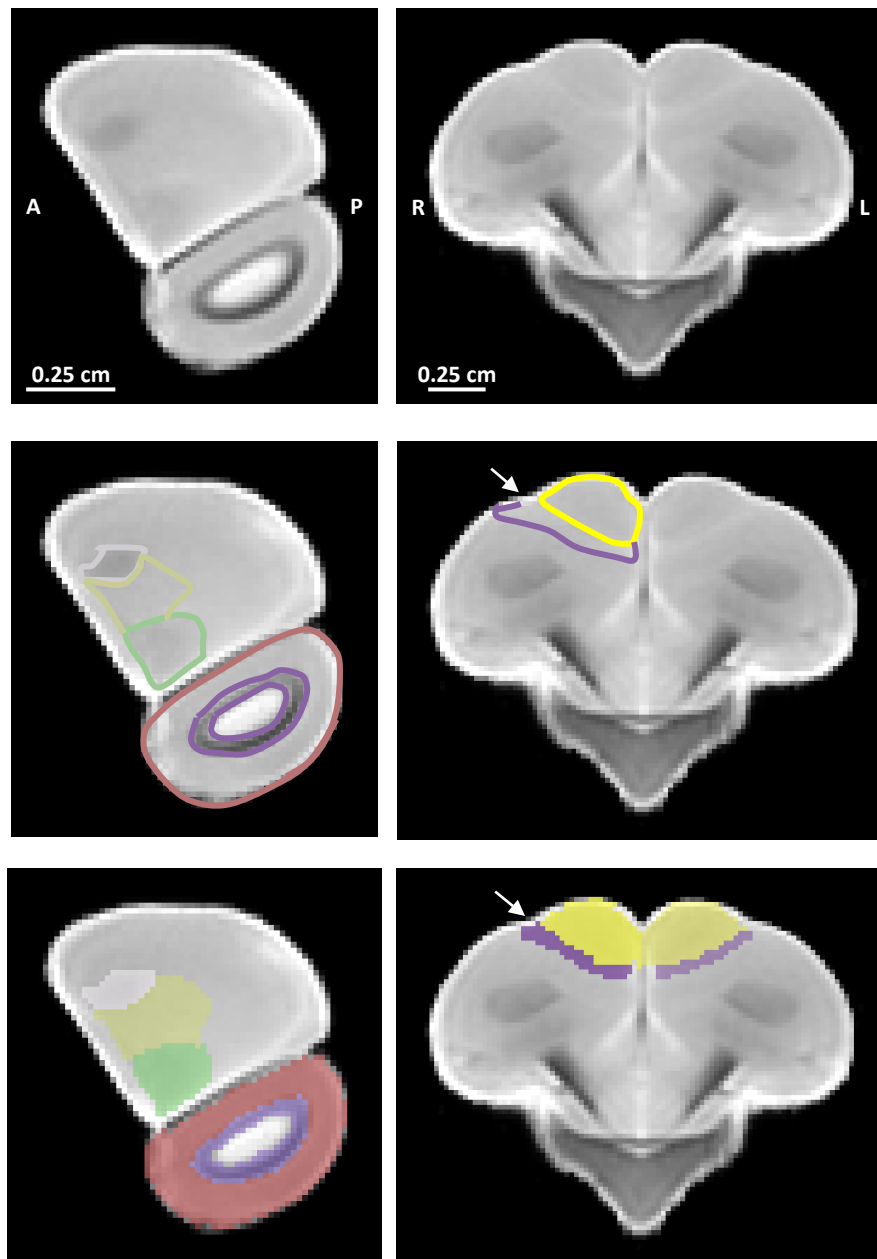


Fig. 1 Pictures of the different steps of segmentation. First brain regions were identified in the template (top and middle) and were then segmented (bottom) according to sagittal (left) and coronal (right) sections of the template. Image contrast was used for most of the regions such as entopallium (1), lateral striatum (2), amygdaloid complex (3), optic tectum (4) and periventricular and central stratum (5). In other cases, image contrast and external landmarks were used to identify the border of brain regions such as the apical (6) and ventral (7) hyperpallium, which are separated by the valleculla (arrow). (A, anterior; P, posterior; R, right; L, left)

Labellisation (Table 1)

We defined the name of segmented regions using the Puelles et al. 2019 atlas of the chick brain as our main reference and sometimes other references for specific regions. For example, in the periaqueductal gray (PAG), there is a distinction between this region based on an anatomical or a neurochemical criterion. In this case, we chose to dissociate two different parts of PAG: the dorsolateral part (neurochemical, Kingsbury et al. 2011) and medioventral part (anatomical, Puelles et al., 2019). Another example concerning the entopallium: this region is clearly visible on the MRI quail brain template. Named entopallium in several previous publications (Butler and Cotterill 2006; Wylie et al. 2009; Xiao and Güntürkün 2018), it is named visual core and shell nuclei by Puelles et al. 2019 in the chick brain atlas. We chose to keep the name entopallium.

Name of the regions labeled in the quail brain atlas	LUT number (Left-Right)	Partonomy describing the brain organization		
		according to the embryonic vesicles	according to the mammalian brain	according to the chick brain atlas
Olfactory bulb	1-101	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Pallium	2-102	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Apical hyperpallium	3-103	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Ventral hyperpallium	4-104	Forebrain	Telencephalon	Pallium
		<i>This region includes intermediate and densocellular hyperpallium.</i>		
Hippocampus	5-105	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Mesopallium	6-106	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Nidopallium	7-107	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Auditory parts of the nidopallium	8-108	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Auditory Field L2	9-109	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Entopallium	10-110	Forebrain	Telencephalon	Pallium
		<i>This region is also named visual nuclei of the nidopallium.</i>		
Anterior amygdala area	11-111	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Arcopallium-amygdaloïd complex	12-112	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Extended amygdala	13-113	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Amygdaloïd taenial area	14-114	Forebrain	Telencephalon	Pallium
		<i>This region includes the amygdaloid taenial nucleus and parataenial area of the amygdala</i>		
Basal somatosensory nucleus of the nidopallium	15-115	Forebrain	Telencephalon	Pallium
Striatopallidal area	16-116	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Lateral striatum	17-117	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Striatum	18-118	Forebrain	Telencephalon	Subpallium

Accumbens nucleus	19-119	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Bed nucleus of the stria terminalis	20-120	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Nucleus of the diagonal band	21-121	Forebrain <i>This region includes the nucleus of the vertical limb and the nucleus of the horizontal limb of the diagonal band</i>	Telencephalon	Subpallium
Lateral septum	22-122	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Septum	23-123	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Caudocentral septal area	24-124	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Basal nucleus of Meynert	25-125	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Preoptic area	26-126	Forebrain	Diencephalon	Subpallium
Lateral preoptic area	27-127	Forebrain	Diencephalon	Subpallium
Hypothalamus	28-128	Forebrain	Diencephalon	Hypothalamus and secondary prosencephalon
Lateral hypothalamus	29-129	Forebrain	Diencephalon	Hypothalamus and secondary prosencephalon
Thalamus	30-130	Forebrain <i>This region includes the different parts of the thalamus which were not segmented</i>	Diencephalon	Thalamus
Dorsolateral anterior nucleus of the thalamus	31-131	Forebrain	Diencephalon	Thalamus
Dorsomedial anterior nucleus of the thalamus	32-132	Forebrain	Diencephalon	Thalamus
Dorsal paraventricular nucleus of the thalamus	33-133	Forebrain	Diencephalon	Thalamus
Rotundus nucleus	34-134	Forebrain	Diencephalon	Thalamus
Subgeniculate nucleus	35-135	Forebrain	Diencephalon	Prethalamus
Dorsal lateral geniculate nucleus	36-136	Forebrain	Diencephalon	Thalamus
Anterior pretectal and subpretectal nuclei	37-137	Midbrain <i>This region includes all the parts of anterior and intermediate pretectal nuclei.</i>	Mesencephalon	Pretectum
Diffuse pretectal area	38-138	Midbrain <i>This region includes the principal pretectal nucleus (also named principal pretectal nucleus of the commissural pretectum).</i>	Mesencephalon	Pretectum
Tectal gray	39-139	Midbrain <i>This region includes the superficial and the central stratum of the central gray and probably the periventricular stratum.</i>	Mesencephalon	Mesencephalon
Optic tectum	40-140	Midbrain <i>This region includes the different layers of the optic tectum (stratum griseum and fibrosum superficiale).</i>	Mesencephalon	Mesencephalon
Periventricular and central stratum	41-141	Midbrain <i>This region was delineated according to its contrast, which was darker than its adjacent areas. It includes the stratum griseum periventricular (SPV), a very thin layer in the optic tectum in border of the ventricle, the stratum album centrale (SAC) of the optic tectum, and overlaps the stratum griseum central of the optic tectum because the border with the next layer of the optic tectum was weakly detectable.</i>	Mesencephalon	Mesencephalon
Midbrain vocal area	42-142	Midbrain	Mesencephalon	Mesencephalon
Mesencephalic reticular formation	43-143	Midbrain	Mesencephalon	Mesencephalon
Preisthmic region of the midbrain	44-144	Midbrain <i>This region includes the magnocellular preisthmic nucleus (Puelles et al 2019)</i>	Mesencephalon	Mesencephalon
Isthmic nucleus	45-145	Midbrain	Mesencephalon	Isthmus
Dorsal nucleus of the lateral lemniscus	46-146	Midbrain	Mesencephalon	Isthmus

Substantia nigra	47-147	Midbrain Mesencephalon <i>This region includes the reticular and compacta pars of the mesencephalic substantia nigra</i>	Mesencephalon
Midbrain	49-149	Midbrain Mesencephalon <i>This region gathers all the unsegmented brain regions located between the most caudal diencephalic brain regions, such as thalamus, and the hindbrain. In the template the border between the midbrain and the rostral hindbrain was defined by the weak grey level band observed from the dorsal border of the oculomotor nerve and the longitudinal fasciculus</i>	Mesencephalon
Dorsal part of the periaqueductal gray	56-156	Midbrain	Mesencephalon
Medioventral part of the periaqueductal gray	57-157	Midbrain	Mesencephalon
Accessory oculomotor nuclei	58-158	Midbrain <i>This region includes the Edinger-Westphal nucleus and the Darkschewitsch nucleus. It is observed ventrally to the medioventral part of the periaqueductal gray and dorsally to the longitudinal fasciculus</i>	Pretectum
Rostral hindbrain	59-159	Hindbrain	Mesencephalon, Myelencephalon Rhombencephalon
Semilunar nucleus	60-160	Hindbrain	Mesencephalon, Myelencephalon Rhombencephalon
Ventral tegmental area	61-161	Hindbrain	Mesencephalon Isthmus, mesencephalon, pretectum, thalamus, prethalamus, secondary prosencephalon
Ambiguous nucleus	62-162	Hindbrain	Myelencephalon Rhombencephalon
Caudal hindbrain	71-171	Hindbrain	Myelencephalon Rhombencephalon
Olivary cochlear area	72-172	Hindbrain	Mesencephalon, Myelencephalon, Pons Rhombencephalon
Lateral pontine nucleus	73-173	Hindbrain	Pons Rhombencephalon
Olfactory tract	201-301	Forebrain <i>This region includes the medial, lateral and ventral olfactory tracts.</i>	Telencephalon Pallium
Unknown rostralateral band	202-302	Forebrain <i>This region was darker than the adjacent areas with a shape of diagonal band. This part was not identified in the chick brain atlas</i>	Telencephalon
Corticomesencephalic tract	203-303		Pallium <i>This tract was also named septopalliomesencephalic tract</i>
Frontoamygdaloïd tract	204-304	Forebrain	Telencephalon Pallium
Amygdalohypothalamic tract	205-305	Forebrain	Telencephalon, Diencephalon Pallium
Amygdalofugal tract	206-306		Pallium
Lateral forebrain bundle	207-307		Pallium
Medial forebrain bundle	208-308		Pallium
Optic tract	209-309		Subthalamus, secondary prosencephalon
Nigrostriatal tract	210-310		Pallium
Quintofrontal tract	211-311		Pallium
Oculomotor nerve	212-312		Mesencephalon
Tectopretectal tract	213-313		Mesencephalon
Tectothalamic tract	214-314		Mesencephalon
Tectotegmental tract	215-315		Mesencephalon
Isthmotectal tract	216-316		Isthmus
Isthmooptic tract	217-317		Isthmus

Tectotegmental decussation	218-318	Mesencephalon <i>This region includes the dorsal and ventral parts of the tectotegmental decussation.</i>		
Medial longitudinal fasciculus	219-319	Rhombencephalon		
Lobule 1 of the cerebellum (Cb)	501-531	Cerebellum		
Lobule 2 of the Cb	502-532	Cerebellum		
Lobule 3 of the Cb	503-533	Cerebellum		
Lobule 4 of the Cb	504-534	Cerebellum		
Lobule 5 of the Cb	505-535	Cerebellum		
Lobule 6 of the Cb	506-536	Cerebellum		
Lobule 7 of the Cb	507-537	Cerebellum		
Lobule 8 of the Cb	508-538	Cerebellum		
Lobule 9 of the Cb	509-539	Cerebellum		
Lobule 10 of the Cb	510-540	Cerebellum		
Medial cerebellum nucleus	511-541	Cerebellum		
Lateral cerebellum nucleus	512-542	Cerebellum		
Cerebellar white matter	525-555	Cerebellum		
Cerebellar peduncles	526-556	Cerebellum		
Mammillary bodies	48	Forebrain	Diencephalon	Secondary prosencephalon
Optic chiasm	401	Forebrain	Diencephalon	Secondary prosencephalon
Hippocampal commissure	402	Forebrain	Telencephalon	Subpallium
Anterior commissure	403	Forebrain	Telencephalon	Secondary prosencephalon
		<i>The extern lateral limits of the region were differently defined according to the literature. In Poissenot et al. (2019), the lateral borders were defined as the occipitomesencephalicus tract whereas there were included in the anterior commissure for Puellas et al. (2019).</i>		
Supraoptic decussation	404	Forebrain	Diencephalon	Subpallium
Posterior commissure	405	Preteectum		
Vestibular commissure	406	Rhombencephalon		
Cochlear decussation	407	Rhombencephalon		
Decussation of the solitary tract	408	Rhombencephalon		
Pineal gland	601			
Pituitary gland	602			
Ventricular system	701			

Table 1 List of the brain regions labeled in the quail brain atlas, according to the embryonic vesicles, the mammalian brain (neurolex.org) and the chick brain atlas (Puellas et al. 2019). Each bilateral brain region is numbered in the Look-Up-Table (LUT) according to the left (1-100) and the right (101-199) hemisphere, except the mammillary bodies segmented as a unique region (label 48). Specific LUT-values are used for interhemispheric tracts (401- 408), endocrine glands (601, 602) and ventricular system (701)

Volume comparison

The created template and atlas were used to automatically segment the regions of the atlas in each of the 20 individual brains. The function antsRegistrationSyN.sh (Avants et al. 2011;

Tustison and Avants 2013) was used to compute a non-linear transformation between each individual's MRI SE image and the template. Using `antsApplyTransforms` this transformation from template to individual was applied to the atlas file - each voxel of an individual brain was thus labelled as a specific region. Each individual atlas-based segmentation was verified and none required obvious manual correction.

For each individual the total brain volume (mm^3) and the volume of each segmented region were calculated (number of voxels in the region multiplied by the volume of a voxel, ($150 \mu\text{m}$)³). To remove the potential confound of intersubject variability of total brain volume the region analysis was conducted on relative region volumes. The relative volume of each region, expressed as a proportion, was calculated by dividing its volume by the individual's total brain volume and multiplying by 100.

All statistical tests were conducted using R software (R Core Team, 2020). To examine the impact of genetic selection of high-trait emotivity, independent sample t-tests (function `t_test` from the `rstatix` package; Kassambara 2020) were used to compare the volume of the whole brain and the relative volumes of interhemispheric regions between STI and LTI lines. For bilateral relative region volumes mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Hemisphere (right/left) as a within factor and Line (STI/LTI) as a between factor. ANOVA and t-test assumptions were checked using Shapiro-Wilk normality test (function `shapiro_test` from the `rstatix` package) and Levene's test for homogeneity of variance (function `levene_test` from the `rstatix` package). Eighteen regions did not meet the normality assumption and 6 did not meet the homogeneity of variance assumption. For these regions we subjectively investigated the data. Statistical tests were conducted only for regions meeting the assumptions. Statistical significance was assessed at $p < 0.05$. As this work is exploratory we chose to not correct for multiple comparisons that would require to divide the significance threshold by the number of brain regions.

Results

Template and atlas presentation

In this work a population-averaged MRI template of the male Japanese quail brain (Fig 2), an accompanying manually segmented digital atlas (Fig 3) and a nomenclature were successfully created. They are openly available for download

(<https://doi.org/10.5281/zenodo.4700522>) under the Creative Commons Attribution 4.0 International license. The template and atlas images are provided in compressed NIfTI-1 format (nii.gz). A Look-Up-Table (LUT) containing the correspondence between a region's nomenclature, segmentation label, RGB color and transparency value (100% for left hemisphere and interhemispheric, and 65% for right hemisphere) is also provided in the format required by the ITK-Snap software. The template and the atlas are in the same space, oriented in the AC-PC plane. The X axis corresponds to the left to right anatomical axis, the Y axis corresponds to the posterior to anterior axis and the Z axis corresponds to the inferior to superior axis.

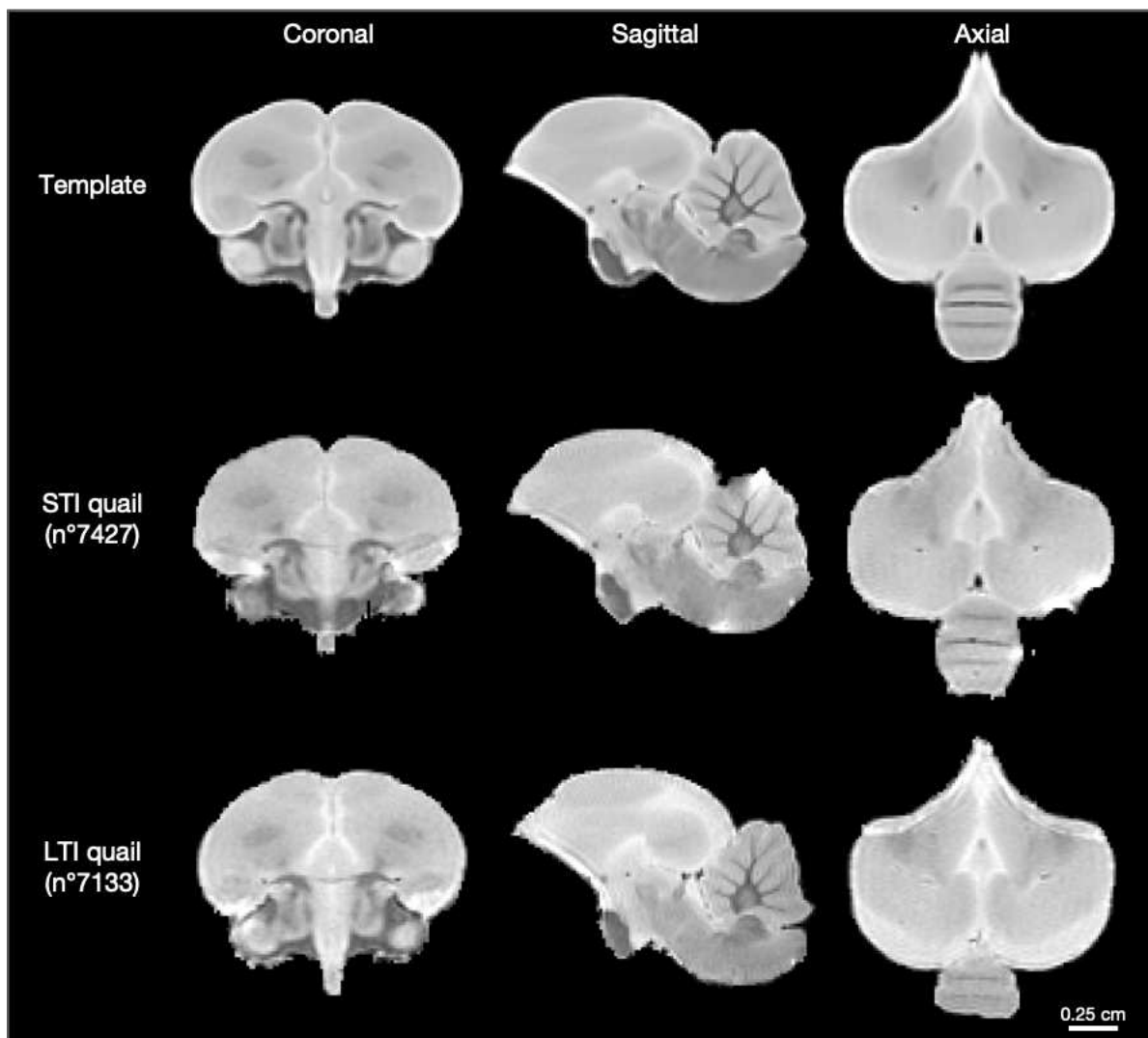


Fig. 2 Template (top) and two individual quail brain (middle, STI quail 7427 and bottom, LTI quail 7133) pictures of coronal (left), sagittal (middle) and axial (right) sections of the male Japanese quail

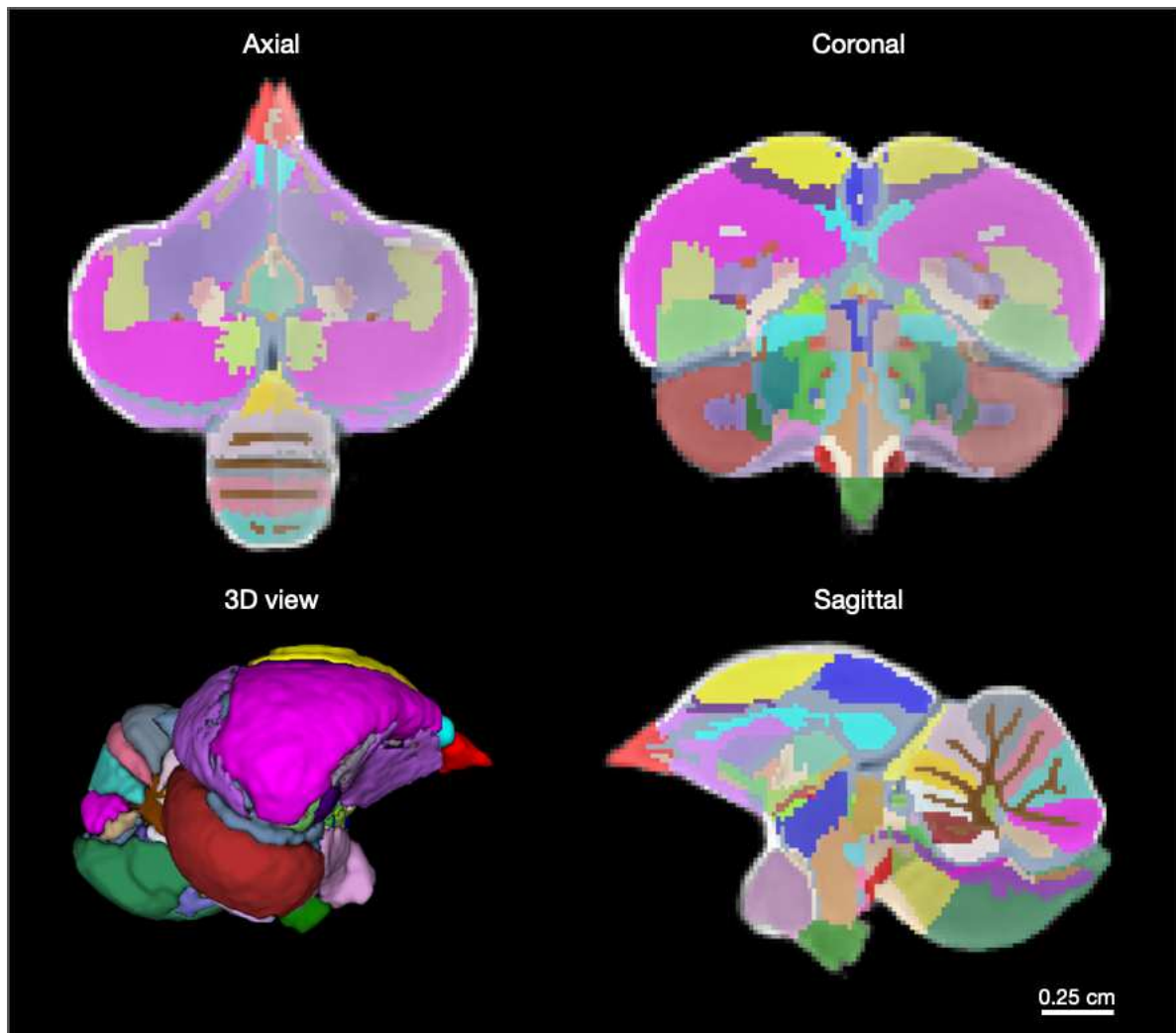


Fig. 3 Pictures of the manually segmented Japanese quail atlas, represented in the three spatial views: axial (top left), coronal (top right), sagittal (bottom right) and in 3D view (bottom left)

The success and quality of the template creation procedure can be seen when compared to individual quail brain images. The template produced displays less noise, increased contrast between gray and white matter and enhanced delineation of anatomical regions compared to individuals (Fig 2). The atlas contains the greatest number of regions of interest that we were capable of segmenting using the image contrast and anatomical landmarks of the template. In this context, the MRI atlas of the male Japanese quail brain comprises 194 segmented regions of interest. It includes 191 brain regions (9 interhemispheric, 91 left and 91 right hemisphere), the ventricular system and the pineal and pituitary glands (Fig 3). In Table 1 these regions were classified following three different types of organization: according to the embryonic vesicles, according to the mammalian brain (neurolex.org) and according to the chick brain atlas (Puelles et al. 2019). Furthermore, for certain regions Table 1 includes

details of, for example, the nomenclature for the region used in other publications and/or the nomenclature of regions that could not be segmented individually but were instead incorporated within a larger segmented region of interest.

Global view

Mean brain volume of STI ($925 \pm 62.2 \text{ mm}^3$) and LTI ($917.1 \pm 63.2 \text{ mm}^3$) quails were not statistically different ($t=-0.56$, $p=0.58$). The importance of analyzing the volume of each region relative to total brain volume was confirmed by the large variability of total brain volume in each group (range: STI, 852.5 - 1006 mm^3 ; LTI, 781.6 - 984.3 mm^3 ; Table 2).

STI	929.8	1006	853.2	981.7	852.5	904.2	1000	976.4	854.2	894.9
LTI	921.7	984.3	941.6	887.1	947.8	823	964.9	882.1	781.6	957.8

Table 2 Individual total brain mask volumes (mm^3) for Short (STI) and Long (LTI) Tonic Immobility quails. The total volume includes the pituitary and pineal glands volumes

Concerning the region volumes, the statistical assumptions were tested for 100 brain regions (91 bilateral and 9 interhemispheric regions), the pineal and pituitary glands. The statistical assumptions were not met for 22 bilateral and 2 interhemispheric regions. No further statistical analyses were conducted for these regions. The effects of line, hemisphere and their interaction were tested on 69 bilateral regions and the effect of line was tested on 7 interhemispheric regions and the pineal and pituitary glands.

For 9 regions, we found a significant interaction between line and hemisphere (see Table 3, 4 and 5 for all statistical details and Supplementary file 1). For 33 regions, we found a significant difference between STI and LTI quails, with larger relative volumes mainly being found in STI (24/33 regions) rather than in LTI (9/33 regions). For 53 regions, we found a significant difference between the left and right hemispheres, with larger relative volumes in the left hemisphere for 31 of them.

Regions involved in sensory processing (see Table 3)

Brain region	LTI quails		STI quails		Statistical values		
	Left-H	Right-H	Left-H	Right-H	Line	Hemisphere	Interaction
Olfactory							
Olfactory bulb	0.139 ± 0.015	0.171 ± 0.014	0.139 ± 0.009	0.169 ± 0.016	F=0.007 p=0.935	F=160.733 p<0.0001	F=0.176 p=0.68
Olfactory tract	0.189 ± 0.009	0.097 ± 0.005	0.204 ± 0.01	<u>0.103 ± 0.007</u>	F=11.837 p=0.003	F=2660.301 p<0.0001	F=5.965 p=0.025
Auditory							
Midbrain vocal area	0.263 ± 0.018	0.251 ± 0.019	0.31 ± 0.028	<u>0.299 ± 0.033</u>	F=19.872 p=0.0003	F=13.801 p=0.002	F=0.0005 p=0.982
Dorsal nucleus of the lateral lemniscus	0.106 ± 0.008	0.097 ± 0.009	0.117 ± 0.012	<u>0.11 ± 0.01</u>	F=8.333 p=0.01	F=44.094 p<0.0001	F=0.395 p=0.538
Olivary cochlear area ##	0.278 ± 0.026	0.283 ± 0.025	0.262 ± 0.016	0.257 ± 0.024			
Visual							
Optic tectum	3.312 ± 0.158	3.33 ± 0.186	<u>3.805 ± 0.204</u>	3.92 ± 0.261	F=35.716 p<0.0001	F=17.085 p=0.0006	F=9.115 p=0.007
Mesencephalic reticular formation	0.14 ± 0.011	0.162 ± 0.012	<u>0.157 ± 0.012</u>	0.187 ± 0.017	F=14.294 p=0.001	F=257.966 p<0.0001	F=7.683 p=0.013
Isthmic nucleus	0.104 ± 0.009	0.102 ± 0.008	<u>0.115 ± 0.01</u>	<u>0.12 ± 0.012</u>	F=12.537 p=0.002	F=1.191 p=0.29	F=6.153 p=0.023
Rotundus nucleus	0.169 ± 0.018	0.184 ± 0.02	<u>0.188 ± 0.016</u>	0.199 ± 0.012	F=5.622 p=0.029	F=99.775 p<0.0001	F=1.8 p=0.196
Periventricular and central stratum	0.586 ± 0.04	0.571 ± 0.038	0.715 ± 0.045	<u>0.7 ± 0.045</u>	F=49.388 p<0.0001	F=12.259 p=0.003	F=0.0001 p=0.993
Dorsal lateral geniculate nucleus	0.021 ± 0.002	0.022 ± 0.002	<u>0.023 ± 0.001</u>	<u>0.024 ± 0.003</u>	F=4.491 p=0.048	F=3.411 p=0.081	F=0.183 p=0.674
Ventral hyperpallium	0.972 ± 0.051	0.791 ± 0.056	1.02 ± 0.061	<u>0.847 ± 0.055</u>	F=4.781 p=0.042	F=567.419 p<0.0001	F=0.271 p=0.609
Tectopretectal tract	0.047 ± 0.006	0.051 ± 0.006	<u>0.057 ± 0.005</u>	0.06 ± 0.005	F=16.646 p=0.0007	F=13.985 p=0.001	F=0.136 p=0.717
Tectotegmental tract	0.022 ± 0.003	0.018 ± 0.003	0.025 ± 0.002	<u>0.021 ± 0.002</u>	F=11.538 p=0.003	F=54.351 p<0.0001	F=0.248 p=0.624
Isthmotectal tract	0.008 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.011 ± 0.001	<u>0.006 ± 0.001</u>	F=21.219 p=0.0002	F=169.043 p<0.0001	F=4.137 p=0.057
Tectal gray #	0.103 ± 0.006	0.088 ± 0.009	0.112 ± 0.009	0.095 ± 0.009			
Tectotegmental decussation #	0.034 ± 0.002	0.03 ± 0.002	0.037 ± 0.004	0.033 ± 0.002			
Entopallium	0.681 ± 0.058	0.628 ± 0.045	0.626 ± 0.038	<u>0.565 ± 0.029</u>	F=9.804 p=0.006	F=105.449 p<0.0001	F=0.467 p=0.503
Optic tract	0.628 ± 0.07	0.681 ± 0.08	0.61 ± 0.041	0.655 ± 0.045	F=0.69 p=0.417	F=47.055 p<0.0001	F=0.372 p=0.549
Oculomotor nerve	0.063 ± 0.007	0.066 ± 0.006	0.063 ± 0.008	0.069 ± 0.008	F=0.353 p=0.56	F=4.876 p=0.04	F=0.661 p=0.427
Isthmo optic tract	0.012 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.005 ± 0.001	F=0.179 p=0.677	F=778.645 p<0.0001	F=2.167 p=0.158
Mesopallium	0.729 ± 0.06	0.756 ± 0.06	<u>0.829 ± 0.067</u>	0.853 ± 0.092	F=10.054 p=0.005	F=15.019 p=0.001	F=0.043 p=0.839
Auditory parts of the nidopallium	0.773 ± 0.089	0.756 ± 0.07	0.745 ± 0.044	0.723 ± 0.061	F=1.115 p=0.305	F=3.211 p=0.09	F=0.041 p=0.842
Auditory Field L2	0.145 ± 0.026	0.145 ± 0.025	0.131 ± 0.013	0.131 ± 0.017	F=2.424 p=0.137	F=0.006 p=0.938	F=0.003 p=0.954
Basal somatosensory nucleus of the nidopallium #	0.058 ± 0.004	0.066 ± 0.003	0.059 ± 0.007	0.067 ± 0.007			
Basal nucleus of Meynert #	0.152 ± 0.009	0.146 ± 0.011	0.154 ± 0.007	0.138 ± 0.007			
Diffuse pretectal area #	0.068 ± 0.007	0.07 ± 0.006	0.088 ± 0.009	0.085 ± 0.01			
Interhemispheric regions							
Brain region	LTI quail	STI quail	Statistical values (Line effect)				
Optic chiasm	1.415 ± 0.116	1.39 ± 0.072	t=0.561, p=0.582				
Supraoptic decussation	0.245 ± 0.026	0.241 ± 0.014	t=0.4245, p=0.676				
Cochlear decussation	<u>0.132 ± 0.012</u>	0.119 ± 0.01	t=2.4964, p=0.0225				

Table 3 Relative volumes (mean % \pm standard error) of brain regions involved in sensory processing according to the hemisphere (Left-H, left hemisphere; Right-H, right hemisphere). Statistical values in bold indicate a significant effect ($p < 0.05$) of the tested factors (line, hemisphere and interaction for bilateral regions; line for interhemispheric regions). The highest significant values observed for line are underlined, for hemisphere are bold. For the regions with no statistical analysis, the # indicates that the assumption of normality was not met and the ## indicates that the assumption of equality of variance was not met

Olfactory:

There was no significant difference between the lines for the relative volume of the olfactory bulb, which was significantly larger in the right than in the left hemisphere. In contrast, there was a significant interaction between lines and hemispheres for the olfactory tract. Its relative volume was larger for STI than for LTI quails and this difference was larger in the left hemisphere than in the right.

Auditory:

The relative volume of the midbrain vocal area and the dorsal nucleus of the lateral lemniscus were significantly smaller in LTI than in STI and larger in the left than in the right hemisphere. Subjective observation of the data also indicates a larger relative volume of the olivary cochlear area in LTI than in STI.

Visual:

For optic tectum (Fig 4), mesencephalic reticular formation and isthmic nucleus, there were significant interactions between lines and hemispheres. For each, relative volume was smaller in LTI than STI with this difference being larger in the right than the left hemisphere. Similarly, LTI presented smaller relative volumes than STI for rotundus nucleus (Fig 4), periventricular and central stratum, dorsal lateral geniculate nucleus, ventral hyperpallium and for tectopretectal, tectotegmental and isthmotectal tracts. Moreover, subjective observations of the tectal gray and tectotegmental decussation indicated the same effect. In contrast, the opposite effect (LTI larger than STI) was found for the relative volume of the entopallium (Fig 4). The relative volume of the rotundus nucleus, tectopretectal tract, optic tract and oculomotor nerve were significantly larger in the right than in the left hemisphere. In contrast, the relative volume of entopallium, periventricular and central stratum, ventral hyperpallium and tectotegmental, isthmotectal and isthmooptic tracts were significantly larger in the left than the right hemisphere. Subjective observation of the data indicates a

larger relative volume of tectal gray and tectotegmental decussation in the left than in the right hemisphere.

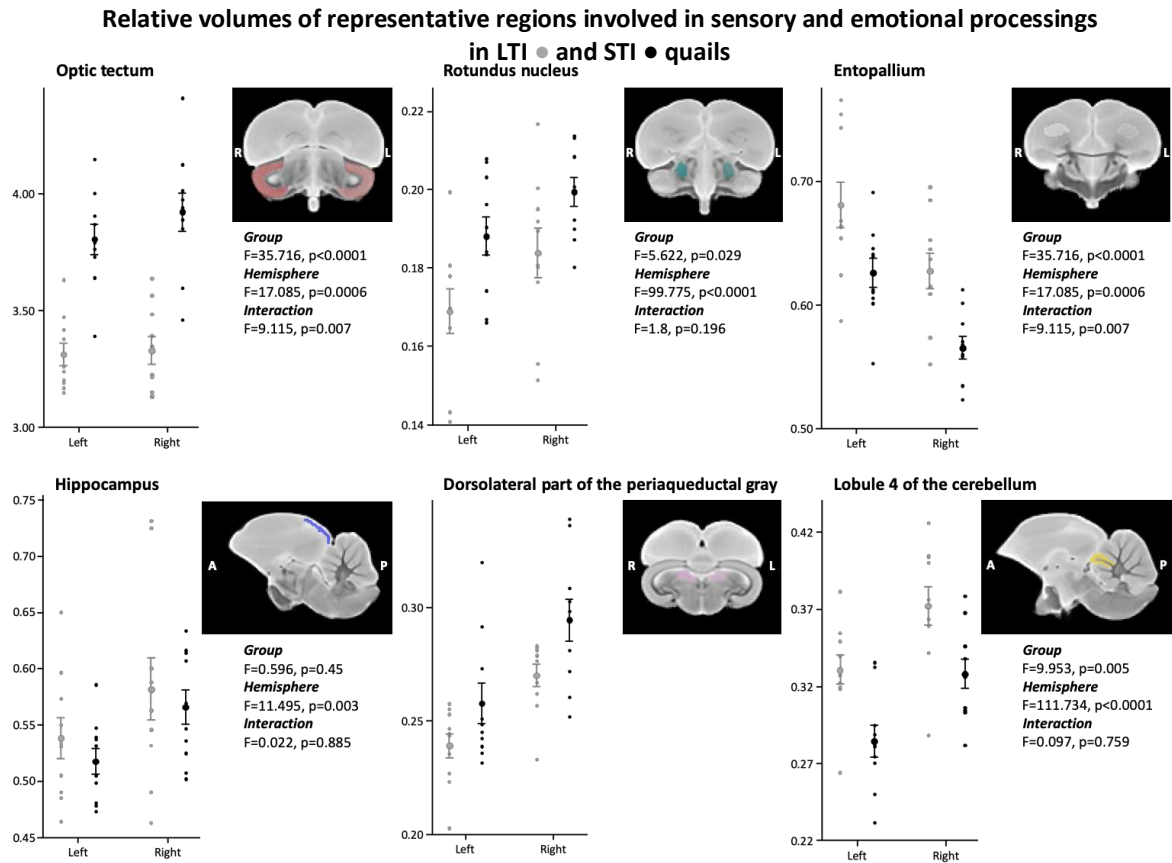


Fig. 4 Impact of high-trait emotivity selection on relative volumes (% of total brain volume) of brain regions involved in sensory (optic tectum, rotundus nucleus, entopallium) and emotional (hippocampus, dorsolateral part of the periaqueductal gray, lobule 4 of the cerebellum) processing. Individual (small dots), mean (large dots) and standard error values (error bars) are represented in grey for LTI and in black for STI quails, according to the left and right hemispheres. Note the lack of statistical values for the dorsolateral part of the periaqueductal gray that did not meet the statistical assumptions. (R, right; L, left; A, anterior; P, posterior)

Moreover, the relative volume of the mesopallium, which is involved in both auditory and visual processing, was smaller in LTI than in STI and the right hemisphere was larger than the left.

Regions involved in emotional processing (see Table 4)

Brain region	LTI quails		STI quails		Statistical values		
	Left-H	Right-H	Left-H	Right-H	Line	Hemisphere	Interaction
Extended amygdala	0.198 ± 0.009	0.174 ± 0.01	0.2 ± 0.013	0.184 ± 0.006	F=2.666 p=0.12	F=78.924 p<0.0001	F=3.2 p=0.091
Frontoamygdaloid tract	0.055 ± 0.004	0.05 ± 0.005	0.051 ± 0.003	0.049 ± 0.003	F=2.924 p=0.104	F=10.265 p=0.005	F=0.796 p=0.384
Amygdalohypothalamic tract	0.024 ± 0.002	0.022 ± 0.003	0.024 ± 0.002	0.023 ± 0.003	F=0.021 p=0.885	F=9.203 p=0.007	F=0.034 p=0.855
Anterior amygdala area ##	0.074 ± 0.002	0.087 ± 0.005	0.069 ± 0.006	0.083 ± 0.008			
Arcopallium-amygdaloid complex #	0.572 ± 0.036	0.646 ± 0.044	0.573 ± 0.027	0.637 ± 0.031			
Amygdaloid taenial area #	0.094 ± 0.004	0.096 ± 0.008	0.092 ± 0.007	0.089 ± 0.007			
Bed nucleus of stria terminalis	0.193 ± 0.012	0.231 ± 0.008	0.192 ± 0.013	0.221 ± 0.013	F=1.302 p=0.269	F=280.949 p<0.0001	F=5.093 p=0.037
Substantia nigra	0.082 ± 0.007	0.083 ± 0.007	<u>0.093 ± 0.007</u>	<u>0.099 ± 0.007</u>	F=20.415 p=0.0003	F=12.602 p=0.002	F=6.591 p=0.019
Thalamus	0.364 ± 0.018	0.338 ± 0.02	<u>0.399 ± 0.014</u>	<u>0.365 ± 0.018</u>	F=18.788 p=0.0004	F=83.755 p<0.0001	F=1.688 p=0.21
Dorsolateral anterior thalamic nucleus	0.18 ± 0.009	0.182 ± 0.011	<u>0.199 ± 0.015</u>	<u>0.208 ± 0.017</u>	F=15.961 p=0.0008	F=5.821 p=0.027	F=2.224 p=0.153
Dorsomedial anterior thalamic nucleus	0.1 ± 0.007	0.089 ± 0.004	<u>0.113 ± 0.016</u>	<u>0.095 ± 0.011</u>	F=7.723 p=0.012	F=20.885 p=0.0002	F=1.552 p=0.229
Lateral striatum	<u>0.558 ± 0.053</u>	<u>0.56 ± 0.041</u>	0.527 ± 0.034	0.513 ± 0.033	F=5.091 p=0.037	F=0.916 p=0.351	F=1.953 p=0.179
Lateral hypothalamus	0.142 ± 0.009	0.135 ± 0.011	<u>0.156 ± 0.012</u>	<u>0.141 ± 0.008</u>	F=6.726 p=0.018	F=24.059 p=0.0001	F=2.611 p=0.123
Septum	0.184 ± 0.011	0.179 ± 0.013	0.179 ± 0.013	0.168 ± 0.008	F=2.925 p=0.104	F=15.887 p=0.0009	F=1.864 p=0.189
Caudocentral septal area	0.021 ± 0.002	0.023 ± 0.002	0.022 ± 0.002	0.024 ± 0.003	F=1.169 p=0.294	F=8.436 p=0.009	F=0.263 p=0.614
Hypothalamus	0.201 ± 0.017	0.189 ± 0.02	0.206 ± 0.016	0.192 ± 0.017	F=0.37, p=0.551	F=18.959, p=0.0004	F=0.199 p=0.661
Hippocampus	0.538 ± 0.057	0.582 ± 0.088	0.518 ± 0.037	0.566 ± 0.049	F=0.596, p=0.45	F=11.495, p=0.003	F=0.022 p=0.885
Accessory oculomotor nuclei	0.04 ± 0.004	0.039 ± 0.003	0.044 ± 0.004	0.041 ± 0.003	F=3.286, p=0.087	F=5.202, p=0.035	F=1.706 p=0.208
Dorsal part of the PAG #	0.239 ± 0.017	0.27 ± 0.016	0.258 ± 0.028	0.294 ± 0.029			
Medioventral part of the PAG #	0.033 ± 0.004	0.022 ± 0.003	0.039 ± 0.009	0.025 ± 0.002			
Accumbens nucleus ##	0.049 ± 0.005	0.053 ± 0.004	0.054 ± 0.004	0.058 ± 0.002			
Lobule 1 of the cerebellum	0.14 ± 0.011	0.18 ± 0.017	0.133 ± 0.019	0.162 ± 0.018	F=3.009 p=0.1	F=429.64 p<0.0001	F=8.753 p=0.008
Lobule 2 of the cerebellum	<u>0.191 ± 0.018</u>	<u>0.194 ± 0.018</u>	0.156 ± 0.013	0.16 ± 0.009	F=31.278 p<0.0001	F=1.445 p=0.245	F=0.072 p=0.792
Lobule 3 of the cerebellum	<u>0.284 ± 0.033</u>	<u>0.269 ± 0.03</u>	0.234 ± 0.02	0.229 ± 0.017	F=16.885 p=0.0007	F=9.831 p=0.006	F=2.676 p=0.119
Lobule 4 of the cerebellum	<u>0.332 ± 0.031</u>	<u>0.373 ± 0.04</u>	0.284 ± 0.033	0.329 ± 0.031	F=9.953 p=0.005	F=111.734 p<0.0001	F=0.097 p=0.759

Lobule 5 of the cerebellum	<u>0.413</u> ± 0.047	<u>0.384</u> ± <u>0.04</u>	0.375 ± 0.035	0.354 ± 0.036	F=4.662 p=0.045	F=10.006 p=0.005	F=0.303 p=0.589
Lobule 6 of the cerebellum	0.755 ± 0.138	0.735 ± 0.125	0.674 ± 0.096	0.675 ± 0.084	F=2.052 p=0.169	F=0.592 p=0.452	F=0.764 p=0.394
Lobule 7 of the cerebellum	0.458 ± 0.057	0.425 ± 0.048	0.413 ± 0.047	0.389 ± 0.046	F=3.546 p=0.076	F=25.945 p<0.0001	F=0.667 p=0.425
Lobule 8 of the cerebellum	0.522 ± 0.079	0.481 ± 0.074	0.473 ± 0.035	0.442 ± 0.03	F=2.928 p=0.104	F=58.716 p<0.0001	F=1.063 p=0.316
Lobule 9 of the cerebellum	0.527 ± 0.085	0.476 ± 0.083	0.467 ± 0.051	0.436 ± 0.042	F=2.8 p=0.112	F=75.243 p<0.0001	F=4.512 p=0.048
Lobule 10 of the cerebellum	0.295 ± 0.033	0.291 ± 0.031	0.266 ± 0.043	0.263 ± 0.042	F=2.996 p=0.101	F=1.196 p=0.289	F=0.0001 p=0.992
Cerebellar white matter	<u>1.186</u> ± <u>0.103</u>	<u>1.055</u> ± <u>0.087</u>	1.026 ± 0.089	0.93 ± 0.066	F=13.95 p=0.002	F=188.163 p<0.0001	F=4.425 p=0.05
Cerebellar peduncles	0.084 ± 0.009	0.077 ± 0.005	0.084 ± 0.007	0.076 ± 0.005	F=0.018 p=0.896	F=25.305 p<0.0001	F=0.279 p=0.604
Medial cerebellum nucleus #	0.076 ± 0.006	0.068 ± 0.007	0.07 ± 0.011	0.064 ± 0.006			
Lateral cerebellum nucleus ##	0.018 ± 0.002	0.015 ± 0.001	0.019 ± 0.002	0.015 ± 0.002			
Nucleus of the diagonal band	0.112 ± 0.008	0.114 ± 0.008	0.115 ± 0.007	0.117 ± 0.007	F=0.572 p=0.459	F=4.141 p=0.057	F=0.06 p=0.81
Dorsal paraventricular nucleus of the thalamus #	0.196 ± 0.02	0.183 ± 0.015	0.228 ± 0.05	0.206 ± 0.019			
Striatum	1.37 ± 0.057	1.399 ± 0.059	1.381 ± 0.073	1.38 ± 0.059	F=0.02 p=0.89	F=2.524 p=0.13	F=2.599 p=0.124
Lateral septum #	0.099 ± 0.009	0.117 ± 0.011	0.1 ± 0.007	0.115 ± 0.01			
Interhemispheric regions							
Brain region	LTI quails	STI quails	Statistical values (Line effect)				
Hippocampal commissure	0.032 ± 0.003	0.033 ± 0.005	t=-0.4819, p=0.636				
Pineal gland	0.116 ± 0.015	<u>0.133</u> ± <u>0.016</u>	t=-2.4388, p=0.0253				
Pituitary gland	0.29 ± 0.05	0.281 ± 0.052	t=0.3913, p=0.7				

Table 4 Relative volumes (mean % ± standard error) of brain regions involved in emotional processing according to the hemisphere (Left-H, left hemisphere; Right-H, right hemisphere). Statistical values in bold indicate a significant effect (p<0.05) of the tested factors (line, hemisphere and interaction for bilateral regions; line for interhemispheric regions). The highest significant values observed for line are underlined, for hemisphere are bold. For the regions with no statistical analysis, the # indicates that the assumption of normality was not met and the ## indicates that the assumption of equality of variance was not met

For amygdala-related regions, the relative volumes of extended amygdala, frontoamygdaloid and amygdalohypothalamic tracts were significantly larger in the left than the right hemisphere. Moreover, subjective observation of the data indicates a larger relative volume of the anterior amygdala area in LTI than STI in both left and right hemispheres and a larger relative volume in the right than in the left hemisphere. Subjective observation of the data

also indicates that the relative volume of arcopallium-amygdaloïd complex was smaller in the left than in the right hemisphere. However, in the right hemisphere, LTI was larger than STI whereas there was no difference between lines in the left hemisphere. For amygdaloïd taenial area, subjective observation of the data indicates that the relative volume was larger in LTI than in STI only in the right hemisphere.

For the bed nucleus of stria terminalis and the substantia nigra, there were significant interactions between lines and hemispheres. The relative volume of the bed nucleus of stria terminalis was significantly larger for LTI than STI but only in the right hemisphere. The relative volume of the substantia nigra was smaller in LTI than STI in both hemispheres with the difference being larger in the right than the left hemisphere.

For thalamus, dorsolateral and dorsomedial anterior thalamic nuclei, there were significant differences between the lines. For each, relative volumes were smaller in LTI than STI. However, the relative volume of thalamus and dorsomedial anterior thalamic nucleus were significantly larger in the left than in the right hemisphere whereas the relative volume of dorsolateral anterior thalamic nucleus was smaller in the left than in the right hemisphere. Moreover, the relative volume of the lateral striatum was significantly larger in LTI than in STI whereas the relative volume of lateral hypothalamus was significantly smaller in LTI than in STI.

For septum, caudocentral septal area, hypothalamus, hippocampus (Fig 4), accessory oculomotor nuclei, there were significant differences between the hemispheres. The relative volume of septum, hypothalamus and accessory oculomotor nuclei were significantly larger in the left than in the right hemisphere. In contrast, the relative volume of caudocentral septal area and hippocampus were significantly smaller in the left than in the right hemisphere.

Subjective observation of the data indicates that the relative volumes of the dorsal (Fig 4) and medio ventral parts of the periaqueductal gray were smaller in LTI than in STI. However, the relative volume of the dorsal part of the periaqueductal gray was smaller in the left than in the right hemisphere whereas the relative volume of the medio-ventral part of the periaqueductal gray was larger in the left than in the right hemisphere. Subjective

observation of the data also indicates that the relative volume of the accumbens nucleus was smaller in LTI than in STI and smaller in the left than in the right hemisphere.

For the cerebellum, there were significant interactions between lines and hemispheres. The relative volume of lobule 1 was larger in LTI than STI only for the right hemisphere. For lobule 9 and cerebellum white matter, the relative volumes were significantly larger in LTI than STI in both hemispheres with the difference being larger in the left than in right hemisphere. The relative volumes of lobules 2, 3, 4 (Fig 4) and 5 were significantly larger in LTI than in STI. Moreover, the relative volumes of lobules 3, 5, 7, 8, 9 and cerebellar peduncle were significantly larger in the left than the right hemisphere whereas the relative volume of lobule 4 was significantly smaller in the left than the right hemisphere.

For the endocrine glands (pineal and pituitary), a significant difference was found for the pineal gland, which was smaller in LTI than STI.

Regions involved in other processing (see Table 5)

Brain region	LTI quails		STI quails		Statistical values		
	Left-H	Right-H	Left-H	Right-H	Line	Hemisphere	Interaction
Midbrain	1.059 ± 0.06	1.051 ± 0.071	<u>1.15 ± 0.051</u>	<u>1.138 ± 0.035</u>	F=14.735 p=0.001	F=1.057 p=0.318	F=0.036, p=0.851
Preoptic area	0.187 ± 0.013	0.191 ± 0.017	<u>0.203 ± 0.016</u>	<u>0.203 ± 0.018</u>	F=4.448 p=0.049	F=0.548 p=0.469	F=0.845 p=0.37
Preisthmic region of the midbrain	0.151 ± 0.01	0.118 ± 0.012	0.183 ± 0.009	<u>0.148 ± 0.015</u>	F=39.647 p<0.0001	F=330.034 p<0.0001	F=0.456 p=0.508
Apical hyperpallium	1.99 ± 0.113	2.029 ± 0.121	2.074 ± 0.093	2.138 ± 0.125	F=4.091, p=0.058	F=9.569 p=0.006	F=0.522 p=0.479
Nidopallium	8.34 ± 0.372	8.536 ± 0.364	8.066 ± 0.311	8.325 ± 0.291	F=2.957 p=0.103	F=18.204 p=0.0005	F=0.348 p=0.562
Ambiguous nucleus	0.012 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.014 ± 0.002	F=0.662, p=0.426	F=29.588 p<0.0001	F=0.657 p=0.428
Anterior pretectal and subpretectal nuclei	0.174 ± 0.017	0.162 ± 0.014	0.176 ± 0.015	0.16 ± 0.015	F=0 p=0.999	F=42.136 p<0.0001	F=0.646 p=0.432
Striatopallidal area	0.074 ± 0.005	0.067 ± 0.005	0.08 ± 0.008	0.07 ± 0.006	F=3.824 p=0.066	F=49.132 p<0.0001	F=0.811 p=0.38
Semilunar nucleus	0.052 ± 0.007	0.039 ± 0.004	0.055 ± 0.005	0.041 ± 0.004	F=1.486 p=0.239	F=145.881 p<0.0001	F=0.277 p=0.605
Ventral tegmental area	0.066 ± 0.006	0.059 ± 0.004	0.067 ± 0.007	0.059 ± 0.005	F=0.281 p=0.603	F=20.262 p=0.0003	F=0.012 p=0.913
Caudal hindbrain	2.942 ± 0.196	2.721 ± 0.208	2.964 ± 0.176	2.737 ± 0.181	F=0.052 p=0.823	F=164.425 p<0.0001	F=0.025 p=0.877
Lateral preoptic area	0.141 ± 0.011	0.141 ± 0.007	0.155 ± 0.011	0.142 ± 0.014	F=3.599 p=0.074	F=3.581 p=0.075	F=4.354 p=0.051
Rostral hindbrain #	0.814 ± 0.044	0.777 ± 0.043	0.838 ± 0.043	0.808 ± 0.033			
Lateral pontine nucleus #	0.08 ± 0.01	0.066 ± 0.005	0.075 ± 0.007	0.07 ± 0.011			
Unknown rostralateral band #	0.042 ± 0.003	0.043 ± 0.002	0.043 ± 0.004	0.042 ± 0.004			
Lateral forebrain bundle	0.073 ± 0.004	0.088 ± 0.005	0.077 ± 0.005	0.09 ± 0.006	F=2.997 p=0.101	F=230.682 p<0.0001	F=0.807 p=0.381
Medial forebrain bundle	0.046 ± 0.003	0.055 ± 0.003	<u>0.051 ± 0.004</u>	0.06 ± 0.005	F=9.429 p=0.007	F=114.559 p<0.0001	F=0.003 p=0.956

Nigrostriatal tract	0.051 ± 0.003	0.06 ± 0.005	0.051 ± 0.003	0.059 ± 0.004	F=0.247 p=0.625	F=70.433 p<0.0001	F=0.426 p=0.522
Tectothalamic tract	0.191 ± 0.019	0.211 ± 0.019	<u>0.207 ± 0.013</u>	0.234 ± 0.018	F=6.976 p=0.017	F=89.953 p<0.0001	F=2.042 p=0.17
Corticomesencephalic tract	0.239 ± 0.014	0.237 ± 0.02	0.23 ± 0.014	0.227 ± 0.012	F=2.241 p=0.152	F=0.559 p=0.464	F=0.015 p=0.904
Amygdalofugal tract	0.101 ± 0.009	0.105 ± 0.01	0.108 ± 0.008	0.111 ± 0.009	F=3.351 p=0.084	F=3.345 p=0.084	F=0.044 p=0.836
Quintofrontal tract	0.015 ± 0.002	0.015 ± 0.002	0.016 ± 0.001	0.016 ± 0.002	F=2.369 p=0.141	F=2.046 p=0.17	F=0.128 p=0.725
Medial longitudinal fasciculus	0.167 ± 0.015	0.172 ± 0.015	0.167 ± 0.016	0.167 ± 0.014	F=0.206 p=0.656	F=0.675 p=0.422	F=0.946 p=0.344
Subgeniulate nuclei #	0.171 ± 0.019	0.155 ± 0.016	0.161 ± 0.016	0.146 ± 0.016			
Pallium ##	1.823 ± 0.135	1.735 ± 0.157	1.745 ± 0.058	1.691 ± 0.114			
Interhemispheric region							
Region	LTI quail	STI quail	Statistical values (Line Effect)				
Mammillary bodies ##	0.069 ± 0.008	0.07 ± 0.005					
Anterior commissure	0.077 ± 0.008	0.075 ± 0.006	t=0.6799, p=0.505				
Posterior commissure #	0.054 ± 0.005	0.064 ± 0.02					
Vestibular commissure	0.1 ± 0.008	0.097 ± 0.008	t=0.8353, p=0.414				
Decussation of the solitary tract	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.002	t=-0.0097, p=0.992				
Ventricle #	6.359 ± 0.283	6.445 ± 0.307					

Table 5 Relative volumes (mean % ± standard error) of other brain regions according to the hemisphere (Left-H, left hemisphere; Right-H, right hemisphere). Statistical values in bold indicate a significant effect ($p < 0.05$) of the tested factors (line, hemisphere and interaction for bilateral regions; line for interhemispheric regions). The highest significant values observed for line are underlined, for hemisphere are bold. For the regions with no statistical analysis, the # indicates that the assumption of normality was not met and the ## indicates that the assumption of equality of variance was not met

The relative volumes of midbrain, preoptic area and preisthmic region of the midbrain were significantly smaller in LTI than in STI. Moreover, for preisthmic region of the midbrain, the relative volume was larger in the left than in the right hemisphere. The relative volumes of apical hyperpallium, nidopallium and ambiguous nucleus were larger in the right than in the left hemisphere. On the contrary, the relative volumes of anterior pretectal and subpretectal nuclei, striatopallidal area, semilunar nucleus, ventral tegmental area and caudal hindbrain were smaller in the right than in the left hemisphere.

Discussion

In line with our hypothesis, we demonstrated for the first time in male Japanese quail that genetic selection for a specific emotional behavior (tonic immobility) is able to modify the anatomy of brain regions involved in sensory and emotional processing. These results are in agreement with previously published data in the Red Junglefowl (Agnvall et al. 2017) indicating that genetic selection can modify brain anatomy. The differences in relative

volumes observed in our study may be due to several microstructural modifications (Asan et al. 2021). For example, in the grey matter, it may be due to a change in the number or size of the different cells. In the white matter, it may be due to a difference in the number or size of the fibers or even the myelin composition. Moreover these differences may be associated with modification of specific neurotransmitter systems described in the quail brain (*e.g.*, neuropeptide Y, Boswell et al. 1998; serotonin, Cozzi et al. 1991; calcitonin gene related peptide, Lanuza et al. 2000).

The examination of sensory-related regions (in particular olfactory, visual and auditory) demonstrated that several were affected by genetic selection of high-trait emotivity. This suggests that the divergent selection impacted globally the sensory abilities of quails. In visual-related regions, the rotundus nucleus was impacted. Its lesion has also previously been shown to induce an attenuation of red color-preference in quail artificially color-imprinted (Csillag et al. 1995) suggesting the importance of the rotundus nucleus in color and visual perception. These observations suggest that visual perception contributes to the difference in emotivity between STI and LTI lines. These results also provide some support for the speculation that LTI quails display different sensory processing of environmental cues than STI quails (Calandreau et al. 2013). It is important to further assess and compare the perceptual abilities of STI and LTI lines to fully understand the link between perceptual ability, brain anatomy and genetic selection of high-trait emotivity.

The examination of emotional processing regions highlighted numerous differences throughout the emotional neuronal network. The relative volume of arcopallium-amygdaloïd complex and other amygdala-related regions were smaller in STI than LTI quails, further confirming the role of these regions in emotivity. The implication of the arcopallium in the quail emotional neuronal network was previously demonstrated by the lesioning of arcopallium in LTI, which reduced their fear level (Saint-Dizier et al. 2009). Moreover, subjective observation of the data for the PAG showed an impact of divergent selection on the relative volume of this region. These results highlight the involvement of PAG in emotivity in quails (Takeuchi et al. 1996). The PAG is known to be involved in coping style (Bandler and Shipley 1994; Zelena et al. 2018) thus the difference in emotional reaction during the tonic immobility test between the STI and LTI may reflect a more general difference in their coping style. The relative volume of several cerebellar lobules were also

impacted, suggesting that the cerebellum may be involved in emotion in birds as has been shown in mammals (Adamaszek et al. 2017; Moreno-Rius 2018). Divergent selection (high or low reproductive investment) has already been shown to modify purkinje cell size and foliation in the cerebellum of Japanese quails (EL-Andari et al. 2020). The relative volume of the hippocampus was smaller in the left than in the right hemisphere whereas there was no difference between STI and LTI quails. We had expected a difference for the relative volume of the hippocampus between STI and LTI because it is involved in spatial memory (Lormant et al. 2020a) and LTI preferentially use spatial memory whereas STI preferentially use cue-based memory (Lormant et al. 2018). However, this difference in the form of memory used could be explained by a difference in sensory perception. As suggested above, STI and LTI quails may perceive their environment differently, which implies an adaptation of the forms of memory used.

Despite a difference in the corticotropic axis between the two quail lines (Hazard et al. 2005), we did not find any significant difference in their pituitary volumes. In contrast, pineal gland volume was smaller for LTI than STI. It is possible to speculate that this difference is associated with differences in melatonin synthesis and secretion (Gómez Brunet et al. 2002). As melatonin is involved in the stress response in neonatal chicks it would be interesting to investigate the putative role of melatonin in the emotional reactivity of the LTI and STI quails (Saito et al. 2005).

Genetic selection of high-trait emotivity also affects regions involved in other physiological processes. For example, the relative volume of the preoptic area was significantly smaller in LTI than in STI quails. The preoptic area is involved in sexual behavior, in particular because of the presence of aromatase (Balthazart and Foidart 1993; Absil et al. 2001). Based on these results, it would be interesting to compare the sexual behavior of male STI and LTI quails to test whether the difference of relative volume leads to a modification of this behavior.

It is well known that the brains of many birds are functionally and structurally lateralized (Manns and Ströckens 2014; Güntürkün and Ocklenburg 2017) but, to our knowledge, no studies have investigated either the functional or structural lateralization of the Japanese quail brain. However, quails do display behavioral lateralization in a visual task (Valenti et al. 2003). The current results highlighted several brain regions differing in relative volume

between the left and right hemispheres regardless of the line. Future work could investigate whether these anatomical differences also reflect a functional lateralization of the Japanese quail brain (Moorman and Nicol 2015; Güntürkün and Ocklenburg 2017).

The current work was conducted with sexually mature male quails. Future work could investigate the developmental trajectory of the differences in brain morphology between these quail lines; do they exist *in ovo*, at birth or during early maturation? To our knowledge, the developmental trajectory of total or regional quail brain volume is unknown. Based on the developmental trajectory of the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) brain, we can speculate that at 10 weeks of age the quail brain has already reached its maximum volume (Hamaide et al. 2018). Furthermore, it would be important to investigate whether or not the same differences in brain morphology also occur for female LTI and STI quails. Such work would also enable the creation of a template and atlas comprised of both male and female quails, which would be optimal for studies explicitly investigating the factor sex.

Conclusion

This exploratory work shows for the first time in Japanese quail that genetic selection for a specific emotional behavior (tonic immobility) is correlated with widespread modification in brain anatomy. Here we mainly focused on how this selection influenced the anatomy of several sensory and emotional processing brain regions. The widespread modification also suggests that the connectivity of brain networks would differ between the LTI and STI quails; a hypothesis that we are currently investigating using diffusion-weighted imaging. The exploratory approach taken here facilitates the creation of more focused hypotheses relating changes in brain structure to differences in expressed behaviors or cognitive capacities.

Declarations

Funding and Competing Interest

This project was supported by the APR Neuro2Co grant (Convention 2017 00117257; coordinator Elodie Chaillou, France) from Région Centre Val de Loire. Marine Siwiaszczyk's PhD was funded by Région Centre Val de Loire and Beauval Nature

Foundation. Cyril Poupon and Raissa Yebga Hot received funding from the European Union's Horizon 2020 Framework Program for Research and Innovation under the specific Grants No. 945539 (HBP SGA3). The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Author Contributions

EC, LC, BM, FA, CP contributed to the study conception. EC, LC designed the final study. RYH, JB and DAB performed the MRI acquisition. SAL and MS created the MRI template. MS, MM and EC manually segmented MRI atlas. MS, SAL and EC performed data analysis and interpretation. MS, SAL and EC wrote the first draft of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved the final version.

Availability of data and code

The template, atlas and LUT are openly available online: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4700522>. The anatomical MRI (.nii.gz format) for each of the 20 quails, their individual atlas-based segmentations (.nii.gz format), the region volume data (.csv format) and R code (.Rmd and .html format) used for statistical analysis will be available online (<https://doi.org/10.5281/zenodo.5584517>) when this manuscript has been accepted for publication.

References

- Absil P, Baillien M, Ball GF, et al (2001) The control of preoptic aromatase activity by afferent inputs in Japanese quail. *Brain Res Rev* 37:38–58. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00122-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00122-9)
- Adamaszek M, D'Agata F, Ferrucci R, et al (2017) Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. *The Cerebellum* 16:552–576. <https://doi.org/10.1007/s12311-016-0815-8>
- Agnvall B, Bélteky J, Jensen P (2017) Brain size is reduced by selection for tameness in Red Junglefowl— correlated effects in vital organs. *Sci Rep* 7:3306. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03236-4>
- Asan L, Falfán-Melgoza C, Beretta CA, et al (2021) Cellular correlates of gray matter volume changes in magnetic resonance morphometry identified by two-photon microscopy. *Sci Rep* 11:4234. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83491-8>
- Avants B, Epstein C, Grossman M, Gee J (2008) Symmetric diffeomorphic image

- registration with cross-correlation: Evaluating automated labeling of elderly and neurodegenerative brain. *Med Image Anal* 12:26–41. <https://doi.org/10.1016/j.media.2007.06.004>
- Avants B, Gee JC (2004) Geodesic estimation for large deformation anatomical shape averaging and interpolation. *NeuroImage* 23:S139–S150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.07.010>
- Avants BB, Tustison NJ, Song G, et al (2011) A reproducible evaluation of ANTs similarity metric performance in brain image registration. *NeuroImage* 54:2033–2044. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.09.025>
- Balthazart J, Foidart A (1993) Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:521–540. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90256-V](https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90256-V)
- Bandler R, Shipley MT (1994) Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 17:379–389. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90047-7)
- Baroncini M, Jissendi P, Balland E, et al (2012) MRI atlas of the human hypothalamus. *NeuroImage* 59:168–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.07.013>
- Baylé JD, Ramade F, Oliver J (1974) Stereotaxic topography of the brain of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J Physiol (Paris)* 68:219–241
- Bertin A, Cornilleau F, Lemarchand J, et al (2018) Are there facial indicators of positive emotions in birds? A first exploration in Japanese quail. *Behav Processes* 157:470–473. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.06.015>
- Boswell T, Millam JR, Li Q, Dunn IC (1998) Cellular localization of neuropeptide Y mRNA and peptide in the brain of the Japanese quail and domestic chicken. *Cell Tissue Res* 293:31–38. <https://doi.org/10.1007/s004410051095>
- Boulay J, Chaillou E, Bertin A, et al (2013) A higher inherent trait for fearfulness is associated with increased anxiety-like behaviours and diazepam sensitivity in Japanese quail. *Behav Brain Res* 237:124–128. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.026>
- Butler AB, Cotterill RMJ (2006) Mammalian and Avian Neuroanatomy and the Question of Consciousness in Birds. *Biol Bull* 211:106–127. <https://doi.org/10.2307/4134586>
- Cabezas M, Oliver A, Lladó X, et al (2011) A review of atlas-based segmentation for magnetic resonance brain images. *Comput Methods Programs Biomed* 104:e158–

e177. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2011.07.015>

- Calandreau L, Bertin A, Favreau-Peigné A, et al (2013) Impact of high and low anxiety trait on object habituation and discrimination: Evidence from selected lines of Japanese quail. *Behav Brain Res* 250:299–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.032>
- Cozzi B, Viglietti-Panzica C, Aste N, Panzica GC (1991) The serotonergic system in the brain of the Japanese quail: An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 263:271–284. <https://doi.org/10.1007/BF00318769>
- Csillag A, Kabai P, Kovach J (1995) Effects of diencephalic lesions on approach responses and color preferences in quail. *Physiol Behav* 58:659–667. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)00113-W](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)00113-W)
- De Groof G, George I, Touj S, et al (2016) A three-dimensional digital atlas of the starling brain. *Brain Struct Funct* 221:1899–1909. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1011-1>
- EL-Andari R, Cunha F, Tschirren B, Iwaniuk AN (2020) Selection for Divergent Reproductive Investment Affects Neuron Size and Foliation in the Cerebellum. *Brain Behav Evol* 95:69–77. <https://doi.org/10.1159/000509068>
- Evans AC, Janke AL, Collins DL, Baillet S (2012) Brain templates and atlases. *NeuroImage* 62:911–922. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.01.024>
- Faure JM, Arnould C, Beaumont C, et al (2006) Consequences of selection for fear in Japanese quail - European Poultry Science. *ArchGeflügelk* 70:216–222
- Gómez Brunet A, Gómez Brunet A, Malpoux B, et al (2002) Genetic variability in melatonin secretion originates in the number of pinealocytes in sheep. *J Endocrinol* 172:397–404. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1720397>
- Güntürkün O, Ocklenburg S (2017) Ontogenesis of Lateralization. *Neuron* 94:249–263. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.045>
- Güntürkün O, Verhoye M, De Groof G, Van der Linden A (2013) A 3-dimensional digital atlas of the ascending sensory and the descending motor systems in the pigeon brain. *Brain Struct Funct* 218:269–281. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0400-y>
- Hamaide J, De Groof G, Van Ruijssevelt L, et al (2018) Volumetric development of the zebra finch brain throughout the first 200 days of post-hatch life traced by in vivo MRI. *NeuroImage* 183:227–238. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.08.015>
- Hazard D, Couty M, Faure JM, Guemene D (2005) Daily and photoperiod variations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness in Japanese quail selected for

- short or long tonic immobility. *Poult Sci* 84:1920–1925.
<https://doi.org/10.1093/ps/84.12.1920>
- Hogg S, Paterson S, Mills AD, File SE (1994) Receptor binding in Japanese quail selected for long or short tonic immobility. *Pharmacol Biochem Behav* 49:625–628.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90079-5)
- Jarvis ED, Yu J, Rivas MV, et al (2013) Global View of the Functional Molecular Organization of the Avian Cerebrum: Mirror Images and Functional Columns. *J Comp Neurol* 521:3614–3665. <https://doi.org/10.1002/CNE.2304>
- Jones RB, Mills AD, Faure J-M (1991) Genetic and Experiential Manipulation of Fear-Related Behavior in Japanese Quail Chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *J Comp Psychol* 105:15–24. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.105.1.15>
- Kassambara A (2020) rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests
- Kingsbury MA, Kelly AM, Schrock SE, Goodson JL (2011) Mammal-Like Organization of the Avian Midbrain Central Gray and a Reappraisal of the Intercollicular Nucleus. *PLoS ONE* 6:e20720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020720>
- Kraimi N, Calandreau L, Zemb O, et al (2019) Effects of gut microbiota transfer on emotional reactivity in Japanese quails (*Coturnix japonica*). *J Exp Biol* 222:jeb202879. <https://doi.org/10.1242/jeb.202879>
- Lanuza E, Davies DC, Landete JM, et al (2000) Distribution of CGRP-like immunoreactivity in the chick and quail brain. *J Comp Neurol* 421:515–532.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000612\)421:4<515::aid-cne4>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000612)421:4<515::aid-cne4>3.0.co;2-6)
- Liu C, Ye FQ, Yen CC-C, et al (2018) A digital 3D atlas of the marmoset brain based on multi-modal MRI. *NeuroImage* 169:106–116.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.004>
- Lormant F, Cornilleau F, Constantin P, et al (2018) A trait for a high emotionality favors spatial memory to the detriment of cue-based memory in Japanese quail. *Behav Processes* 157:256–262. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.10.006>
- Lormant F, Cornilleau F, Constantin P, et al (2020a) Role of the hippocampus in spatial memory in Japanese quail. *Poult Sci* 99:61–66. <https://doi.org/10.3382/ps/pez507>
- Lormant F, Ferreira VHB, Meurisse M, et al (2020b) Emotionality modulates the impact of chronic stress on memory and neurogenesis in birds. *Sci Rep* 10:14620.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71680-w>
- Love SA, Marie D, Roth M, et al (2016) The average baboon brain: MRI templates and

- tissue probability maps from 89 individuals. *NeuroImage* 132:526–533.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.03.018>
- Manns M, Ströckens F (2014) Functional and structural comparison of visual lateralization in birds – similar but still different. *Front Psychol* 5:206.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00206>
- Mills AD, Faure J-M (1991) Divergent Selection for Duration of Tonic Immobility and Social Reinstatement Behavior in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Chicks. *J Comp Psychol* 105:25–38. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.105.1.25>
- Moorman S, Nicol AU (2015) Memory-related brain lateralisation in birds and humans. *Neurosci Biobehav Rev* 50:86–102. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.07.006>
- Moreno-Rius J (2018) The cerebellum in fear and anxiety-related disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 85:23–32.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.04.002>
- Poirier C, Vellema M, Verhoye M, et al (2008) A three-dimensional MRI atlas of the zebra finch brain in stereotaxic coordinates. *NeuroImage* 41:1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.01.069>
- Poissenot K, Anger K, Constantin P, et al (2019) Brain mapping of the gonadotropin-inhibitory hormone-related peptide 2 with a novel antibody suggests a connection with emotional reactivity in the Japanese quail (*Coturnix japonica*, Temminck & Schlegel, 1849). *J Comp Neurol* 527:1872–1884. <https://doi.org/10.1002/cne.24659>
- Puelles L, Martinez-de-la-Torre M, Martinez S (2019) *The Chick Brain in Stereotaxic Coordinates and Alternate Stains Online*, 2nd edn. Academic Press
- Reiner A, Perkel DJ, Mello CV, Jarvis ED (2004) Songbirds and the Revised Avian Brain Nomenclature. *Ann N Y Acad Sci* 1016:77–108.
<https://doi.org/10.1196/annals.1298.013>
- Richard S, Davies DC, Faure JM (2000) The role of fear in one-trial passive avoidance learning in Japanese quail chicks genetically selected for long or short duration of the tonic immobility reaction. *Behav Processes* 48:165–170.
[https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00082-0)
- Saikali S, Meurice P, Sauleau P, et al (2010) A three-dimensional digital segmented and deformable brain atlas of the domestic pig. *J Neurosci Methods* 192:102–109.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.07.041>
- Saint-Dizier H, Constantin P, Davies DC, et al (2009) Subdivisions of the

- arcopallium/posterior pallial amygdala complex are differentially involved in the control of fear behaviour in the Japanese quail. *Brain Res Bull* 79:288–295. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.03.004>
- Saito S, Tachibana T, Choi Y, et al (2005) ICV melatonin reduces acute stress responses in neonatal chicks. *Behav Brain Res* 165:197–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.045>
- Satterlee DG, Johnson WA (1988) Selection of Japanese Quail for Contrasting Blood Corticosterone Response to Immobilization. *Poult Sci* 67:25–32. <https://doi.org/10.3382/ps.0670025>
- Takeuchi H, Yazaki Y, Matsushima T, Aoki K (1996) Expression of Fos-like immunoreactivity in the brain of quail chick emitting the isolation-induced distress calls. *Neurosci Lett* 220:191–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13256-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13256-0)
- Talairach J, Tournoux P (1988) Co-planar stereotaxic atlas of the human brain: 3-Dimensional proportional system: An approach to cerebral imaging., 1st edn. Thieme
- Tustison NJ, Avants BB (2013) Explicit B-spline regularization in diffeomorphic image registration. *Front Neuroinformatics* 7:39. <https://doi.org/10.3389/fninf.2013.00039>
- Tzourio-Mazoyer N, Landeau B, Papathanassiou D, et al (2002) Automated Anatomical Labeling of Activations in SPM Using a Macroscopic Anatomical Parcellation of the MNI MRI Single-Subject Brain. *NeuroImage* 15:273–289. <https://doi.org/10.1006/nimg.2001.0978>
- Valenti A, Anna Sovrano V, Zucca P, Vallortigara G (2003) Visual lateralisation in quails (*Coturnix coturnix*). *Laterality Asymmetries Body Brain Cogn* 8:67–78. <https://doi.org/10.1080/713754470>
- Van Essen DC, Dierker DL (2007) Surface-Based and Probabilistic Atlases of Primate Cerebral Cortex. *Neuron* 56:209–225. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.015>
- Vellema M, Verschuere J, Van Meir V, Van der Linden A (2011) A customizable 3-dimensional digital atlas of the canary brain in multiple modalities. *NeuroImage* 57:352–361. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.04.033>
- Wylie DRW, Gutierrez-Ibanez C, Pakan JMP, Iwaniuk AN (2009) The optic tectum of birds: Mapping our way to understanding visual processing. *Can J Exp Psychol Can Psychol Expérimentale* 63:328–338. <https://doi.org/10.1037/a0016826>
- Xiao Q, Güntürkün O (2018) Asymmetrical Commissural Control of the Subdominant Hemisphere in Pigeons. *Cell Rep* 25:1171–1180.e3.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.011>

Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al (2006) User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage* 31:1116–1128.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015>

Zelena D, Menant O, Andersson F, Chaillou E (2018) Periaqueductal gray and emotions: the complexity of the problem and the light at the end of the tunnel, the magnetic resonance imaging. *Endocr Regul* 52:222–238. <https://doi.org/10.2478/enr-2018-0027>

III. Médiation scientifique : Comprendre et modéliser le comportement des lignées STI et LTI

1. Modéliser le comportement des lignées de caille à l'aide de robots

Au cours des différentes séances hebdomadaires, le comportement des lignées STI et LTI a été expliqué aux élèves de l'atelier Ciboulot à l'aide de vidéos ou de présentations réalisées par les scientifiques impliqués dans le projet. Les élèves ont intégré le fait que les cailles de la lignée LTI sont considérées comme plus émotives que les cailles de la lignée STI. Pour mettre en application les connaissances acquises, les élèves ont souhaité réaliser à l'aide de leur professeur de technologie, des robots représentant les deux lignées de caille. Comment représenter les différences de comportement à l'aide de robots ? Après réflexion des élèves, il a été décidé d'utiliser des capteurs pour que les robots réagissent différemment à une stimulation. Deux types de capteurs ont été envisagés : des capteurs sonores ou des capteurs visuels. La stimulation avec un capteur visuel étant plus difficile à mettre en place, le capteur sonore a été préféré. Les élèves ont ensuite choisi la stimulation : une balle de ping-pong lancée devant les robots. Une fois les capteurs et la stimulation choisis, les élèves ont appris à programmer ce capteur à l'aide d'un logiciel spécialisé pour les enfants. Une fois le capteur programmé, les élèves ont construit leur robot et ont intégré leur capteur. Lorsqu'une balle de ping-pong est lancée devant le robot représentant la caille de la lignée STI, le robot n'a pas de réaction et continue à avancer normalement. Lorsque la balle est lancée devant le robot représentant la caille de la lignée LTI, le robot se met à tourner sur lui-même. Ces robots représentent donc la différence de réactivité émotionnelle des deux lignées de cailles STI et LTI.

2. Segmentation des images IRM par les élèves de l'atelier Ciboulot

Un des objectifs de l'atelier Ciboulot est de permettre la segmentation d'images IRM par des personnes non expertes et ayant un regard sans a priori sur les délimitations à réaliser, c'est le cas des élèves de l'atelier. Dans cet optique, les élèves de l'atelier Ciboulot ont eu à leur disposition des images IRM de cailles qu'ils ont dû segmenter. La segmentation a été réalisée à l'aide du logiciel gratuit ITK-Snap. La prise en main de ce logiciel a été facile et rapide : ils ont commencé par segmenter des « fausses » images et ont rapidement pu segmenter les images de cerveaux de caille. Les élèves ont alors pu segmenter le cerveau

dans sa globalité puis des régions plus petites telles que le cervelet. Cependant, bien que la réalisation d'une segmentation soit parfaitement maîtrisée par les élèves, aboutir à l'objectif initial n'a pas été possible. En effet, les ateliers se déroulent sur un créneau d'une heure ce qui est assez court pour avancer réellement sur une segmentation. La segmentation des images a donc dû se dérouler sur plusieurs séances (consécutives) ce qui a été perçu comme répétitif par une partie des élèves. De plus, la segmentation d'images IRM demande de la concentration tout au long de la séance ce qui peut être difficile pour des collégiens, il fut donc également difficile de les faire segmenter efficacement sur une séance entière.

Les images IRM sur lesquelles l'atelier Ciboulot a travaillé ont été acquises par NeuroSpin (CEA, Gif-sur-Yvette). Dans le but de comprendre comment ces images ont été acquises, les élèves ont eu l'occasion de visiter NeuroSpin. Lors de cette visite, ils ont pu découvrir les machines IRM qui ont été utilisées pour faire ces acquisitions. Ils ont également pu échanger avec les chercheurs spécialisés dans l'IRM et ils ont pu présenter l'ensemble des travaux qu'ils ont réalisés au cours de leur année scolaire.

Action pédagogique : NeuroSpin accueille des collégiens dans le cadre du projet Neuro2Co.

Rédaction : Elodie Chaillou, Marine Siwiaszczyk, Laurent Cario avec la complicité des élèves de l'atelier Ciboulot

Article publié le 29 septembre 2018

<https://www.echosciences-centre-valdeloire.fr/communautés/un-cerveau-dans-toutes-les-têtes/articles/action-pédagogique-neurospin-accueille-des-collegiens-dans-le-cadre-du-projet-neuro2co-le-projet>

Le projet Neuro2Co, porté par **Elodie Chaillou**, chercheuse à l'INRA Val de Loire, rassemble de nombreux partenaires dont NeuroSpin. Ce projet, mené en sciences participatives, vise à tester l'hypothèse selon laquelle l'organisation des connexions cérébrales, le connectome, rend compte des stratégies d'adaptation comportementale des différentes espèces animales. Sous l'impulsion de ce projet, 3 enseignants en sciences du collège André Bauchant (37) animent depuis septembre 2017 un atelier scientifique avec les collaborateurs du projet Neuro2Co, l'atelier Ciboulot, pour les élèves de la 5^{ème} à la 3^{ème}. C'est dans ce contexte qu'ils sont venus à NeuroSpin le 12 juin dernier, accueillis par **Cyril Poupon** et son équipe pour réaliser l'acquisition d'images en IRM d'un cerveau de caille. En effet, au sein de ce projet collaboratif, l'équipe de **Cyril Poupon** est chargée de l'acquisition des images anatomiques et de la création des connectomes.

Pour vérifier l'hypothèse, le projet Neuro2Co exige d'utiliser une méthode unique et commune pour décrire et comparer les connectomes de modèles animaux originaux dont les stratégies d'adaptation comportementale sont connues et spécifiques (prédateur, proie, émotifs...). Ces deux exigences sont satisfaites d'une part par l'étude d'un modèle génétique de caille, d'un modèle ovin au vécu spécifique et d'espèces issues de la faune sauvage, et d'autre part par l'utilisation du logiciel NeuroBrainSeg pour segmenter les images obtenues par l'imagerie par résonance magnétique (IRM) à haut et très haut champ, ce logiciel étant utilisable par des non experts. Cette particularité est un atout pour segmenter objectivement les images sans *a priori* et a permis d'associer des citoyens à l'analyse et l'interprétation des images. Cette démarche de sciences participatives a été engagée avec la communauté de communes du Castelrenaudais et plus particulièrement l'équipe enseignante du collège André Bauchant à Château-Renault (37). Au cours de l'année scolaire 2017-2018, un atelier scientifique a été créé, baptisé par les collégiens « Atelier Ciboulot », au cours duquel ils ont découvert les neurosciences, les méthodes d'investigation pour étudier le cerveau, participé à des manifestations scientifiques et visité les laboratoires de recherche.

C'est dans ce contexte, que le 12 juin dernier, 14 collégiens accompagnés de leurs professeurs de SVT, physique-chimie et technologie, d'Elodie Chaillou et de collaborateurs du projet dont **Béatrice Saulnier**, médiatrice scientifique du Centre·Sciences, ont été accueillis à NeuroSpin par Cyril Poupon et son équipe. Un programme sur mesure les attendait.



Accueil des collégiens par Cyril Poupon et présentation du programme de la journée.

Ainsi, ils ont eu la chance de visiter le plateau technique de NeuroSpin (Cyril Poupon et Lionel Alliol), de réaliser des expériences ludiques conçues et animées par Christine Doublé, Raïssa Yebga-Hot et Justine Beaujoin.



Après le déjeuner et la traditionnelle photo de groupe, les élèves ont présenté leur travail, réalisé au cours de l'année scolaire : des robots simulant le comportement des lignées de cailles très émotives et peu émotives, étudiées dans le projet Neuro2Co.



Les élèves ont également pu assister à l'acquisition en temps réel d'images d'un encéphale de caille sur l'IRM 7T pré-clinique de NeuroSpin tout en bénéficiant des explications de Raïssa et Justine qui leur ont aussi montré comment extraire des connexions cérébrales à partir des données acquises à l'aide du logiciel Connectomist.



Cette mise en pratique leur a permis de faire le lien avec les différentes thématiques abordées au cours des ateliers qui se sont déroulés tout au long de l'année. Vous pouvez retrouver et suivre les ateliers Ciboulot sur **Echosciences** (<https://www.echosciences-centre-valdeloire.fr/communautes/un-cerveau-dans-toutes-les-tetes>).

Après cette journée bien remplie, les élèves qui ont eu le privilège *de voir la science en train de se faire* ont pris le chemin du retour, enrichis de nouvelles connaissances et, on l'espère, de perspectives scientifiques. La cellule communication de l'institut leur avait préparé des « cadeaux maison » dans un joli sac aux couleurs du CEA (Les Défis CEA, les Savanturiers,

le magazine Clefs CEA dédié au cerveau, et quelques goodies).

Un grand merci à Alexandros Popov (UNIRS) pour toutes ses photos !



Crédits Photos : Alexandros Popov © CEA

Crédits pour la vignette :

© Atelier Ciboulot, Collège André Bauchant Château-Renault

Hypothèse de l'environnement précoce : le modèle ovin

De nombreuses recherches ont été menées pour comprendre l'impact de l'expérience précoce sur les comportements et sur le cerveau. Il a été montré que l'exposition à un stress lors de la phase précoce de la croissance entraîne des effets à long terme que ce soit sur le fonctionnement cérébral, le développement émotionnel ou cognitif (Benmhammed et al., 2019; van Bodegom et al., 2017). Chez l'Homme, un stress prénatal ou une séparation d'avec la mère entraîne une hyper activation de l'axe HPA à l'âge adulte ce qui peut entraîner par la suite une dépression (van Bodegom et al., 2017). Au contraire, un isolement social précoce peut entraîner une hypo activation de cet axe HPA (van Bodegom et al., 2017). Le développement du cerveau *in utero* et lors de la croissance est fortement impacté par l'environnement. En effet, l'environnement va entraîner une modification de la structure et de la fonction cérébrale due à des modifications épigénétiques (telles qu'une altération de la structure de l'ADN) (Miguel et al., 2019). Ces modifications environnementales vont entraîner des modifications sur le volume cérébral, les microstructures mais aussi la connectivité de structures telles que l'amygdale ou l'hippocampe et vont favoriser l'apparition de maladies mentales (Miguel et al., 2019). Chez les rongeurs, des études ont montré qu'une séparation précoce d'avec la mère entraîne des altérations cérébrales et comportementales (Nishi, 2020). Chez le mouton, des études ont montré que l'expérience précoce a également un impact sur leur comportement. La séparation précoce avec la mère entraîne notamment une apathie des agneaux ou encore un niveau basal de cortisol plus élevé (Gaudin et al., 2018). Suite à ces observations, nous avons voulu savoir comment cette expérience précoce impacte le développement cérébral des moutons.

L'hypothèse de notre étude est donc que la plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs des animaux est modélisée par l'expérience précoce. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi d'utiliser le modèle ovin.

I. Le mouton, un modèle d'intérêt pour l'étude de l'environnement précoce :

1. Généralités

Le mouton (*Ovis aries*) est un ongulé marchant sur deux doigts. Il appartient à la famille des Bovidés, plus précisément à la sous-famille des Caprinés et au genre *Ovis*. Le mouton est un mammifère herbivore, et plus particulièrement un ruminant. C'est l'un des premiers animaux domestiqués par l'Homme. L'élevage ovin en France représente un cheptel d'environ 7 millions d'animaux (Agreste, 2021). Les types d'élevages peuvent être variés : en plein air, en bergerie ou encore en transhumance. Cet élevage est utilisé pour la production de viande, de lait (notamment pour la production de fromages), de laine ou encore de peau (pour obtenir du cuir appelé "basane"). Il existe actuellement plus de 200 races différentes dans le monde (Sheep Breeds, 2021). Ces races peuvent être classées en différents groupes : les races à faibles effectifs (Ex : Berrichon de l'Indre), précoces (Ex : Ile de France), d'herbage (Ex : Bleu du Maine), Mérinos (Ex : Mérinos de Rambouillet), prolifiques (Ex : Romane), laitières (Ex : Lacaune) ou encore rustiques (Ex : Limousine) (Perret, 1986).

2. Écologie comportementale

Du point de vue de l'écologie comportementale, le mouton est un animal grégaire, il vit en groupe avec une hiérarchie sociale. Cependant, en dehors des périodes de reproduction, les mâles vivent dans un troupeau distinct de celui des femelles et des jeunes (Main et al., 1996; Ruckstuhl & Neuhaus, 2002). Le mouton est une espèce nidifuge ; le nouveau-né naît dans le groupe de femelles à un stade de maturité avancée. En effet, le poids du cerveau de l'agneau à la naissance représente déjà 50% du poids du cerveau d'un adulte. De plus, leurs capacités sensorielles (visuelle, olfactive et auditive) et motrices sont fonctionnelles dès la naissance (McIntosh et al., 1979). L'agneau va donc pouvoir rapidement se lever et suivre sa mère (Fahmy & Robert, 1997; Lent, 1974). Jusqu'au sevrage qui a lieu environ 4 mois après la naissance, l'agneau se nourrit principalement en tétant sa mère. A partir de la puberté (vers l'âge de 6 mois), les agneaux vont avoir tendance à s'éloigner de leur mère (Gaudin et al., 2018) pour passer plus de temps avec leurs congénères (de même sexe et de même âge) (Shillito Walser & Williams, 1986). Vers l'âge de 24 mois, les mâles vont quitter le groupe

tandis que les femelles vont rester dans ce groupe tout en se détachant de leur mère (Franzmann & Geist, 1972).

3. La race Ile de France

La race Ile de France est une race issue du croisement entre des moutons Dishley et des Mérinos de Rambouillet. Le poids moyen est de 110 à 150 kg pour les béliers et 70 à 90 kg pour les brebis. Cette race est particulièrement appréciée pour sa vitesse de croissance rapide, son adaptation facile au désaisonnement ainsi que pour sa laine (Perret, 1986). De façon générale, en élevage, l'agnelage a lieu une fois par an.

4. Conditions d'élevage et expérience précoce :

Lors d'une visite en élevage ovin, il est courant de trouver deux techniques d'élevage des agneaux. Ils peuvent être élevés avec leur mère et nourris avec le lait maternel ou sans leur mère nourris avec un lait artificiel.

a. Agneaux en allaitement maternel :

Lorsque les agneaux sont élevés avec leur mère (Figure 10), ils vont pouvoir ingérer le colostrum. L'ingestion de colostrum est importante et va apporter des anticorps maternels à l'agneau (Nowak & Poindron, 2006). Ces anticorps vont lui permettre de mieux se défendre face à des potentielles infections. Cette ingestion de colostrum va également permettre de créer un lien



Figure 10 : Photos d'agneaux élevés avec leur mère

entre la mère et son petit et favoriser la reconnaissance de la mère par son petit (Val-Laillet et al., 2004, 2006). Cette reconnaissance est importante puisque les soins maternels sont prodigués exclusivement à leur progéniture, c'est la sélectivité (Nowak, 1999). Les facteurs facilitant la reconnaissance de l'agneau diffèrent s'il est à distance ou à proximité de sa mère.

Si l'agneau est à distance de sa mère, ce sont les signaux acoustiques et visuels qui vont faciliter la reconnaissance (se met en place 12 heures après la naissance) tandis que lorsque l'agneau est proche de sa mère, ce sont les critères olfactifs qui vont être privilégiés pour la reconnaissance (se met en place 4 heures après la naissance) (Nowak, 1999). Cette reconnaissance et cette préférence ont également lieu dans le sens de l'agneau envers sa mère (Nowak et al., 1997). De plus, des agneaux qui mangent des aliments aromatisés en présence de leur mère avant le sevrage, mangent plus de cet aliment après le sevrage que les agneaux qui ont mangé cet aliment aromatisé avec d'autres brebis ou qui ont mangé des aliments non aromatisés avec leur mère (Saint-Dizier et al., 2007). Cette expérience montre que le développement des préférences alimentaires des agneaux dépend notamment de l'observation du comportement de la mère. Il est cependant important que l'agneau ait accès, en complément, aux indices olfactifs caractérisant la nourriture (Saint-Dizier et al., 2007). L'expérience précoce et le lien avec la mère semblent donc être des paramètres importants pour le bon développement (comportemental, immunologique, ...) de l'agneau.

b. Agneaux en allaitement artificiel :



Figure 11 : Photo d'agneaux âgés de 3 jours en allaitement artificiel

Dans les élevages laitiers, l'agneau est séparé de sa mère pour être élevé en allaitement artificiel. Cependant, même en dehors des élevages laitiers, il arrive parfois que les agneaux ne puissent pas être élevés avec leur mère. Ils sont alors élevés en allaitement artificiel (Figure 11). Cet élevage en allaitement artificiel est notamment indispensable pour sauver des agneaux dont la mère n'est pas maternelle, pour sauver des agneaux dont la mère est malade (par exemple, en cas de mammite) ou encore lorsqu'ils sont plus de 2 ou 3 par portée et que la mère ne peut pas tous les nourrir. Cependant, cet élevage en allaitement artificiel a un impact sur le développement des agneaux.

Dans ce type d'élevage, les agneaux sont élevés en groupe avec leurs congénères de même âge mais sans figure maternelle. Contrairement au lien qui se crée entre la mère et son petit, aucun lien affectif spécifique ne se développe entre les agneaux du groupe (Gaudin, 2015). Un lien affectif sélectif se développe seulement lorsque les agneaux sont élevés en binôme avec un congénère particulier, ce qui favorise une proximité entre les deux agneaux. Ce lien créé semble être différent de celui créé entre une mère et son agneau, il ne correspond pas à un lien d'attachement (Gaudin, 2015). L'allaitement artificiel a également des effets délétères sur la santé des agneaux (Latham & Mason, 2008) notamment en induisant une mortalité plus élevée qu'en élevage sous la mère. Il a également été montré que l'allaitement artificiel entraîne une différenciation plus tardive de l'hypophyse (Love et al., 2021). Les agneaux en allaitement artificiels semblent donc avoir un développement comportemental et cérébral différent des agneaux élevés en allaitement maternel.

5. Comment contrecarrer les effets de l'allaitement artificiel ?

Dans le but de contrecarrer les effets de l'allaitement artificiel, des études ont été menées afin d'enrichir le milieu d'élevage des agneaux. Une possibilité pour enrichir le milieu et pallier l'absence de figure maternelle est d'ajouter un objet dans le milieu. Des macaques rhésus élevés avec un objet explorent de façon plus importante un environnement nouveau s'ils sont en présence de cet objet (Harlow, 1959). Lorsqu'ils sont placés dans un environnement nouveau sans l'objet familier, leur réaction de détresse est moins forte qu'une séparation maternelle (Reite et al., 1978). Ces études semblent donc montrer que chez les primates non humains, le lien qui s'établit avec un objet est moins fort que le lien établi avec la mère. De plus, Cairns (1966) a montré qu'il était possible de créer un lien entre un agneau et un objet large (tel qu'un ballon) ou une figure non maternelle (brebis autre que la mère ou chien), le lien créé entre un objet et un agneau étant moins fort que le lien créé avec une figure sociale. Gaudin et al. (2018) a montré que des agneaux en allaitement artificiel peuvent créer un lien affectif avec les congénères avec lesquels ils sont élevés alors qu'ils ne créent pas de lien fort avec l'objet avec lequel ils sont élevés. Pour les veaux laitiers, des essais ont été menés pour utiliser des vaches nourrice (Brunet et al., 2016). Ces vaches nourrices vont allaiter plusieurs veaux à la fois et donc permettre de ne pas recourir à l'allaitement artificiel. Cependant, cette technique peut être limitée par le refus de la vache nourrice d'accepter un veau qui n'est pas le sien, il faut donc tenter l'adoption le plus tôt

possible après la naissance. Cet allaitement avec une nourrice et non en allaitement artificiel favoriserait la croissance des veaux (Brunet et al., 2016).

6. Objectif de l'étude :

Pour contrecarrer les effets délétères de l'allaitement artificiel, différentes méthodes ont été testées pour enrichir le milieu de vie des animaux. Dans cette étude, nous voulons enrichir le milieu grâce à la diffusion de musique classique et étudier l'impact de cette diffusion chez des agneaux Ile de France en allaitement artificiel. L'hypothèse est que la diffusion de musique peut aider à contrecarrer les effets délétères de l'allaitement artificiel. Plus généralement, l'objectif est d'étudier l'impact de l'expérience précoce sur les comportements adaptatifs.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi de considérer la musique comme une stimulation auditive sans *a priori* sur le sens particulier que la musique pourrait avoir pour l'animal. Ce parti a été choisi après une première recherche bibliographique relativement peu fructueuse chez les mammifères d'élevage alors que les témoignages sont nombreux dans les médias. Dans ce contexte, nous avons entrepris la rédaction d'un article de revue qui, après avoir rappelé quelques généralités sur les sons, met en lumière, chez les vertébrés, les similarités anatomiques permettant de percevoir les sons. Cette revue illustre ensuite des exemples d'usage de la musique auprès de mammifères d'élevage ou vivant en captivité.

II. Stimulation auditive chez les animaux

1. The use and impact of auditory stimulations in animals

Article soumis pour publication le 26 mars 2021
dans Journal of Interdisciplinary Methodologies and Issues in Sciences
En révision



The use and impact of auditory stimulation in animals

Guillaume UBIEMA^{1,#}, Marine SIWIASZCZYK^{1,#}, Céline PARIAS¹, Roman BRESSO²,
Christophe HAY³, Baptiste MULOT⁴, Scott A. LOVE^{1,*}, Elodie CHAILLOU^{1,*}

¹ PRC, INRAE, CNRS, IFCE, Université de Tours, France

² Musicoprod, 72500 Dissay-sous-Courcillon, France

³ La maison d'à côté, 41350 Montlivault, France

⁴ ZooParc de Beauval & Beauval Nature, 41110 Saint-Aignan, France

*Correspondance : elodie.chaillou@inrae.fr; scott.love@inrae.fr

authors with equal contribution

DOI : [10.18713/JIMIS-ddmmy-v-a](https://doi.org/10.18713/JIMIS-ddmmy-v-a)

Soumis le 26 mars 2021 – Jour Mois-en-lettres Année

Volume : 9 – Année : AAAA

Titre du numéro: **Methods to assess the effects of sensory stimulations on wellness**

Éditeurs : Sandra Perez, Gabriel Gandolfo

Abstract

Music can cause pleasant sensations in humans whereas some noises can cause discomfort. The effects of music and noise have also been somewhat studied in animals, showing different impacts. In this review we aim to illustrate the differences and similarities between animals, in terms of their sensitivity to auditory stimuli (noise or music), by first recalling some generalities about the physical characteristics of sound and the biological bases of hearing. Second, based on the studies reported in this review, we conclude that ambient noise is harmful and/or stressful, and that musical sounds can take many forms with a large range of impacts in animals. Finally, we present two practical examples of the use of music with animals (one in the context of a zoo and the other in cattle breeding) and an example of an experiment designed to understand the impact of music on neonate lambs. These three examples highlight how music can help to improve animal welfare.

Keywords

acoustic ; welfare ; music

I INTRODUCTION - GENERALITIES ABOUT THE ACOUSTIC PROPERTIES OF AUDITORY STIMULI AND THE BIOLOGICAL BASES OF HEARING

1.1 Acoustic properties of sound

Sound is a physical phenomenon, defined as a mechanical vibration propagating as a longitudinal and periodic wave within a material medium. It is characterized by:

- the amplitude of pressure change expressed in Pascal (Pa),
- the wavelength (λ) which is the distance over which the wave's shape repeats,
- the frequency expressed in Hertz (Hz) which is the number of pressure variations per second,
- the period which is the time interval between two identical and successive vibratory states in which the wave propagates,
- and the propagation speed which depends on the medium (Hansen et al., 2017).

The decibel (dB) is the unit used to measure loudness. In humans, the audibility threshold is set at 0 dB, discomfort being observed with a sound of 110 dB and pain with a sound of 130 dB (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390300/>).

A large variety of sounds are found in the environment. Based on their frequency profile, it is possible to discriminate between pure and complex sounds (Fig. 1A). Pure sounds are composed of a single sinusoid, whereas complex sounds are composed of several different frequencies. The discriminant between music and noise is in the organization of these different frequencies. For musical sounds, the frequencies are multiples of the fundamental frequency and are often referred to as “harmonics” (Fig. 1B). For noise, the frequencies can also be numerous but without specific organization with each other (Fig. 1C). Thus, noise is a non-periodic sound, which is often perceived as unpleasant or harmful (Walker et al., 2011). By analogy with white light and its visible spectrum, there is also the concept of white and colored noises. Based on physical properties, white noise is a theoretical construct of a signal covering an infinite bandwidth and flat power spectral density over the frequency range relevant to the environment (Zhivomirov

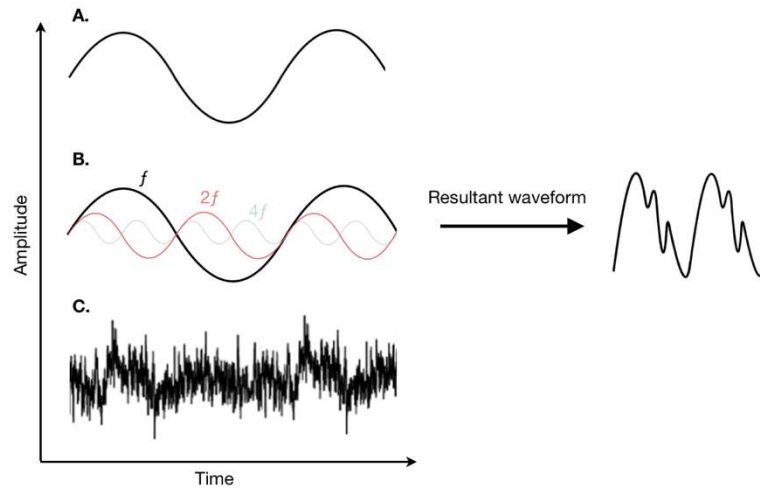


Figure 1: Waveform of different sounds. **A.** Pure sound. **B.** Musical sound, f is the fundamental frequency (also named as the 1st harmonic), $2f$ is the 2nd harmonic (1/2 of the fundamental frequency), $4f$ is the 4th harmonic (1/4 of the fundamental frequency). **C.** Noise.

2018). The colored noises, such as violet, blue, pink or red, are distinguished according to their power spectral density and the spectral slope rate (for more details, see table 1 in Zhivomirov 2018). Like musical sounds, ambient noise, white noise and ecological noise could have an impact on health, behavior or the physiology of animals and humans. When investigating this impact it is important to consider the hearing, or audible, range of the species.

1.2 Hearing range

Sound frequencies are classified according to the audible range, that of humans being between 31 Hz and 17,600 Hz, conventionally described as being between 20 Hz to 20,000 Hz, at a sound level of 60 dB in air (Jackson et al., 1999). According to the human hearing range, sounds with frequencies below 20 Hz are classified as infrasound (Leventhall, 2007) and those with frequencies above 20,000 Hz are classified as ultrasound (Carlsen, 1975). However, the idea that a sound with a frequency below 20 Hz is inaudible is disputed (Leventhall, 2007). Indeed, by increasing the sound level (more than 80 dB), it is possible to hear sounds with frequencies below the 20 Hz threshold, this capacity also depending on the age of the person (Leventhall, 2007). Then, to evaluate the impact of the different types of auditory stimulations in non-human animals, it is necessary to take into consideration the hearing range of each species (Fig. 2). For example, the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) is able to distinguish sounds from 100 Hz to ultrasounds up to a frequency of 150,000 Hz (Houser and Finneran, 2006) while the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) and the elephant (*Elephas maximus*) are able to detect infrasound as low as 15 (Tubelli et al., 2018) and

17 Hz (Heffner and Heffner, 1980), respectively. This capacity to detect infrasound is not restricted to large mammals as it has been shown that chickens (*Gallus gallus domesticus*) are also able to detect infrasound as low as 9 Hz (Hill et al., 2014).

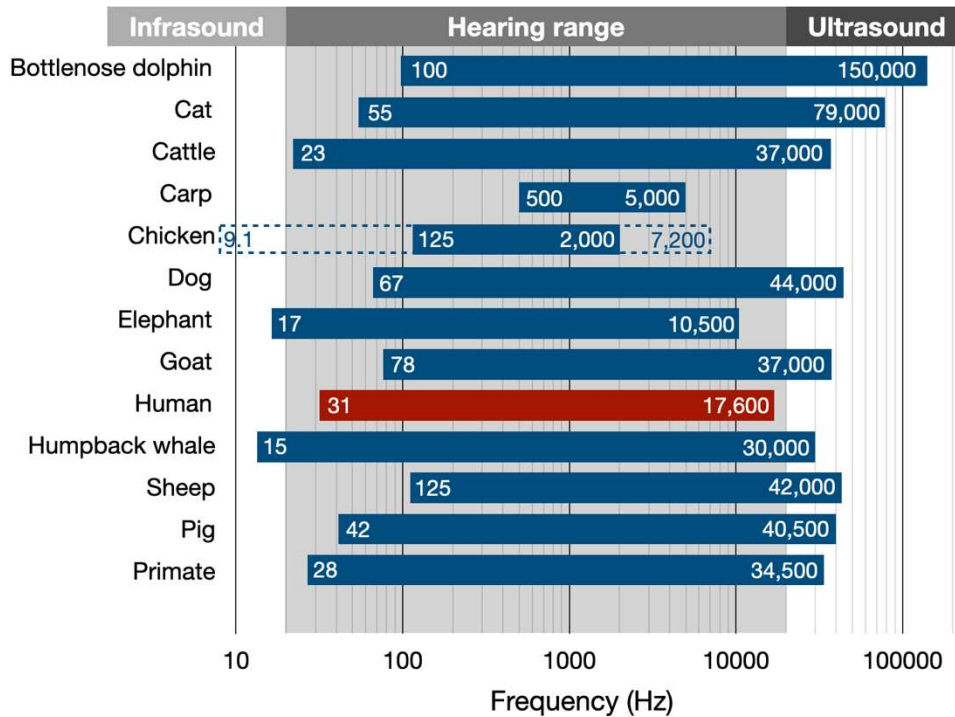
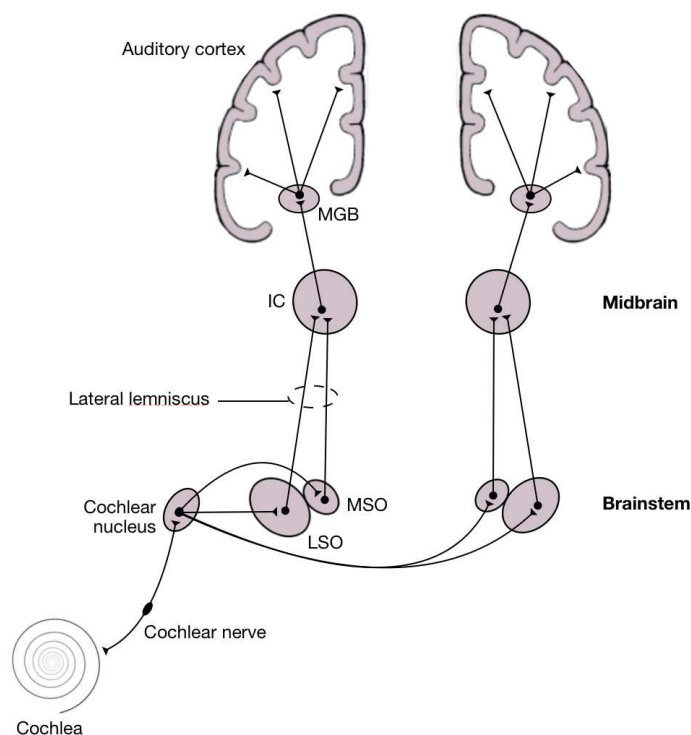


Figure 2: Distribution of hearing ranges defined in Human (red) compared to other mammals (blue). The hearing ranges on terrestrial animals were established at 60 dB: Elephant: (Heffner and Heffner, 1980); Cat, Cattle, Dog, Goat, Human, Sheep, Pig (Heffner 1998); Non-human Primate: (Heffner 2004).; Chicken (Hill et al., 2014). Note that Chicken' hearing range was extended from infrasound (9.1 Hz) like Elephant and Humpback whale. Carp (Vetter et al., 2018); Bottlenose dolphin (Houser and Finneran, 2006); Humpback whale (Tubelli et al., 2018).

1.3 Biological basis of hearing

1.3.1 The auditory system

Hearing is a complex biological system that analyses auditory stimuli through acoustical (frequencies spectra) and spatial (localization of the stimuli) information. Anatomically, the auditory system includes a peripheral part with the outer, middle and inner ear, and a central part with a specific neuronal network (Evans 1992). The reception and amplification of auditory signals are performed by the outer and middle ear; the transmission of signal frequencies is performed from the middle ear to the inner ear, including the cochlea. The cochlear nerve encodes the auditory signals, according to their frequencies, through the hair cells (mechanosensitive cells) from the cochlea. This first step of the hearing process, involving the peripheral auditory system, allows to translate acoustic oscillations into spatio-temporal patterns of neuronal discharges (Evans, 1992). The second step concerns the central auditory system with the neuronal network starting from the cochlear nucleus to successive brainstem and thalamic structures, before integration by auditory cortex (Evans, 1992; Pickles, 2015; Fig. 3). Briefly, neuronal discharge from the cochlear nucleus is transmitted to the lateral and median olivary nuclei through bilateral projections. After this first relay, the signal is transmitted through ipsilateral projections (lateral lemniscus tract) from the olivary nuclei to the inferior colliculi. The last relay from the inferior colliculi to the auditory cortex involves the medial geniculate body of the thalamus (Evans, 1992; Šuta et al., 2008). Throughout these ascending neural paths, integration is



ensured during each relay to refine the neuronal encoding of the auditory information presented to the cortex (Pickles, 2015).

Figure 3: Schematic representation of the neuronal network of the auditory system from cochlea (inner ear) to the auditory cortex. Based on mammal brain anatomy: LSO, lateral part of the superior olivary nucleus; MSO, median part of the superior olivary nucleus; IC, inferior colliculi; MGB, medial geniculate body.

The examination of the auditory system in different vertebrates shows that it presents similarities in its organization with a peripheral auditory system with external part, middle ear and inner ear, and a central peripheral auditory system, including brainstem, thalamic and cortical projections (Itatani and Klump, 2017; Köppl, 2011; Ladich and Winkler, 2017; Reis et al., 2017; Roberto et al., 1989; Rouiller and Welker, 2000; Šuta et al., 2008). However, across vertebrates anatomical differences are also observed for the external auditory system, the upstream part of the tympanic membrane (Ladich and Winkler, 2017). Amphibians have an external tympanic membrane and no real external organ. Fishes have no outer or middle ear, their role being partially performed by the swimbladder. Birds and land mammals possess external auditory canals to conduct acoustic oscillations to the tympanic membrane. In cetaceans, external auditory canals and tympanic membrane are present but do not conduct the acoustic oscillations. Whatever the species, most of the similarities are observed in the inner ear organization (Ladich and Winkler, 2017). It is interesting to note that the anatomo-functional organization of the peripheral auditory system enables a species to hear the sound frequencies produced by that species (Ladich and Winkler, 2017). In other words, the frequency hearing range of a species corresponds to the frequency range of sounds produced by the species. Concerning the central auditory system, most of the brain structures identified in humans have also been anatomically identified in other mammals or their homologous structures in other vertebrates (birds, fishes, etc.; Oertel, 1999; Rouiller and Welker, 2000). The existence of a central auditory system throughout the animal kingdom is not sufficient to confirm the ability of animals to perceive, analyze, recognize and/or interpret all types of sounds such as music. However, behavioral studies have highlighted the ability of different vertebrates to use vocal communication.

1.3.2 Acoustic communication and emotion in animals

Animals can communicate with each other using vocalizations (Sebe et al., 2008). Vertebrates have different repertoires of vocalizations that are used for communicating in social contexts and/or their emotional state. For example, 11 types of vocalizations have been identified in guinea pigs, some of which can lead to a behavioral response in conspecifics (Berryman, 1981), 21 in cats, which differ according to context (Tavernier et al., 2020) and a dozen in elephants, which vary with age (Soltis, 2009). Ewes can discriminate between their own offspring and other lambs based on vocalization alone (Sebe et al., 2008). For cattle (Green et al., 2018) and sheep (Guesdon et al., 2015, 2012), two gregarious species, vocalizations can also reflect the emotional state of individuals, particularly in situations of social separation. These observations are not specific to terrestrial mammals, since

vocalizations are essential in most bird species, particularly songbirds (Filippi et al., 2019) and are present in marine mammals (Erbe et al., 2016), amphibians (Velásquez, 2014), crocodylians (Vergne et al., 2009) and fishes (Ladich and Winkler, 2017). Several authors have hypothesized that non-human animal vocalizations can be compared to human language and music, on the basis that these different sound productions have rhythm (Ravignani et al., 2019) and a temporal profile (Filippi et al., 2019). Such a hypothesis is all the more conceivable since it can be based on biological foundations such as animal hearing ability (see part 1.2) and strong similarities in the auditory system throughout the non-human animal kingdom (see part 1.3).

Considering the universality of both the auditory system and vocal communication, it is legitimate to postulate the existence of a universal effect of music within the animal kingdom, in particular as a means of improving welfare, a use that has been reported several times in different media² and more rarely in research journals (Alworth and Buerkle, 2013; Dhungana et al., 2018). To address this question, we propose to consider auditory stimuli along two axes: auditory stimuli qualified as noise and auditory musical stimuli. For each of these, we will review the scientific literature that examines its influence on animal emotional responses³.

II IMPACT OF NOISE EXPOSURE ON DIFFERENT WELFARE-RELATED PARAMETERS

The French Ministry of Ecology defines noise as,

"an acoustic phenomenon producing an auditory sensation considered unpleasant or disturbing. Excessive noise has effects on the organs of hearing (physiological dimension), but can also disturb the body in general, especially sleep and behavior (psychological dimension). (...) Noise pollution can result from three main sources: transport, neighbors and activities."⁴

The World Health Organization has developed preventive strategies to reduce noise exposure (WHO, 2018). From a physical point of view, noise is defined as a complex, non-periodic sound. In non-human animals, various studies have demonstrated the harmful effects of noise on the health and welfare of farm animals or animals kept in zoos.

² <https://www.livescience.com/33780-animal-music-pets.html> ; https://www.youtube.com/watch?v=_2raNqztPX0 ;
<https://www.youtube.com/watch?v=1ZW4Ska8gvA> ;
<https://www.petmd.com/blogs/thedailyvet/aobrien/2013/march/music-influences-milk-production-in-cows-29895> ;
https://www.sciencesetavenir.fr/nature-environnement/la-musique-adoucit-les-vaches_4441

³ As best as possible, we will specify the information relating to animals and/or to experimental plan which could influence the emotional responses in addition to the auditory stimuli (gender, age, breed...).

⁴ <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/bruit-et-nuisances-sonores>

2.1 Ambient noise

The impact of ambient noise is examined according to the animals' habitat. For example, farm animals are exposed to many different types of sounds throughout their life, especially within their housing from machinery, human intervention and motor vehicles, during transport, and in slaughterhouse. This noise is generally of high intensity and can cause deleterious behavioral and neurophysiological effects to the animal during chronic or sudden exposure. In sheep (1-3 years of age), it was found that the addition of ambient noise (90-100 dB) during transport did not change their heart-rate, salivary cortisol levels or behavior (Hall et al., 1998). This indicates that the extra noise did not further stress, or appease, the sheep in this already stressful situation. In contrast, the noise associated with the handling (human voices, metal-on-metal clanging, etc.; 85-95 dB) of crossbred beef heifers increases their heart-rate and movement (Waynert et al., 1999). However, these increases in heart-rate and movement were lower after five days of exposure, suggesting that the animals had gotten used to the noise presented and its significance had changed. Evaluation of chronic exposure to ambient noise was studied in growing castrated male Landrace pigs (Otten et al., 2004). At 12 weeks of age, individuals were submitted to a 120 min-period of broadband noise (mixture of noises between 0 and 23 kHz, 90 dB) either daily or every 2-3 days for four weeks. In this experimental context, the pigs exposed to noise every day had delayed daily weight gain, and alteration of their corticotrope axis (higher plasma cortisol and adrenal corticotropic hormone, ACTH), which is involved in the response to stress (Otten et al., 2004). In pigs exposed to noise every 2-3 days, higher levels of glucocorticoid receptor binding in the hippocampus and alteration at the adrenal levels of the corticotrope axis such as modification of the cell densities in the adrenal medullary were observed (Kanitz et al., 2005). Together, these results suggest a negative emotional impact of acute or chronic noise-exposure in farm animals. Similar conclusions have been made in dogs who were exposed to an alarm for 3-mins (75 dB, 0.25-8 kHz) and subsequently displayed muscle contraction, piloerection and salivation, associated with increased heart rate and blood pressure, and an increased plasma ACTH, noradrenaline and cortisol (Engeland et al., 1990). Consequences of noise exposure have also been studied in chickens, this animal model presenting interest for evaluating the impact of *in ovo* exposure (Donofre et al., 2020; Kathpalia et al., 2019; Sanyal et al., 2013). As for farm mammals and dogs, noise exposure produced stress as indicated by increased corticosterone in 42-day-old broilers (acute exposure of 10 min at 80 dB and 100 dB, Chloupek 2009), and heterophilic/lymphocyte ratio in 36-week-old hens (exposure of 60 min/day at 90 dB (Campo et al., 2005). *In ovo* exposure to noise (110 dB, 30-3000 Hz, for 15 min/hour from day 10 to hatching; Kathpalia et al., 2019; Sanyal et al., 2013) lead to increased noradrenaline plasma at 1-day-old, impaired spatial orientation with decreased expression markers of maturation in

hippocampus (synaptophysine, postsynaptic density-95: Sanyal et al., 2013; Brain-derived neurotrophic factor: Kathalia et al., 2019). Together these studies affirm that farm animals (mammals and birds) are sensitive to noise exposure (90-110 dB) and that noise has a stressful character that can alter the animal's health from a physiological, behavioral, neurobiological and developmental point of view. Moreover, these alterations are also observed at intensities below the human discomfort threshold (110 dB).

2.2 White noise

Although ambient noise has been shown to have adverse health effects, some noise may have positive effects. This is the case with white noise. This sound occurs when a variety of sounds of different frequencies are played at a constant level. In clinical uses, white noise is thought to facilitate sleeping after artery surgery (Williamson, 1992). It also improves learning in healthy adults (Angwin et al., 2017) and could be a possible therapeutic option for children with attention deficit hyperactivity disorder (Pickens et al., 2018). It has also been found to improve performance in cognitive tasks in adult monkeys (*Macaca arctoides*) exposed to white noise (80 dB) for 15 min before the task (Carlson et al., 1997) and also to have a calming effect on infant Japanese macaques (5-27 days old) in stressful situation (Kawakami et al., 2002). However, the impact of white noise is not always beneficial. Whereas 2-day-old hen chicks, spent more time in a food-conditioned place, they spent less time in white noise-conditioned place (Jones et al., 2012), suggesting that white noise can also be an aversive stimulus during a conditioned place preferences test.

2.3 Ecological sounds

Other noises such as so-called "ecological" sounds, which consist of auditory stimuli in relation with the animal's natural environment, can also be beneficial to animals. In particular, rainforest sounds, containing sounds of animals (e.g. birds, primates, elephants) and forests (e.g. rain, river, wind), have been used in several studies. The sound of a rainforest has a tendency to increase social interactions and resting time on captive gorillas by masking ambient noise (8-41 years old; Wells et al., 2006). But this effect is questioned in adult gorillas since some studies have reported increased agitation in 12-23 years old gorillas (Ogden et al., 1994) while others have reported no effect on anxiety behavior (Brooker, 2016). These differences between studies could be due to the different experimental designs (duration of exposure, animal housing, etc.) or to interindividual variability.

On the basis of the studies reported in section 2, it is difficult to conclude whether or not exposure to ambient noise, white noise or environmental noise has adverse or positive effects, since these noises were broadcast at different intensities. Nevertheless, at equivalent sound level (60-80 dB), it seems

that exposure to white noise (ocean waves) or conspecifics vocalizations would be more beneficial than exposure to ambient noise (noises truck, train...) at least in chickens (Campo et al., 2005; Donofre et al., 2020). But controlling the sound level parameter alone is not sufficient to compare the effects of exposure to these different noises. In addition to the duration, or even suddenness, or frequency of exposure, it is also important to consider all the characteristics of auditory stimulation. In particular, as we will see in the following section, exposure to musical sounds will not have the same effects depending on the level, of course, but also on the instruments, the harmonies and the tempo.

III IMPACT OF MUSIC EXPOSURE ON DIFFERENT WELFARE-RELATED PARAMETERS

3.1 How to define music?

Music is one of the oldest forms of art and is an integral part of our daily lives. Music could be defined as an aggregation of notes or as a succession of notes. But, for André Manoukian, French pianist, jazzman and composing author, this succession of notes could be considered like music when this sound creates a “sound sensation”⁵. This transformation is done when the notes are submitted to a rhythmic arrangement. However, our ear is able to discriminate dissonances and consonances, a phenomenon based on the notion of beat, when several frequencies are heard simultaneously. Consonances lead to a calming effect and dissonances to a feeling of being aggressed, harmony being the art of combining both sensations, in occidental music. A. Manoukian defined “the harmony” (accordance) as a low proportion of frequencies between the “G” (440 Hz) and the octave (880 Hz), in other words when the proportion is equal to a whole number. For songwriter Frank Zappa⁶, written music on a score becomes a musical experience when converted into “twirling air molecules”; then each air disturbance caused voluntarily is seen as a composition. Moreover, for this composing author, because each (physical) component of a sound could be perceptible (audible), any sound can be consumed as music. For both A. Manoukian and F. Zappa, music has the capacity to create a personal sensation.

According to the diverse components of music such as intensity, tempo, pitch, timbre, nuances, and instruments, and because not all individuals are sensitive to the same music (or component), the large panel of impacts of music exposure is not surprising.

Music exposure can provoke different emotional states in human beings, which can have both beneficial and harmful effects on health. In particular, it has been shown that music can be used as a

⁵ Comments from his column on the radio show “Par Jupiter”, France Inter, 2020-08-26 “Le Cluster”.

⁶ Zappa par Zappa, juin 2005, Eds De L’Archipel, 396p, ISBN 2840877159 (original edition 1989).

therapeutic element in the emergence of a new discipline: music therapy. It can regulate cardiovascular parameters (Koelsch and Jäncke, 2015), relieve pain (Cheung et al., 2018; Lee, 2016), neurodegenerative diseases (García-Casares et al., 2018) and psychiatric disorders such as depression, anxiety, schizophrenia, sleep disorders and dementia (Wang and Agius, 2018). In this context, many authors also advocate that music has beneficial effects on animals. By analogy with the idea of a “sound sensation” proposed by A. Manoukian and F. Zappa, examining the impact of musical exposure on animals requires considering their emotional reaction and the parameters that characterize musical sound such as intensity, tempo or instrument.

3.2 Sound level

To our knowledge, very few studies have compared the impact of different sound levels of music on animals, *i.e.* a study comparing two different exposure intensities of the same piece of music. In subadult meat chicks, the impact of music exposure was studied with two styles of music (dinner vs. rock’n roll) at two different sound levels (70 vs. 85 dB). Whatever the level applied, chicks exposed to music expressed stress-related behavior from the first exposure and expressed jerking head motion after two weeks of exposure (Christensen and Knight, 1975). The sound level chosen for an experiment is often chosen as a function of the ambient noise level in the environment. For example, rainbow trout or common carp reared in tanks (with recirculating water system) are exposed to ambient noise levels close to 122 dB and the impact of music exposure was evaluated at a level of 130 dB (Papoutsoglou et al., 2013, 2010, 2007). In these different studies, the animals from the control conditions were exposed to ambient noise such as animal voices and fans (Campo et al., 2005), the noise of chickens (Christensen and Knight, 1975) or machines (Papoutsoglou et al., 2013, 2010, 2007) at a level smaller than those used for music exposure. In this context, two questions could be asked concerning the reported stressful impacts of music described. In chickens, for example: is it the consequence of sound level (75 dB in Campo et al., 2005; 70 and 85 dB in Christensen and Knight, 1975) or the consequence of novelty or unknown noise. In chicks, prenatal exposure to music has been evaluated at two different levels. At 110 dB, prenatal music exposed chicks (from E10) performed better in spatial orientation, learning and memory at 1 day old than prenatal noise exposed chicks (Sanyal et al., 2013). Similar effects were reported with a level of 65 dB (Chaudhury et al., 2010). At 110 dB as well as 65 dB, the cognitive impacts of prenatal music exposure are associated with neuronal modifications in auditory nuclei (Alladi et al., 2005, 2002; Kathpalia et al., 2019) and hippocampus (Chaudhury et al., 2010, 2009, 2008, 2006; Chaudhury and Wadhwa, 2009; Sanyal et al., 2013), through different actors of neurogenesis. However, depending on the study and the variable measured, these effects were also found when chicks were prenatally exposed to species-specific sounds at the same level.

In conclusion, the impact of music sound level is not clear since it was evaluated in interaction with other environmental factors such as light intensity (*i.e.* Papoutsoglou et al., 2010), including the frequency factor that differs between music and control noise (*i.e.* Kathpalia et al., 2019). Perhaps the main precaution to take when testing the impact of music exposure is to present it at a level equivalent to that of the control noise (ambient noise). Finally, even within a piece of music, the sound level can vary. These variations in music are called nuances. They are expressed by indications ranging from pianissimo to fortissimo, and crescendo and decrescendo, nuances to which we must also add the notion of tempo.

3.3 Tempo

Tempo is the speed at which a piece of music is played and is expressed as the number of beats per minute (bpm). Tempo lower than 40 bpm is named *largissimo* and tempo higher than 188 bpm is named *prestissimo*. Based on the work from Karageorghis and Terry (Karageorghis and Priest, 2012), in humans, tempo, musicality, cultural impact⁷ and association⁸ are the four characteristics of the piece of music that contribute to its impact on motivational and physiological responses (heart rate at rest, during physical exercise). Among these factors, tempo is suggested to be the most relevant. Several studies aimed to demonstrate a significant relationship between tempo and heart rate at rest or during exercise (Karageorghis et al., 2006; Navarro et al., 2018; van Dyck et al., 2017).

In animals, a famous YouTube video⁹ of Snowball, a 12-year-old male cockatoo "dancing in rhythm" to music, led Patel and colleagues to study this phenomenon in 2009 (Patel et al., 2009a). Then, Snowball was subjected to a tempo of 108 bpm (*moderato – allegretto*) that was increased and decreased. Snowball was found to be able to synchronize to the tempo and even with variations (Patel et al., 2009b). This ability to synchronize the motor activity with music tempo was also observed in a 1-year old female lion (Cook et al., 2013).

The question of tempo was also examined with studies of preference. For example, adult marmosets and tamarins expressed a preference for slow tempo (65 bpm, *adagio*) compared to faster tempo (370 bpm, *prestissimo*; Mc Dermott and Hauser, 2007). At the same *prestissimo* (200 bpm), 4 week old piglets were more often seen walking, standing or tail wagging compared to piglets exposed to *adagio* (65 bpm; Li et al., 2019). This suggests that fast tempi would stimulate piglets and in a positive way since tail wagging is an indicator of positive emotion in pigs (Reimert et al., 2013). Finally,

⁷ "Cultural impact concerns the pervasiveness of the music within society or a sub-cultural group" (Karageorghis and Priest, 2012).

⁸ "association refers to the extra-musical associations that may be evoked" (Karageorghis and Priest, 2012) such as a film.

⁹ <https://www.youtube.com/watch?v=N7IZmRnAo6s>

young and adult gorillas were more active when they were exposed to music, with fast tempi (106-111 bpm) inducing higher activity than slow tempi (33-57 bpm) (Brooker, 2016).

It is therefore certain that tempo has a considerable influence on behavior and that a fast tempo increases animal activity. However, increased activity does not necessarily indicate well-being and positive emotion. In some cases, it may express emotional stress and a desire to escape. Further research is therefore necessary to conclude more precisely whether a tempo has a positive or negative effect on the animals.

3.4 Musicality

Musicality refers to harmony and to melody. As seen above (part 3.2.), musicality is suggested to play an important role in the motivational impact of music (Karageorghis and Priest, 2012). To take into account this factor, we need to investigate the capacity of animals to be sensitive to harmony and to discriminate instruments and/or voice in a piece of music. Harmony is the combination of successive musical sounds. In theory, “harmony is the science which regulates the formation and sequence of chords. [...] We noticed that superimposed melodic lines frequently provided chords of the type: C-E-G. It has been recognized that a string which vibrates, a ball which is struck, generate sounds in the same chords.”¹⁰ Consonant sounds (chords) are recognized by individuals as a unity, this cohesion and stability produces a pleasant listening sensation. Conversely, dissonant sounds give an impression of instability and an unpleasant listening sensation. Depending on culture, lifestyle and habits, it is therefore easy to understand that what seems consonant to one individual will seem dissonant to another. In this context, how could we define a consonant and dissonant sound for animals? Some authors addressed this question in European starlings (age unknown) (Hulse et al., 1995), adult Java sparrow (Watanabe et al., 2005) and 6 to 7 years old Japanese macaques (Izumi, 2000) by using operant conditioning tests. All found that the animals were able to distinguish between consonant and dissonant sounds. Moreover, there is an “innate” preference for consonant sounds in infant chimpanzee (17 weeks old) (Sugimoto et al., 2010) and in subadult chicks (2 months old) (Chiandetti and Vallortigara, 2011).

Furthermore, some authors examined whether instrument and voice in a piece of music are differently perceived by animals. In this aim, effects of different types of music on social behavior were examined in chimpanzees (Videan et al., 2007). The animals (male and female between 4 and 48 years old) were subjected to known classical (Pavarotti), easy-listening (Enya) vocal or instrumental music.

¹⁰ Definition from the collective book « Initiation à la musique. A l’usage des amateurs de musique et de radio », Ed. du Tambourinaire, 1935, 418pp, (personal translation).

These pieces of music also differed by their tempo (95-170 bpm for classical vocal and 50 to 90 bpm for easy-listening vocal). The authors concluded that instrumental music was more effective at increasing affiliative behaviors whereas vocal music was more effective at decreasing agonistic behaviors (Videan et al., 2007). Dogs presented with classical music (100-143 bpm) spent more time sleeping and less time vocalizing than dogs presented with heavy metal music (102-151 bpm), who spent more time body shaking (Kogan et al., 2012). This suggests a calming effect of classical music and an excitatory or stressful effect of heavy metal (Kogan et al., 2012). Because the characteristics such as sound level, harmony are unknown, it is difficult to fully understand these differences between types of music in the case of animals. However, they do support the idea that animals are able to express a preference between different types of music.

3.5 Music preferences

As mentioned before (3.1.), chimpanzees (Sugimoto et al., 2010) and chicks (Chiandetti and Vallortigara, 2011) are able to express preferences for consonant sounds compared to dissonant sounds. But, when animals are subjected to different pieces of music and to silence, individuals do not necessarily express the same preference - preferences are personal. For example, in four adult Java sparrows, two preferred Bach to Schoenberg or silence, and Vivaldi to Carter or silence. The two others preferred silence to Bach or Schoenberg. Interestingly, when preference was tested against noise, one of these two latter birds ran away from noise (Watanabe and Nemoto, 1998). Musical preferences have also been reported in growing piglets (Li et al., 2019) and adult tamarins and marmosets (Mc Dermott and Hauser, 2007). In milking cows, a study reported that the use of country music is efficient for conditioning cows on voluntary approach to an automatic milking system (Uetake et al., 1997).

The evidence of positive or negative impacts of auditory stimulations on animal physiology, immune system and behavior needs to be further investigated. Whereas harmful impacts of high levels of noise are reported in a large panel of species, positive impacts of music are more questionable but appear more evident in birds and primates than in other species. However, music is being more and more used in animal experimental facilities, for indoor reared farm animals or in zooparks. In the final section of this review, two examples of the practice of using music with animals (one in the context of a zoo and the other in cattle breeding) will be highlighted as well as an example of an experiment designed to understand the impact of music on motherless lambs reared with formula-milk.

IV EXAMPLES OF PRACTICE

4.1 Preventing stress with music at the ZooParc de Beauval¹¹

At the ZooParc de Beauval, the use of auditory stimulation began in 2001-2002 with the installation of speakers in the African savannah building that is dedicated to herbivores. These species are very reactive. Because of their gregarious nature, all the animals in the different groups could react sharply in a crowd movement after a sudden, loud or unknown noise. In addition to caregivers and veterinarians, the animals are exposed throughout the day to visitors, maintenance and construction workers. Caregivers first used radio with music and talk shows before changing to streaming music playlists. In this way, the animals were subjected to a large panel of music styles with different variations of rhythm and pitch. At night, background music was stopped to allow the animals to have a resting period with lesser ambient noise than during the day. The sound level of the auditory stimulations was neither measured nor fixed. The aim being that the level was sufficient to mask a large panel of ambient noise (metallic doors, engines...) but to be not too loud, at the risk of compromising the communication and the safety of the people working with the animals.

After the introduction of music the caregivers observed that the animals were more likely to keep calm and quiet when they were working in the building. For example, the Nyala (*Tragelaphus angasii*) housed in the Hippopotamus building with ambient music are less stressed than the Sitatunga (*Tragelaphus spekii*) housed on their own in an old building without music. Because of the positive impact of the auditory stimulation, it was also applied in the Asian savannah building since 2011-2012.

However the use of music is not applied to all species at the ZooParc de Beauval because not all species are as reactive to specific events as herbivores. In these other cases, specific protocols have been developed to handle individuals safely when necessary. For example, non-human primates are trained for simple medical procedures; carnivores such as lions, and tigers are not handled within the group; and species living in tropical buildings are presented with environmental sounds such as waterfalls and bird vocalizations.

Such a music exposure is therefore beneficial for the animal welfare whether it is a direct or indirect effect.

¹¹ Information collected during the phone interview with Baptiste Mulot, head of veterinarian (ZooParc de Beauval, Saint-Aignan, Loir-et-Cher), done the 21st of September 2020 by E. Chaillou and M. Siwiaszczyk.

4.2 Music used in Wagyu breeding in the aim to produce a very high quality of meat¹²

Christophe Hay discovered the Kobe meat in Japan and testifies never having felt such as a sensation on the palate. Determined to produce meat of this quality in France, he first worked with a Wagyu beef breeder but noticed that the quality of the meat was irregular. Therefore, he decided to buy his own herd of Wagyu in 2019 (now composed of 52 animals) in order to take care of animal well-being, control each stage of breeding and therefore the quality of the meat. His herd is raised by one of his childhood friends, in natural meadows. The breeding method of Wagyu is very specific. First, animals spend 36 months in meadows and then 9 months in a park of 15 m². The animals still have visual contacts with their conspecifics and access to cattle brushes. During these 9 months, all feeding is controlled and made up of 65% of flax and cereals. The aim of Christophe Hay is to respect the animal and to produce the best meat. Thus specific attention is paid to the well-being of these animals to keep them as calm and relaxed as possible. In this aim, and to provide a “presence” in their park when the breeder is not there, they are presented with calm music from a yoga playlist. To provide the animals with rest time the music is not continuous throughout the entire day. Instead it is played for 2 hours in the morning and 2 hours in the afternoon. The animals are also massaged with brushes by the breeder for 30-45 minutes every day. These enrichments have been observed to indeed relax the animals and to therefore produce high quality meat, which is well marbled. The efficiency of this practice is demonstrated by the reaction of the Wagyu. This breed is known to be reactive and afraid by many situations, such as human contact. Interestingly, the rearing conditions developed by Christophe Hay and his friend, modify the valence of human which is spontaneously and voluntarily approached by the individuals.

In this practice, music is included in a large panel of breeding practices, all of them playing a role in the well-being of the Wagyu. To maintain the best conditions possible throughout the life of the animal, Christophe Hay and his colleagues hope to be authorized to stream music during transport from the farm to the slaughterhouse. In this context, the animals could be maintained in a novel and stressful environment (track, slaughterhouse) with a known element, the music.

4.3 The use of music to counteract the negative impacts of motherless rearing conditions¹³

The aim of this study was to investigate the possibility that music exposure could counteract the negative impacts of maternal deprivation in sheep, which also results in formula-milk feeding rather than breastfeeding. This rearing condition is known to alter development in several mammal species.

¹² Information collected during the phone interview with Christophe Hay, Michelin-starred chef (La maison d'à côté, Montlivault, Loir-et-Cher, France) done the 22nd of September 2020 by E. Chaillou and M. Siwiaszczyk.

¹³ This study was designed to test our hypothesis on male and female. Male lambs were born between the 4th and 6th of March, were subjected to the experimental design the 11th. The study was stopped the 16th of March due to the Covid-19 pandemic, which means no females were included.

In lambs, this practice is commonly used in milk production and to save lambs when they cannot be reared by their mother. Our hypothesis was that music stimulates lambs which could be more active when they are exposed to music.

4.3.1 Method

To test our hypothesis, we designed a protocol in which male lambs were split into two groups at 7 ± 1 days of age. In the first week of life the lambs were separated from their mother at 24 h after birth (allowing colostrum ingestion) and subsequently trained to drink formula-milk with rubber teats. Both groups, control (CONT, $n=10$) and music (MUS, $n=10$), were reared in two distinct parks (length 5 m, width 3 m, height 1.7 m) equipped with video monitoring. To avoid noise pollution between the groups the parks were located in two distant rooms. The walls of the both parks were covered with honeycomb boxes to improve sound diffusion and the ground was covered with straw. Each park was equipped with a water-drinker, 3 rubber teats for *ad libitum* access to formula-milk, a trough containing hay, a trough containing granules, heating light to prevent hypothermia, and traffic cones for allow playing enrichment (Fig. 4). Light was switched on from 8:30 am to 6:00 pm. The MUS park was equipped with two speakers set at 1.7 m high, for music streaming and the CONT park was equipped with two dummy speakers set at the same height. In CONT group, the sound level of ambient noise varied between 30 and 71 dB. In the MUS group, the level of noise (ambient and music) varied between 31 and 66 dB.

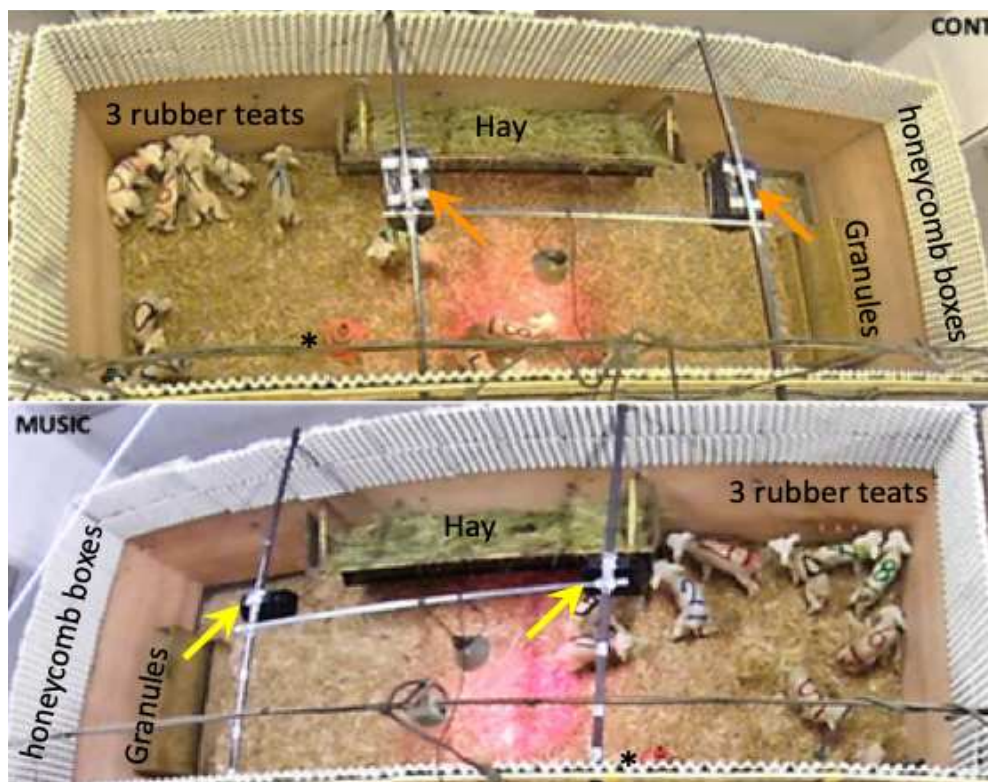


Figure 4: Organization of the two distinct parks of control lambs (CONT) and of music-exposed lambs (MUSIC). Note that the CONT park is equipped with two dummy speakers (orange arrows) to simulate the presence of speakers as in the MUSIC park (yellow arrows). For the rest, the both parks present exactly the same equipment: trough with hay, trough with granules, 3 rubber treats, heating light, honeycomb boxes and traffic cone (*).

Playlists were created with extracts from radio broadcasts “Radio Classique”. These extracts mainly contained instrumental or vocal pieces, and some spoken extracts (announcing of pieces of music). The music streaming was performed for 45 min every 90 min from 10:30 am to 5:15 pm (total of 3:45 hours a day).

Audiovisual recording was performed continuously from 7:30 am to 18:30 pm. Behavioral observations (Table 1) were realized for three days every 10 sec on four distinct 5-min phases: before and after the 1st music streaming of the day (10:30 am), and before and after the last music streaming of the day (17:15 pm). For each lamb, 12 phases were observed (30 scans per phase) and data have been expressed in mean \pm SD of number of times a behavior was observed (the maximum value being 30). The first observation (obs1) was done about two hours after the arrival of lambs in their respective park and human interventions (blood samples, weight...).

The impact of music exposure was tested by ANOVA repeated measures (# observation) with independent factor (CONT vs MUS) followed by post-hoc analyses corrected by Holm.

Behavior	Definition
Posture	
Stand up	Lamb is standing on all fours
Lying down	Lamb’s sternum is in contact with floor
Locomotion	
Walk	Progress slowly
Run	Progress fast
Exploration	Lamb is standing, nose in contact with sniffing movements of a part of park (walls, floor...)
Feeding	
Formula-milk	Lamb is feeding to the automatic milk supplier
Water	Lamb is drinking to the water-drinker

Hay	Lambs is eating hay
Granules	Lamb is eating granules to the trough

Table 1: Ethogram used for behavioral observations

4.3.1 Results

Looking at the mean number of times a behavior was expressed (Table 2), we noted that the highest occurrence was found for lying down posture, that the activity was related to the time of day (AM vs. PM observation sessions), and that the activity profiles differed throughout the three days and between groups. Statistical analyses confirmed these results (Table 2), suggesting that music impacts maintenance behaviors soon after three days of exposure. Group effects were found for locomotion and exploration, and interactions were found for all behaviors studied.

Behaviors	Group effect (CONT vs MUSIC)	Observation effect (repeated measures)	Factors interactions (Group x Observation)
Lying down posture	p = 0.54 F _{1,20} = 0.40 $\eta^2 = 7.7 \times 10^{-4}$	p < 0.001 F _{11,220} = 36.57 $\eta^2 = 0.41$	p < 0.001 F _{11,220} = 28.31 $\eta^2 = 0.32$
Locomotion	p = 0.002 F _{1,20} = 12.41 $\eta^2 = 0.052$	p < 0.001 F _{11,220} = 8.03 $\eta^2 = 0.20$	p < 0.001 F _{11,220} = 6.13 $\eta^2 = 0.15$
Exploration	p = 0.002 F _{1,20} = 12.70 $\eta^2 = 0.021$	p < 0.001 F _{11,220} = 44.91 $\eta^2 = 0.44$	p < 0.001 F _{11,220} = 27.66 $\eta^2 = 0.28$
Feeding	p = 0.114 F _{1,20} = 2.72 $\eta^2 = 0.009$	p < 0.001 F _{11,220} = 11.00 $\eta^2 = 0.22$	p < 0.001 F _{11,220} = 15.84 $\eta^2 = 0.31$

Table 2: Results of the statistical analysis

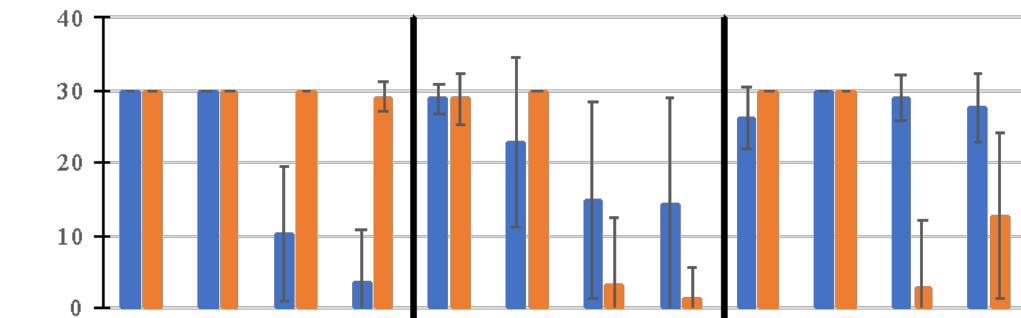
The two first days, control lambs were seen lied down more often during morning than afternoon (significant statistical differences were found between obs. 1 and 3, 2 and 4, 5 and 7, 6 and 8). The profile observed in music lambs is different since they were always seen lying down during the four observations of the day 1 (Fig. 5). The 2nd day, control and music lambs presented similar profiles and we noticed that during afternoon the control lambs were more often seen lying down than the music lambs (significant statistical differences were found between both groups for obs. 7 and 8). The day 3, music lambs seemed to be more active since they were less often seen lied down than the control lambs.

According to their age (7 days the day 1 of the observations), lambs were very rarely seen in locomotion (less than 5 times out of 30 scans per observation), this activity being more frequent

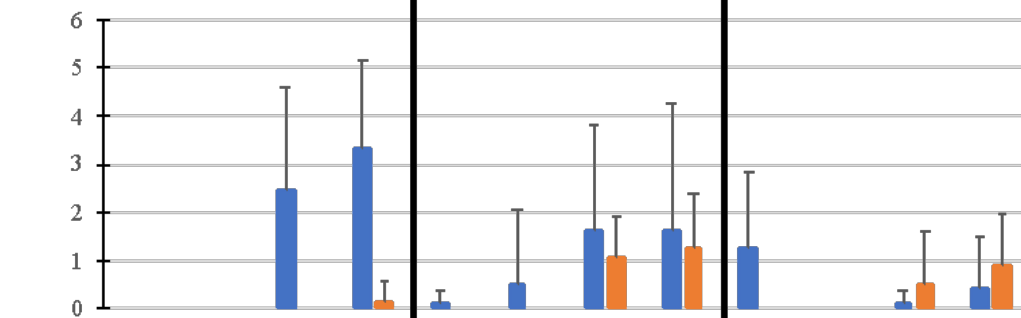
afternoon (obs. 3, 4, 7, 8, 11, 12) than morning (obs. 1, 2, 5, 6, 9, 10). Consistent with number of time lambs seen lying down, control lambs were more often seen in locomotion the afternoon than music lambs (significant statistical differences between control and music lambs for the obs. 3 and 4). From the 2nd day, the both groups presented the same profiles for locomotion.

While locomotion was rarely found throughout the scans, exploration was found more than 20 and feeding behavior more than 10 times out of 30 scans (Fig. 5). The first day, only some control lambs were seen in exploration and it was only during afternoon (significant statistical differences between obs. 1, 2 and obs. 4). Music lambs were more often seen in exploration than controls (significant statistical differences between control and music lambs for obs. 7 and 8). The profile for feeding activity was similar to thus found for exploration: its frequency was higher in the afternoon than in the morning and increased throughout the study. Moreover the profiles between control and music lambs were inverted from the 1st to the last day of the study (Fig. 5): day 1 control lambs were more often seen eating than music lambs (significant statistical differences for the obs. 4) and day 3 the contrary was found (significant statistical differences for the obs. 11 and 12).

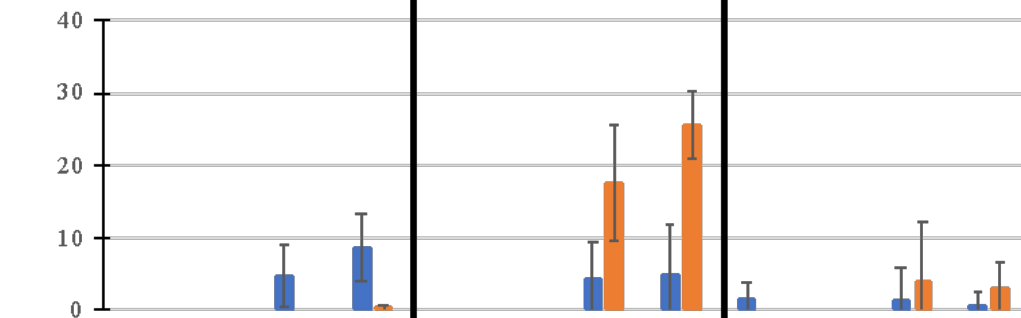
Lying down posture



Locomotion



Exploration



Feeding

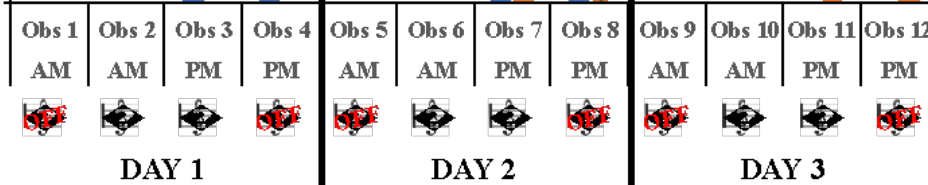
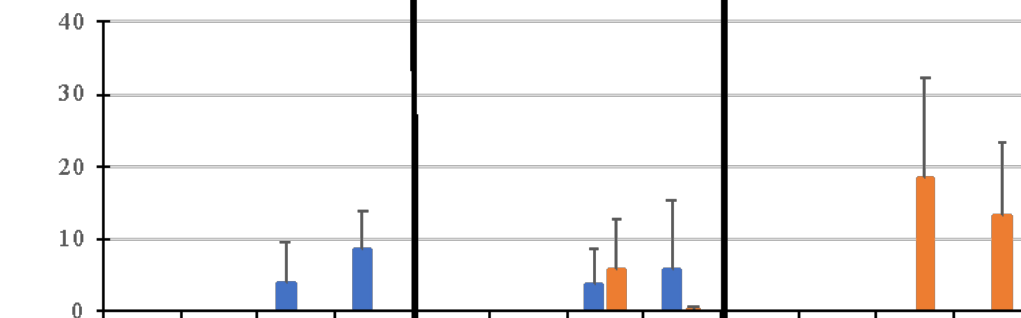


Figure 5: Mean number of times control (n = 11 in blue) and music (n = 11 in orange) were observed in lying down posture, locomotion, exploration or feeding for 30 scans (every 10 seconds for 5-min period) done morning (AM) or afternoon (PM) during three successive days when the lambs were 1 week old.

4.3.2 Preliminary conclusions

Regardless of the studied behavior, it can be concluded that the lambs are more active in the afternoon than in the morning, and that exposure to music has not modified this organization.

When the lambs were not seen lying down, they were in exploration or feeding activities, and the number of times animals were active was higher on day 3 compared to days 1 and 2. This finding could be explained by the age of the animals (10 days at the end of our study).

The interpretation of day 1 is difficult and could be contradictory for each of the 2 groups. The high level of activity observed in the control lambs could be interpreted as stress or on the contrary as well-being since the animals expressed exploration and feeding behaviors. For lambs exposed to music, their inactivity can be interpreted as a certain well-being since they slept without disturbance when exposed to music. But, again, the interpretation of this result can be totally different and the inactivity can be seen as stress-related behavior such as immobility.

The differences found on days 2 and 3 are consistent with our hypothesis: lambs exposed to music are more active than controls (evidenced by exploration and feeding behaviors).

Altogether, these preliminary observations suggest that the conditions of music exposure used in our experimental design were able to modify the maintenance and exploratory behaviors after only three days of exposure.

IV CONCLUSION AND REFERENCES

This review of the literature highlights that different kinds of sounds can impact differently on a large panel of functions, such as individual health, behavioral and physiological indicators of stress, or welfare, in humans as well as throughout the animal kingdom. While there are clear differences in the hearing ranges between vertebrates, there are also universalities in some parts of the auditory system, from its external part to the auditory neuronal network, and in an ability to communicate vocally and express emotions. This evidence provides support for the hypothesis that an ability to perceive and be impacted by music could be wide-spread in the animal kingdom.

The research reviewed shows that noise can have either negative or positive impacts on animals depending on the type of noise they are exposed to, the level of the noise and on other as yet unknown factors. More specifically to music, level, tempo and musicality appear to be important factors in determining its impact on an animal. However, more research systematically varying these factors in a variety of species is required to better understand their individual and interacting impact.

The examples provided here also highlight that, in practice, various stakeholders believe that music provides positive animal welfare benefits; while the limited scientific research reviewed indicates that several factors (duration, sound level, tempo musicality etc.) should be considered carefully to ensure

that the impact is indeed positive. In this aim, two complementary fields of investigation could be conducted, both of which require an interdisciplinarity approach. The first field of investigation would aim to describe the acoustic environment of animals, especially in captive/indoor conditions (zoo, livestock or pets), according to auditory stimulations and auditory abilities of a species. This first field of investigation exists and could progress by associating bioacoustics, neuroscience, ethology and comparative / evolutionary disciplines. The second field of investigation concerns the impact of music exposure to animal welfare. Studies performed in this aim are rare, not always published, whereas practices already exist in breeding and zoos. Developing participatory sciences with people who use music with animals, ethologists, animal caregivers, breeders, veterinarians is a relevant approach to evaluate the impact of music on animal welfare.

References

- Alladi P.A., Roy T., Singh N., Wadhwa S. (2005). Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 23, 363–373. doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.12.009
- Alladi P.A., Wadhwa S., Singh N. (2002). Effect of prenatal auditory enrichment on developmental expression of synaptophysin and syntaxin 1 in chick brainstem auditory nuclei. *Neuroscience* 114, 577–590. doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00319-6
- Alworth L.C., Buerkle S.C. (2013). The effects of music on animal physiology, behavior and welfare. *Lab Animal* 42, 54–61. doi.org/10.1038/lablan.162
- Angwin A.J., Wilson W.J., Arnott W.L., Signorini A., Barry R.J., Copland D.A. (2017). White noise enhances new-word learning in healthy adults. *Scientific Reports* 7, 13045. doi.org/10.1038/s41598-017-13383-3
- Berryman J.C. (1981). Guinea pig responses to conspecific vocalizations: Playback experiments. *Behavioral and Neural Biology* 31, 476–482. doi.org/10.1016/S0163-1047(81)91572-7
- Brooker J.S. (2016). An investigation of the auditory perception of western lowland gorillas in an enrichment study: Auditory Perception of Gorillas. *Zoo Biology* 35, 398–408. doi.org/10.1002/zoo.21312
- Campo J.L., Gil M.G., Dávila S.G. (2005). Effects of specific noise and music stimuli on stress and fear levels of laying hens of several breeds. *Applied Animal Behaviour Science* 91, 75–84. doi.org/10.1016/j.applanim.2004.08.028

- Carlsen E.N. (1975). Ultrasound physics for the physician a brief review. *Journal of clinical ultrasound* 3, 7.
- Carlson S., Rämä P., Artchakov D., Linnankoski I. (1997). Effects of music and white noise on working memory performance in monkeys. *NeuroReport* 8, 2853–2856. doi.org/10.1097/00001756-199709080-00010
- Chaudhury S., Jain S., Wadhwa S. (2010). Expression of synaptic proteins in the hippocampus and spatial learning in chicks following prenatal auditory stimulation. *Developmental Neuroscience* 32, 114–124. doi.org/10.1159/000279758
- Chaudhury S., Nag T.C., Wadhwa S. (2009). Effect of prenatal auditory stimulation on numerical synaptic density and mean synaptic height in the posthatch Day 1 chick hippocampus. *Synapse* 63, 152–159. doi.org/10.1002/syn.20585
- Chaudhury S., Nag T.C., Wadhwa S. (2008). Calbindin D-28K and parvalbumin expression in embryonic chick hippocampus is enhanced by prenatal auditory stimulation. *Brain Research* 1191, 96–106. doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.021
- Chaudhury S., Nag T.C., Wadhwa S. (2006). Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 32, 117–126. doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.07.002
- Chaudhury S., Wadhwa S. (2009). Prenatal auditory stimulation alters the levels of CREB mRNA, p-CREB and BDNF expression in chick hippocampus. *International journal of developmental neuroscience* 27, 583–590. doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.06.004
- Cheung C.W.C., Yee A.W.W., Chan P.S., Saravelos S.H., Chung J.P.W., Cheung L.P., Kong G.W.S., Li T.-C. (2018). The impact of music therapy on pain and stress reduction during oocyte retrieval – a randomized controlled trial. *Reproductive BioMedicine Online* 37, 145–152. doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.04.049
- Chianetti C., Vallortigara G. (2011). Chicks like consonant music. *Psychological Science* 22, 1270–1273. doi.org/10.1177/0956797611418244
- Chloupek P., Voslářová E., Chloupek J., Bedáňová I., Pištěková V., Večerek V. (2009). Stress in broiler chickens due to acute noise exposure. *Acta Veterinaria Brno* 78, 93–98. doi:10.2754/avb200978010093
- Christensen A.C., Knight A.D. (1975). Observations on the effects of music exposure to growing performance of meat-type chicks. *Poultry Science* 54, 619–621. doi.org/10.3382/ps.0540619

- Cook P., Rouse A., Wilson M., Reichmuth C. (2013). A California sea lion (*Zalophus californianus*) can keep the beat: Motor entrainment to rhythmic auditory stimuli in a non-vocal mimic. *Journal of Comparative Psychology* 127, 412–427. doi.org/10.1037/a0032345
- Dhungana S., Khanal D.R., Sharma M., Bhattarai N., Tamang D.T., Wasti S., Acharya R.C. (2018). Effect of music on animal behavior: A Review. *Nepalese Veterinary Journal* 35, 142–149. doi.org/10.3126/nvj.v35i0.25251
- Donofre A.C., da Silva I.J.O., Ferreira I.E.P. (2020). Sound exposure and its beneficial effects on embryonic growth and hatching of broiler chicks. *British Poultry Science* 61, 79–85. doi.org/10.1080/00071668.2019.1673315
- Engeland W.C., Miller P., Gann D.S. (1990). Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 258, R672–R677. doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R672
- Erbe C., Reichmuth C., Cunningham K., Lucke K., Dooling R. (2016). Communication masking in marine mammals: A review and research strategy. *Marine Pollution Bulletin* 103, 15–38. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.007
- Evans E. F. (1992). Auditory processing of complex sounds: an overview. *Philosophical Transaction of the Royal Society Biological Sciences* 336, 295–306. doi.org/10.1098/rstb.1992.0062
- Filippi P., Hoeschele M., Spierings M., Bowling D.L. (2019). Temporal modulation in speech, music, and animal vocal communication: evidence of conserved function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1453, 99–113. doi.org/10.1111/nyas.14228
- García-Casares N., Martín-Colom J.E., García-Arnés J.A. (2018). Music therapy in Parkinson's disease. *Journal of the American Medical Directors Association* 19, 1054–1062. doi.org/10.1016/j.jamda.2018.09.025
- Green A.C., Johnston I.N., Clark C.E.F. (2018). Invited review: The evolution of cattle bioacoustics and application for advanced dairy systems. *Animal* 12, 1250–1259. doi.org/10.1017/S1751731117002646
- Guesdon V., Ligout S., Delagrangé P., Spedding M., Lévy F., Laine A.-L., Malpoux B., Chaillou E. (2012). Multiple exposures to familiar conspecific withdrawal is a novel robust stress paradigm in ewes. *Physiology & Behavior* 105, 203–208. doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.011
- Guesdon V., Meurisse M., Chesneau D., Picard S., Lévy F., Chaillou E. (2015). Behavioral and endocrine evaluation of the stressfulness of single-pen housing compared to group-housing and

- social isolation conditions. *Physiology & Behavior* 147, 63–70. doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.013
- Hall S.J.G., Kirkpatrick S.M., Lloyd D.M., Broom D.M. (1998). Noise and vehicular motion as potential stressors during the transport of sheep. *Animal Science* 67, 467–473. doi.org/10.1017/S1357729800032884
- Hansen P.C.H., Doolan C.J., Hansen K.L. (2017). Fundamentals of acoustics and frequency analysis. Chap. 2., pp 57-118. In *Wind farm noise: measurement, assessment*. doi.wiley.com/10.1002/9781118826140.ch2
- Heffner H.E. (1998). Auditory awareness. *Applied Animal Behaviour Science* 57, 259-268. doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00101-4
- Heffner R.S., Heffner H.E. (1980). Hearing in the elephant (*Elephas maximus*). *Science* 208, 518–520. doi.org/10.1126/science.7367876
- Heffner R.S. (2004). Primate hearing from a mammalian perspective. *The Anatomical Record*. 281A, 1111-1122. doi.org/10.1002/ar.a.20117
- Hill E.M., Koay G., Heffner R.S., Heffner H.E. (2014). Audiogram of the chicken (*Gallus gallus domesticus*) from 2 Hz to 9 kHz. *Journal of Comparative Physiology A* 8.
- Houser D.S., Finneran J.J. (2006). A comparison of underwater hearing sensitivity in bottle-nose dolphins (*Tursiops truncatus*) determined by electrophysiological and behavioral methods. *The Journal of the Acoustical Society of America* 120, 1713–1722. doi.org/10.1121/1.2229286
- Hulse S.H., Bernard D.J., Braaten R.F. (1995). Auditory discrimination of chord-based spectral structures by European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Journal of experimental psychology: General* 124, 409–423.
- Itatani N., Klump G.M. (2017). Animal models for auditory streaming. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 372, 20160112. doi.org/10.1098/rstb.2016.0112
- Izumi A. (2000). Japanese monkeys perceive sensory consonance of chords. *The Journal of the Acoustical Society of America* 108, 3073–3078. doi.org/10.1121/1.1323461
- Jackson L.L., Heffner R.S., Heffner H.E. (1999). Free-field audiogram of the Japanese macaque (*Macaca fuscata*). *The Journal of the Acoustical Society of America* 106, 3017–3023. doi.org/10.1121/1.428121
- Jones A.R., Bizo L.A., Foster T.M. (2012). Domestic hen chicks' conditioned place preferences for sound. *Behavioural Processes* 89, 30–35. doi.org/10.1016/j.beproc.2011.10.007

- Kanitz E., Otten W., Tuchscherer M. (2005). Central and peripheral effects of repeated noise stress on hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis in pigs. *Livestock Production Science* 94, 213–224. doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.12.002
- Karageorghis C.I., Jones L., Low D.C. (2006). Relationship between exercise heart rate and music tempo preference. *Research Quarterly for Exercise and Sport* 77, 240–250. doi.org/10.1080/02701367.2006.10599357
- Karageorghis C.I., Priest D.-L. (2012). Music in the exercise domain: a review and synthesis (Part I). *International Review of Sport and Exercise Psychology* 5, 44–66. doi.org/10.1080/1750984X.2011.631026
- Kathpalia P., Nag T.C., Chattopadhyay P., Sharma A., Bhat M.A., Roy T.S., Wadhwa S. (2019). In ovo sound stimulation mediated regulation of BDNF in the auditory cortex and hippocampus of neonatal chicks. *Neuroscience* 408, 293–307. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.04.014
- Kawakami K., Tomonaga M., Suzuki J. (2002). The calming effect of stimuli presentation on infant Japanese Macaques (*Macaca fuscata*) under stress situation: a preliminary study. *Primates* 43, 73–85.
- Koelsch S., Jäncke L. (2015). Music and the heart. *European Heart Journal* 36, 3043–3049. doi.org/10.1093/eurheartj/ehv430
- Kogan L.R., Schoenfeld-Tacher R., Simon A.A. (2012). Behavioral effects of auditory stimulation on kennel dogs. *Journal of Veterinary Behavior* 7, 268–275. doi.org/10.1016/j.jveb.2011.11.002
- Köppl C. (2011). Birds – same thing, but different? Convergent evolution in the avian and mammalian auditory systems provides informative comparative models. *Hearing Research* 273, 65–71. doi.org/10.1016/j.heares.2010.03.095
- Ladich F., Winkler H. (2017). Acoustic communication in terrestrial and aquatic vertebrates. *Journal of Experimental Biology* 220, 2306–2317. doi.org/10.1242/jeb.132944
- Lee J.H. (2016). The effects of music on pain: A meta-analysis. *Journal of Music Therapy* 53, 430–477. doi.org/10.1093/jmt/thw012
- Leventhall G. (2007). What is infrasound? *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 93, 130–137. doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.006
- Li X., Zhao J.N., Zhao P., Zhang X., Bi Y.J., Li J.H., Liu H.G., Wang C., Bao J. (2019). Behavioural responses of piglets to different types of music. *Animal* 13, 2319–2326. doi.org/10.1017/S1751731119000260

- Mc Dermott J., Hauser M. (2007). Nonhuman primates prefer slow tempos but dislike music overall. *Cognition* 104, 654–668. doi.org/10.1016/j.cognition.2006.07.011
- Navarro J., Osiurak F., Reynaud E. (2018). Does the tempo of music impact human behavior behind the wheel? *Hum Factors* 60, 556–574. doi.org/10.1177/0018720818760901
- Oertel D. (1999). The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annual Review of Physiology* 61, 497–519. doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.497
- Ogden J.J., Lindburg D.G., Maple T.L. (1994). A preliminary study of the effects of ecologically relevant sounds on the behaviour of captive lowland gorillas. *Applied Animal Behaviour Science* 39, 163–176. doi.org/10.1016/0168-1591(94)90136-8
- Otten W., Kanitz E., Puppe B., Tuchscherer M., Brüssow K.P., Nürnberg G., Stabenow B. (2004). Acute and long term effects of chronic intermittent noise stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary axis in pigs. *Animal Science* 78, 271–283. doi.org/10.1017/S1357729800054060
- Papoutsoglou S.E., Karakatsouli N., Louizos E., Chadio S., Kalogiannis D., Dalla C., Polissidis A., Papadopoulou-Daifoti Z. (2007). Effect of Mozart’s music (Romanze-Andante of “Eine Kleine Nacht Musik”, sol major, K525) stimulus on common carp (*Cyprinus carpio* L.) physiology under different light conditions. *Aquacultural Engineering* 36, 61–72. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.07.001
- Papoutsoglou S.E., Karakatsouli N., Papoutsoglou E.S., Vasilikos G. (2010). Common carp (*Cyprinus carpio*) response to two pieces of music (“Eine Kleine Nachtmusik” and “Romanza”) combined with light intensity, using recirculating water system. *Fish Physiology and Biochemistry* 36, 539–554. doi.org/10.1007/s10695-009-9324-8
- Papoutsoglou S.E., Karakatsouli N., Skouradakis C., Papoutsoglou E.S., Batzina A., Leondaritis G., Sakellaris N. (2013). Effect of musical stimuli and white noise on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth and physiology in recirculating water conditions. *Aquacultural Engineering* 55, 16–22. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.01.003
- Patel A.D., Iversen J.R., Bregman M.R., Schulz I. (2009a). Studying synchronization to a musical beat in nonhuman animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1169, 459–469. doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04581.x
- Patel A.D., Iversen J.R., Bregman M.R., Schulz I. (2009b). Experimental evidence for synchronization to a musical beat in a nonhuman animal. *Current Biology* 19, 827–830. doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.038

- Pickens T.A., Khan S.P., Berlau D.J. (2018). White noise as a possible therapeutic option for children with ADHD. *Complementary Therapies in Medicine* 20. doi.org/10.1016/j.ctim.2018.11.012
- Pickles J.O. (2015). Auditory pathways, in: Handbook of Clinical Neurology. Elsevier, pp. 3–25. doi.org/10.1016/B978-0-444-62630-1.00001-9
- Ravignani A., Dalla Bella S., Falk S., Kello C.T., Noriega F., Kotz S.A. (2019). Rhythm in speech and animal vocalizations: a cross-species perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1453, 79–98. doi.org/10.1111/nyas.14166
- Reimert I., Bolhuis J.E., Kemp B., Rodenburg T.B. (2013). Indicators of positive and negative emotions and emotional contagion in pigs. *Physiology & Behavior* 109, 42-50. doi.org/j.physbeh.2012.11.002
- Reis A., dos Dalmolin S.P., Dallegrave E. (2017). Animal models for hearing evaluations: a literature review. *Rev. CEFAC* 19, 417–428. doi.org/10.1590/1982-021620171932117
- Roberto M., Hamernik R.P., Turrentine G.A. (1989). Damage of the auditory system associated with acute blast trauma. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 98, 23–34. doi.org/10.1177/00034894890980S506
- Rouiller E.M., Welker E. (2000). A comparative analysis of the morphology of corticothalamic projections in mammals. *Brain Research Bulletin* 53, 727–741. doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00364-6
- Sanyal T., Kumar V., Nag T.C., Jain S., Sreenivas V., Wadhwa S. (2013). Prenatal loud music and noise: differential impact on physiological arousal, hippocampal synaptogenesis and spatial behavior in one day-old chicks. *PLoS ONE* 8, e67347. doi.org/10.1371/journal.pone.0067347
- Sebe F., Aubin T., Boue A., Poindron P. (2008). Mother-young vocal communication and acoustic recognition promote preferential nursing in sheep. *Journal of Experimental Biology* 211, 3554–3562. doi.org/10.1242/jeb.016055
- Soltis J. (2009). Vocal communication in African Elephants (*Loxodonta africana*). *Zoo Biology* 29, 192-209. doi.org/10.1002/zoo.20251
- Sugimoto T., Kobayashi H., Nobuyoshi N., Kiriya Y., Takeshita H., Nakamura T., Hashiya K. (2010). Preference for consonant music over dissonant music by an infant chimpanzee. *Primates* 51, 7–12. doi.org/10.1007/s10329-009-0160-3
- Šuta D., Popelá J., Syka J. (2008). Coding of communication calls in the subcortical and cortical structures of the auditory system. *Physiological Research*. 57, S149-S159

- Tavernier C., Ahmed S., Houpt K.A., Yeon S.C. (2020). Feline vocal communication. *Journal of Veterinary Science* 21, e18. doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e18
- Tubelli A.A., Zosuls A., Ketten D.R., Mountain D.C. (2018). A model and experimental approach to the middle ear transfer function related to hearing in the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *The Journal of the Acoustical Society of America* 144, 525–535. doi.org/10.1121/1.5048421
- Uetake K., Hurnik J.F., Johnson L. (1997). Effect of music on voluntary approach of dairy cows to an automatic milking system. *Applied Animal Behaviour Science* 53, 175–182. doi.org/10.1016/S0168-1591(96)01159-8
- van Dyck E., Six J., Soyer E., Denys M., Bardijn I., Leman M. (2017). Adopting a music-to-heart rate alignment strategy to measure the impact of music and its tempo on human heart rate. *Musicae Scientiae* 21, 390–404. doi.org/10.1177/1029864917700706
- Velásquez N.A. (2014). Geographic variation in acoustic communication in anurans and its neuroethological implications. *Journal of Physiology-Paris* 108, 167–173. doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.10.001
- Vergne A.L., Pritz M.B., Mathevon N. (2009). Acoustic communication in crocodylians: from behaviour to brain. *Biological Reviews* 84, 391–411. doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00079.x
- Vetter B.J., Brey M.B., Mensinger A.F. (2018). Reexamining the frequency range of hearing in silver (Hypophthalmichthys molitrix) and bighead (H. nobilis) carp. *PLoS ONE* 13, e0192561. doi.org/10.1371/journal.pone.0192561
- Videan E.N., Fritz J., Howell S., Murphy J. (2007). Effects of two types and two genre of music on social behavior in captive chimpanzees. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 46, 5.
- Walker K.M.M., Bizley J.K., King A.J., Schnupp J.W.H. (2011). Cortical encoding of pitch: Recent results and open questions. *Hearing Research* 271, 74–87. doi.org/10.1016/j.heares.2010.04.015
- Wang S., Agius M. (2018). The use of music therapy in the treatment of mental illness and the enhancement of societal wellbeing. *Psychiatria Danubina* 30, 595–600.
- Watanabe S., Nemoto M. (1998). Reinforcing property of music in Java sparrows 8. *Behavioural Processes* 43, 211-218. doi.org/10.1016/S0376-6357(98)00014-X
- Watanabe S., Uozumi M., Tanaka N. (2005). Discrimination of consonance and dissonance in Java sparrows. *Behavioural Processes* 70, 203–208. doi.org/10.1016/j.beproc.2005.06.001

- Waynert D.F., Stookey J.M., Schwartzkopf-Genswein K.S., Watts J.M., Waltz C.S. (1999). The response of beef cattle to noise during handling. *Applied Animal Behaviour Science* 17, 27-42.
- Wells D.L., Coleman D., Challis M.G. (2006). A note on the effect of auditory stimulation on the behaviour and welfare of zoo-housed gorillas. *Applied Animal Behaviour Science* 100, 327–332. doi.org/10.1016/j.applanim.2005.12.003
- Williamson J. (1992). The effects of ocean sounds on sleep after coronary artery bypass graft surgery. *American Journal of Critical Care* 1, 91-97. doi.org/10.4037/ajcc1992.1.1.91
- Zhivomirov H. (2018). A method for colored noise generation. *Romanian Journal of Acoustics and Vibration* 15, 14-19. rjav.sra.ro/index.php/rjav/article/view/40

Acknowledgements

This project is supported by Region Centre Val de Loire and INRAE Centre Val de Loire. Experimentation was supported by the APR Neuro2Co grant (2018-2022), the PhD (Marine Siwiaszczyk) salary is covered by the APR Neuro2Co grant, Beauval Nature and INRAE (Phase department), internship gratification (Guillaume Ubiema) was covered by the APR Neuro2Co grant from the Region Centre Val de Loire. The authors thank the UEPAO unit (animal facilities) for taking care of the animals during the experimentation.

Nous remercions l'équipe d'Episciences pour son support et les collègues de JDMDH pour la première version de cette charte graphique.

2. Talking sheep – “Bah, Bah”

Talking sheep - “Bah, Bah”

Marine Siwiaszczyk¹, Scott A. Love¹, Elodie Chaillou¹

¹Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC), INRAE, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

Article soumis pour publication le 30 avril 2021
dans *Frontiers for Young Minds*

Le journal *Frontiers for Young Minds* est un journal scientifique dédié aux enfants. La relecture se fait par un groupe d'enfants encadré par un professeur.

Abstract

If you've ever been out to the countryside in the spring, you might have heard sheep bleating to their lambs. Sheep also bleat when they are separated from the flock or stressed in some other way. To us, all these bleats sound very similar. But do you think they also sound similar to the lambs? Or do you think they know whose mother is calling and what they are saying? Scientists try to interpret the bleats of sheep by observing their behavior when they hear these sounds. They study the sound waves of recorded bleats to identify each sheep's unique voice and even how they are feeling. They also investigate the brain to find out what's going on inside their head when they hear these sounds. Studies show that sheep really can recognize each other's voices and communicate vocally.

Keywords: Behavior - Sound Analysis - Brain - Vocalization – Communication

Communicating with sound

People communicate with each other by talking but do you think animals can also talk to each other? You probably answered, “no”. But do you think animals can *communicate* with each other? If you have ever lived with a pet then you probably know that they are even capable of communicating with *us*. A dog can ask you to throw a stick just by dropping it at your feet. A cat can ask for food by rubbing against your leg. These animals are using behavior to communicate information - “throw the stick” and “give me food”. If you don't do what they are asking, the dog might bark and the cat might meow to insist that they really want you to do it, now. Barking and meowing are examples of animals using sounds produced by the mouth (like talking) to communicate. By observing animals in farms, zoos or in nature, ethologists have discovered that many animals are able to communicate using sounds, called vocalizations or bleats for sheep.

Interpreting sheep sounds from their behavior

To interpret the meaning of sheep vocalizations, ethologists often study their bleats and their behavior at the same time using video cameras and microphones. Observing sheep in this way, ethologists showed that an ewe and her lamb can communicate using what they called low- and high-bleats. Low-bleats are emitted with a closed mouth, when a ewe and her lamb are close to each other, during caregiving moments such as suckling or licking. High-bleats are emitted with the mouth wide open, when a ewe and her lamb are separated. It's a bit like when parents call their children who are too far away! These high-bleats are also emitted by adult sheep when they are separated from their herd, when they are stressed and even when their food arrives late! These observations allow us to interpret

low-bleats as comforting vocalizations and high-bleats as distress calls. But scientists don't only *observe* animals, they also create experiments using behavioral tests to investigate how sheep use bleats to communicate.

The two-choice behavioral test helps us to understand whether animals can tell the difference between two sounds. If you heard a dog bark and a cat meow you could easily say which was the dog. If you heard a ewe bleat and a lamb bleat, could you correctly say which was the ewe? These are both examples of two-choice tests in which you are asked to give your answer by speaking. But sheep cannot *tell* us the answer, so how do they respond in a two-choice test?

One method that scientists use is to present the bleats in different locations, one on the left and one on the right (Figure 1). When the sheep hear the bleats they can behave in different ways. Scientists count how many times the sheep chooses (walks towards and stays near) each location (sound). In one study lambs had to choose between the bleat of their mother in one location and the bleat of an unfamiliar ewe in a different location (1). The lambs could not see or smell the ewes, they could only hear them. The results showed that lambs chose the sound of their mother much more than the sound of the unfamiliar ewe. So we know that lambs prefer the bleats of their own mother and also that they can tell the difference between the bleats of different sheep. From a similar test we also know that sheep prefer the bleats of their friends who live in the same barn more than the bleats of unknown sheep.

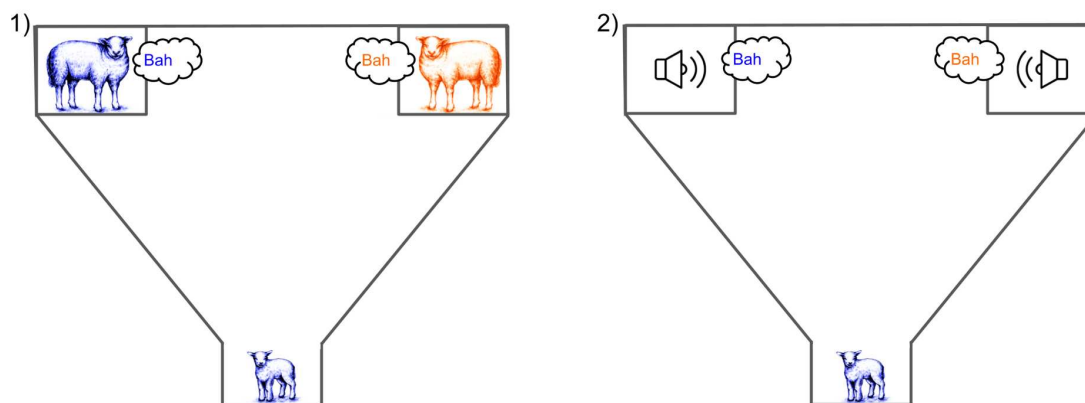


Figure 1. Schematic drawing of a two-choice behavioral test. In this type of test, lambs hear two bleats coming from different locations and can show that it prefers one of the bleats by walking towards and staying near it.

1) A lamb can hear the bleats of two ewes that they cannot see. One ewe is its mother (blue) and the other is an unfamiliar ewe (orange). 2) The bleats of the mother (blue) and unfamiliar ewe (orange) are presented from speakers in different locations. Scientists count the number of times that the lamb walks towards each bleat location.

How do you think the sounds are presented in these tests? Well there are two different ways: 1) the bleats can be made by sheep present but not visible during the test or 2) the bleats can be recorded with a microphone long before and presented using speakers during the test (Figure 1). One of the problems with the bleats being made by actual sheep is that the sheep can “say” whatever they want. Scientists can’t control their use of high-bleats or low-bleats. So to test whether lambs preferred high- or low-bleats it was necessary to use speakers. These speakers are used to playback only high-bleats from one location and only low-bleats from a different location (1). This test actually showed that lambs did not have a preference, maybe they liked both. Another good reason to record and playback the bleats is that we can also get interesting information from analyzing their sound waves.

Analyzing the bleat sound wave

Sound waves have physical properties that can be measured and analyzed. One important physical property of a sound is its amplitude. If you hear a sound with a high amplitude, it will be loud. If you hear a low amplitude sound, it will be quieter. Similarly, high-bleats are louder than low-bleats because they have a higher amplitude. These bleats also have different frequencies, which is another important physical property. High-bleats have a higher frequency than low-bleats. To understand what different frequencies actually sound like you could imagine the sound of a whistle (high frequency) and the sound of thunder (low frequency). Bioacousticians study amplitude, frequency and other physical properties of sounds to identify their acoustical signature.

When you talk on the telephone, you can recognize the person from their voice. You can do this because each person's voice has a vocal signature. Like a fingerprint a person’s vocal signature is unique to them. It is a unique combination of physical sound properties. Earlier we learned that sheep can tell the difference between the bleats of different sheep. So how do you think this is possible? By studying the physical properties of sheep vocalizations, bioacousticians have shown that sheep also have vocal signatures that can be used to tell them apart (2).

It is not only an individual’s identity that is stored in a combination of these properties, it could also be what the animal is feeling. Scientists are currently trying to link how an animal is feeling with a unique combination of these physical properties. If successful, they could develop a computer program that can detect different types of bleats by analyzing the combination of sound properties. This is interesting because we could automatically detect, for example, when an animal on a farm is in pain (3). The farmer could then be alerted and go to help the animal.

What is the role of the sheep brain in vocal recognition?

Lots of research is still needed for neuroscientists to answer this question. But by studying sheep brain anatomy and what we know about the human brain, it is possible to hypothesize the role of the brain in sheep communication.

The first role of the brain is sound perception through the auditory system (Figure 2). This system includes the ear with its external and internal parts and specific brain structures. The reception of the sound is performed by the ear. The physical properties of sound (e.g., frequency) are transmitted to the eardrum and the cochlea. The cochlea encodes the sound into an electrical signal. This transformation is based on the frequencies of the sound and is done by the cochlear hair cells. These hair cells are very thin and fragile and can be broken if you listen to music that is too loud. This electrical signal flows through the cochlear nerve, the cochlear nucleus, the inferior colliculi, the medial geniculate nucleus to finally arrive in the auditory cortex. We know where these regions are in the sheep brain (Figure 2) but there is no evidence of the role they play in sheep communication. The second role of the brain is the interpretation and recognition of sounds. Here, several other parts of the brain are involved, such as the amygdala, known to combine different sensory information (olfactory, visual and auditory), and the hippocampus, known to have a major role in memory. These two roles of the brain enable sheep to learn different sensory information from their lambs and to recognize them. To help neuroscientists better understand the role of the brain in sheep communication, they can use imagery techniques that are beginning to be used with farm animals. These techniques allow us to see how the brain functions. The most famous being electrophysiology and functional magnetic resonance imaging (4).

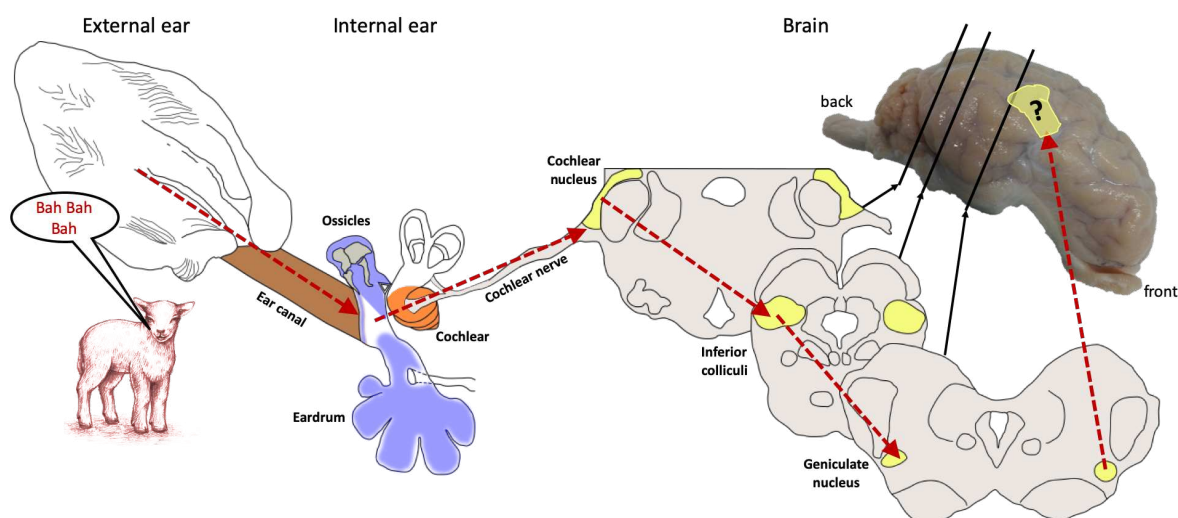


Figure 2. Sound perception through the auditory system (red arrows). The first organ of the auditory system is the external ear, which localizes the sound (“bah”). Ear canal (brown) protects the eardrum. Sound is amplified by the eardrum

(purple) then encoded by the cochlea (orange) into an electrical signal. This signal is transmitted to the brain through the cochlear nerve, cochlear nucleus, inferior colliculi and geniculate nucleus before arriving at the auditory cortex (yellow). In sheep, the cochlear nucleus, the inferior colliculi and the geniculate nucleus have been identified by neuroanatomy studies whereas the auditory cortex has not been clearly identified.

Conclusion

Sheep, like other animals, can communicate using sound. By studying their behavior ethologists have shown that sheep can tell apart one sheep from another by only listening to their bleats. They can do this because each sheep has its own vocal signature contained within its bleat. The sound wave of bleats can also contain information about how a sheep is feeling. Bioacousticians are trying to find this information to help, for example, farmers detect when their animals are in pain. Neuroscientists investigate the structure and function of the brain to understand its role in vocal communication. To fully understand sheep communication it is important for ethologists, bioacousticians and neuroscientists to work together. This will help us to understand sheep more globally. The more we know about the lives of sheep the more chance we have at improving the lives of this farm animal.

Glossary

Communication: the sharing of information.

Ewe: adult female sheep.

Suckling: the lamb feeds on its mother's milk.

Ethologist: a scientist who studies animal behavior.

Bioacoustician: a scientist who studies the sounds produced by animals and the anatomy used to produce (e.g., the mouth), hear (e.g., the ear) and interpret (e.g., the brain) them.

Neuroscientist: a scientist who studies the brain.

References

1. Sèbe F, Duboscq J, Aubin T, Ligout S, Poindron P. Early vocal recognition of mother by lambs: contribution of low- and high-frequency vocalizations. *Anim Behav.* 2010 May;79(5):1055–66.
2. Searby A, Jouventin P. Mother-lamb acoustic recognition in sheep: a frequency coding. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2003 Sep 7;270(1526):1765–71.
3. Mcloughlin MP, Stewart R, McElligott AG. Automated bioacoustics: methods in ecology and conservation and their potential for animal welfare monitoring. *J R Soc Interface.* 2019 Jun

28;16(155):20190225.

4. Amanamba U, Sojka A, Harris S, Bucknam M, Hegdé J. A Window Into Your Brain: How fMRI Helps Us Understand What Is Going on Inside Our Heads. *Front Young Minds*. 2020;8(484603).

III. Impact de la musique sur les agneaux élevés en allaitement artificiel

1. Résumé de l'article

L'élevage ovin a recours à l'allaitement artificiel des agneaux séparés précocement de leur mère et nourris avec un lait artificiel. Cette pratique nuit au développement du jeune qui présente de nombreuses altérations comportementales, endocriniennes et de sa santé. Pour contrecarrer les effets délétères de l'allaitement artificiel, plusieurs techniques ont été testées telles que l'utilisation de nourrices (Brunet et al., 2016) ou l'ajout d'objet dans l'enclos d'élevage en tant qu'enrichissement du milieu (Gaudin et al., 2018). Un élément potentiel d'enrichissement du milieu n'a pas encore été étudié : la diffusion de musique. En effet, la diffusion de musique a montré des effets positifs chez différentes espèces animales telles que le chimpanzé (Howell et al., 2003) ou le cochon (J. Li et al., 2021; X. Li et al., 2019). Grâce à ces études, nous nous posons la question d'un effet bénéfique de la diffusion de musique pour contrecarrer l'absence de la mère pour les agneaux en allaitement artificiel. Notre hypothèse est que la diffusion de musique classique va aider à contrecarrer les effets délétères de l'allaitement artificiel et les modifications neurobiologiques induites. La diffusion de musique pourrait améliorer le bien-être des agneaux, modifier leur réactivité émotionnelle ainsi que leur morphologie cérébrale.

Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé deux groupes de 14 agneaux chacun (7 mâles et 7 femelles). Le premier groupe d'agneau est élevé en allaitement artificiel conventionnel tandis que le deuxième groupe est élevé en allaitement artificiel avec un environnement enrichi par la diffusion de musique classique. Pour évaluer la croissance des agneaux, nous avons réalisé des pesées et un relevé d'état sanitaire hebdomadaires. Pour évaluer le bien-être des agneaux, nous avons étudié leur comportement, leur réactivité émotionnelle ainsi que leur motivation sociale. Enfin, nous avons étudié l'impact de la diffusion de musique sur la morphologie à l'aide de l'IRM.

La diffusion de musique classique n'a pas d'impact sur l'état sanitaire des agneaux. Cependant, le poids corporel des agneaux exposés à la musique est inférieur à celui des agneaux non exposés. Les analyses comportementales n'ont pas permis de comprendre cette différence. Des différences comportementales ont été relevées entre les deux groupes, indiquant un effet de la musique avec des agneaux exposés à la musique qui mangent plus et qui vont être vus moins souvent debout en train d'explorer. La diffusion de musique classique a impacté deux régions cérébrales : le noyau caudé qui est plus petit chez les agneaux exposés à la musique et le noyau géniculé médial qui est plus gros pour les agneaux exposés à la musique. Lors des tests de réactivité émotionnelle, la musique semble

avoir un effet apaisant pour les agneaux exposés, effet qui n'apparaît pas pour les agneaux non exposés. Toutes les différences observées au cours de l'expérience montrent que la musique a des effets sur les agneaux, exposés ou non à la musique pendant l'élevage, mais ne permettent pas de conclure quant à ses effets positifs.

2. Impact of classical music on emotional reactivity and brain morphology of lambs bred by mother-deprivation with milk replacement

En préparation

Impact of classical music on emotional reactivity and brain morphology of lambs bred by mother-deprivation with milk replacement

Marine Siwiaszczyk¹, Céline Parias¹, Raymond Nowak¹, Frédéric Lévy¹, Mélody Morisse¹, Quentin Derian¹, Olivier Lasserre², Didier Dubreuil², Scott A Love¹, Elodie Chaillou¹

¹CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, PRC, Nouzilly, France

²CNRS, IFCE, INRAE, Université de Tours, UEPAO, Nouzilly, France

Abstract

It is common practice in sheep breeding to raise lambs without their mother and for them to be fed with milk replacement. This practice is deleterious for the development of the lambs who present behavioral, endocrine and health alterations. To counteract the deleterious effects of this mother-deprivation with milk replacement, several techniques have been tested such as the use of nurses or the addition of objects in the breeding enclosure as environmental enrichment. A potential element of environmental enrichment has not yet been studied: the diffusion of music. Indeed, the diffusion of music has shown positive effects in several animal species such as the chimpanzee or the pig. We hypothesize that the diffusion of classical music may help to counteract the deleterious effects of mother-deprivation with milk replacement in lambs. Playing music could improve the well-being of lambs, modify their emotional reactivity as well as their brain morphology. To test this hypothesis 28 lambs were bred by conventional mother-deprivation with milk replacement but only half were exposed to a diffusion of classical music as an environmental enrichment. During breeding, music leads to a lower body weight and to modified behavior. Music-exposed lambs were more often seen in eating behavior and less often seen in exploration. During emotional reactivity tests, music appeared to have a calming effect on music-exposed lambs, which was not evident for unexposed lambs. Overall the experiment showed that music had effects on the lambs but it did not clearly show positive effects on well-being.

Keywords: behavior – lambs – MRI – music – reactivity

Acknowledgements

We are grateful to all the members of the Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière for taking care of the lambs. We also wish to thank PIXANIM for the MRI acquisitions and the Laboratoire de phénotypage-endocrinologie for the hormone assays.

Introduction

Sheep (*Ovis aries*) are common farm animals used for meat and milk production. In conventional dairy farms, lambs are bred by mother-deprivation with milk replacement, whereas for meat production lambs are bred with their mother. However, even for meat production, lambs can be bred by mother-deprivation with milk replacement. This is the case when the lamb's mother is not maternal, is sick or has too many lambs to raise. When the lambs are raised with their mother, they ingest her colostrum, essential for passive immunity transfer to the lambs (Hernandez et al., 2009; Khan & Ahmad, 1997; Nowak & Poindron, 2006). This colostrum ingestion also helps to create a link between the mother and her lamb and promote the recognition of the mother by the lamb (Val-Laillet et al., 2004, 2006). This recognition is important since maternal care is provided exclusively to their own lamb, it is selectivity (Nowak, 1999a). The factors that facilitate recognition of a lamb by its mother differ depending on whether it is near or far from the mother. If the lamb is at a distance from its mother, it is the acoustic and visual signals that facilitate recognition (takes place 12 hours after birth) while when the lamb is close to its mother, it is olfaction that is favored for recognition (takes place 4 hours after birth) (Nowak, 1999b). This recognition and preference also take place in the reciprocal direction, from the lamb towards its mother (Nowak et al., 1997). Previous studies have shown that mother-deprivation with milk replacement has a negative effect on the development of the lambs. Lambs bred by mother-deprivation with milk replacement rather than being fed by their mother have an altered behavioral repertoire (Napolitano et al., 2008), health (Latham & Mason, 2008) and endocrine axis (Gaudin et al., 2018). Mother-deprivation with milk replacement influences the maturation of brain regions such as the caudate nucleus. The volume of the caudate nucleus is smaller for the mother-deprived lambs than for the lambs bred with their mother (Love et al., 2021). The parameters of microstructural data of the brain are also impacted by the mother-deprivation with milk replacement (Fractional Anisotropy (FA) of grey and white matter) (Love et al., 2021). Moreover, the method of breeding has an impact on the bond that the lamb creates with its congeners (Gaudin et al., 2018). This impact is different depending on the attachment partner (mother, sibling, other lambs in the flock) (Gaudin et al., 2018). To counteract the deleterious effect of artificial breastfeeding, various techniques have been tested, such as the use of nurses (Brunet et al., 2016) or the addition of objects in the pen to enrich the environment (Gaudin et al., 2018). Moreover, the addition of objects is little efficient because the attachment of the lamb for this object is weak (Gaudin et al., 2018). One potential environmental enrichment that has not been investigated is music, despite its positive impact on animals reported in scientific literature or by its use in breeding or zooparc (Ubiema et al., 2021). In captive chimpanzees, music reduced agitated and aggressive behaviors and

increased social behavior (Howell et al., 2003). In a group of Western Lowland Gorillas, music with a low tempo reduced their anxiety behavior (Brooker, 2016). Chicks exposed to music in the embryonic stage have improved their spatial orientation, learning and memory (Sanyal et al., 2013). However, the potential benefits of music for farm animals have been little studied. In piglets, exposure to music after weaning facilitated their playing behavior (de Jonge et al., 2008). The behavioral response of piglets to musical stimulation differs depending on the tempo or the musical instruments (X. Li et al., 2019). Diffusing Mozart songs also induced a low basal cortisol level (Li et al., 2021). Moreover, in practice, radio has been used in zoos to reduce stress and reactivity of animals (Ubiema et al., 2021). In this context, we question the positive impact of music to counteract the absence of the mother in lambs raised by mother-deprivation with milk replacement.

We hypothesized that the diffusion of classical music could help to counteract the deleterious effects of mother-deprivation with milk replacement and the underlying neurobiological modification. The diffusion of classical music could improve the well-being of the lambs, modify their emotional reactivity and brain morphology.

To test our hypothesis, we compared two groups of lambs. The first was raised by mother-deprivation with milk replacement and the second by mother-deprivation with milk replacement with the diffusion of classical music as an enrichment. To evaluate the influence of classical music on lamb growing, body weight and sanitary state were recorded weekly from birth to 2.5 months of age. Behavioural activity, emotional reactivity and social motivation were examined in the aim to evaluate the influence of music diffusion on lambs' well-being. In addition to behavioral observations, we measured plasma levels of cortisol and oxytocin throughout the breeding and during emotional reactivity assessment. Finally, we examined the impact of music diffusion on brain morphology using magnetic resonance imaging (MRI).

Material & Methods

Ethics

All procedures were performed in accordance with the European directive 2010/63/EU for animal protection and welfare used for scientific purposes and approved by the local ethical committee for animal experimentation (CEEA VdL, Tours, France, authorization N°23520-2020010714121242v3). At the end of the experiment all remaining animals returned to the UEPAO.

Animals and housing

Experiments were conducted on 28 Ile de France lambs (14 males and 14 females) born between 08/30/2021 and 09/02/2021 at the "Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière" (UEPAO, INRAE Val de Loire, France; <https://doi.org/10.15454/1.5573896321728955E12>). Lambs were separated from their mother 48 hours after birth allowing colostrum ingestion and divided into two groups based on gender (7 females and 7 males / group), body weight at birth ($3.65 \text{ kg} \pm 0.42$ for the No music group and $3.67 \text{ kg} \pm 0.44$ for the Music group) and sibling. Each group was housed in identical enclosures (10 m x 2 m) made of 1.80 m-high plywood to avoid visual or direct contact with caregivers outside the care periods. Both were equipped with 2 water-drinkers, 2 hay racks, 2 troughs containing granules and 6 rubber teats connected to an automatic feeder (EuroLouve or Forster) providing *ad libitum* access to milk replacement (Lactiprestige Ovicabr' securit: 23% proteins, 25% fat, 6.5% ash, 3.5% water, 0.15% cellulose, 0.8 % calcium, 0.6% phosphore, 0.7% sodium) at constant temperature (43°C) and constant concentration (200 g/L). For the first five days of the experiment, lambs were trained to drink formula-milk with rubber teats 4 times per day by different caregivers until they could feed on their own. To prevent hypothermia two red heating lamps were placed in each enclosure for the first 14 days of the experiment. To avoid noise pollution between the groups the enclosures were located in two distant rooms. The walls of both enclosures were covered with honeycomb boxes (29.5 cm x 29.5 cm) to improve sound diffusion and the ground was covered with straw. Traffic cones were placed in enclosures to allow playing enrichment. The light was on between 8:30 a.m and 05:30 p.m.

Music streaming

Four speakers (YAMAHA NS-AW194) were suspended above the Music enclosure where music was played using a dual audio amplifier Micro AMP 2 mkII and a scheduler MY MUSIC PLAYER LE de iDAL (Interactive Digital Audio Line). In the control enclosure, 4 dummy cardboard speakers were suspended to simulate speakers and ensure identical environments for the two groups. The music played corresponds to classical music podcasts from the Radio Classique station (<https://www.radioclassique.fr>). Classical music was therefore varied (with or without singers, with different rhythms). Music was played everyday throughout the whole experiment, 5 times a day in periods of 45 minutes (between 10:30 a.m and 11:15 a.m, 12:00 p.m and 12:45 p.m, 01:30 p.m and 02:15 p.m, 03:00 p.m and 03:45 p.m, 04:30 p.m and 05:15 p.m) at a maximum volume of 75 dB under the speakers. At the most distant corners, the volume was around 60 dB. The mean level of ambient

noise was around 30-35 dB in both enclosures and the mean level of automatic feeder was around 75 dB.

Blood sample, weight and sanitary status

During the breeding period, once a week, weight, sanitary state and blood samples were carried out for each lamb. Sanitary conditions were noted according to the cleanliness of the posterior, the presence or absence of diarrhea, runny nose and eye, cough and injuries. Blood samples were immediately put in ice until being centrifuged for 30 min at 4°C and 3800 RPM. Plasmas were collected and stored at -20°C until assayed of cortisol and oxytocin. Moreover, blood samples were performed to assay plasma cortisol and oxytocin and, then, measure the hormonal basal levels during breeding and evaluate emotional reactivity.

Behavioral measurements

Cameras (Vivotek FE8174V) were installed on the ceiling to record lambs behavior every day between 8:30 a.m and 05:30 p.m. Human interventions were carried out in the morning before 10 a.m, the behavior was analyzed on periods without human intervention. Behaviors were analyzed using Boris software (Friard & Gamba, 2016). 5 periods of 5 minutes were sampled for analysis: two periods in the morning (1 period with music (10:50-10:55) and the other without music (11:35-11:40), one at noon (13:50-13:55) and two in the afternoon (1 period without music (16:05-16:10) and the other with music(16:50-16:55)). For each 5 min period, every 10 seconds (i.e. 31 observations), the posture, the location in the enclosure and the behavior were analyzed for each lamb according to the ethogram described in table 1. Observations were made by two observers who were trained in the same way. They each made half of the observations for each group.

Activity	Description
Food - milk	The lamb is drinking milk, teat in mouth
Food - solid	The lamb is eating granules or hay
Exploration	The lamb is walking with its head down or smelling the straw or scratching or touching and standing on an object

Locomotion	The lamb is walking with its head up or running or jumping or riding or stepping back
Grooming	The lamb is nibbling or scratching or shaking itself or rubbing against an object
Immobile	The lamb is not eating, exploring, moving or grooming
Location	The lamb has both front legs in a define zone

Table 1: Description of each activity measured with Boris during breeding.

Hormones assay

Hormones assay were realized by enzyme immunoassay (EIA) at the “Laboratoire de phénotypage-endocrinologie” (UMR PRC, INRAE Val de Loire, France).

Cortisol

Cortisol was measured on 25µL aliquots of undiluted plasma and all samples were analysed in the same assay. The limit of detection of the assay was 4ng/ml. The intra-assay coefficient of variation for quality control plasma containing 30ng/ml was 5.2%.

Oxytocin

The concentration of oxytocin in plasma was determined by EIA after molecular extraction using Sep-Pack C18 cartridges (Waters). For the quality control containing 40pg/ml oxytocin, the intra-assay coefficient of variation was 18.4%.

MRI

MRI of the brain was performed with a 3 Teslas Siemens Magnetom Verio® scanner (Erlangen, Germany) located at the PIXANIM platform, INRAE Nouzilly, France.

At 6 weeks of age, MRI was acquired for each lamb of the two groups. The experiment took place over 7 days. Each day, 4 lambs (2 Music and 2 No Music with 1 male and 1 female / group) were selected to be tested individually. Before and after the anesthesia, the 4 lambs were grouped together in a room so that they were never alone and thus avoided the stress of social isolation.

Anesthesia

Before each acquisition, lambs were placed under general anesthesia to prevent stress and avoid motion artifacts. Anesthesia was induced by an intra-venous co-injection of rompun® and ketamine®. After this injection and the loss of muscular tonus, a tracheal tube was inserted to maintain the anesthesia with Isoflurane®. The drug doses and tracheal tube sizes were adapted to each animal based on age and body weight. The duration of anesthesia was limited to 2.5 hours, during which cardiac rhythm and SpO2 levels were continuously monitored. At the end of the acquisition, Isoflurane® was stopped and the tracheal tube removed after the first signs of autonomous breathing.

3 lambs died during the anesthesia period (two in the No Music group and one in the Music group).

MRI acquisition

During acquisition lambs laid on their stomachs (prone position) with a 4-channel Siemens FLEX coil wrapped around their head and, for their comfort and safety, were covered with a cloth and noise-reducing headphones (BOLDfonic, Cambridge Research Systems). T₁-weighted (T₁w) images were acquired with the 3D-MPRAGE (Magnetisation Prepared Rapid Acquisition with Gradient Echo) sequence with the following parameters: Repetition Time, TR=2500ms; Echo Time, TE=3.18ms; Bandwidth, BW=150Hz/pixel; Inversion Time, TI=900ms; Flip Angle=12°; Slice Thickness=0.5mm; Field of View, FOV=192x192mm; matrix=384x384; in plane resolution 0.5x0.5mm; Number of Excitations, NEX=2; Integrated Parallel Acquisition, iPAT=2; acquisition time, TA=18m37s.

Study-specific Template Creation

The T₁w images acquired for each lamb were used to create a study-specific template using the `antsMultivariateTemplateConstruction2.sh` function of the ANTS toolkit (Avants et al. 2008; Avants et al. 2011; Avants and Gee 2004). Briefly, template construction involved:

- 1) Creating an initial target template by averaging the T₁w images;
- 2) Pairwise normalization of each T₁w image to the target template;
- 3) Create new target template by averaging the normalized images output during step 2;
- 4) Transform the new target template by the average inverse affine transform and the average inverse warp field multiplied by a scaling factor (0.2);

5) Iterate steps 2 to 4 four times.

Regions of Interest

Regions of interest (ROI) were segmented manually on the study-specific template: whole-brain; brain subdivisions: telencephalon, diencephalon, mesencephalon, pons, medulla oblongata, spinal cord, cerebellum and brain regions: caudate nucleus, periaqueductal gray, amygdala, olfactory bulb, hippocampus, medial geniculate nucleus, inferior colliculi and cochlear nucleus. The transforms calculated to create the template from each individual were then used to transform each of these ROIs to the individual's brain space. For each lamb, the total brain volume (mm^3) and the volume of each segmented region were calculated (number of voxels in the region multiplied by the volume of a voxel, $(0.5 \text{ mm})^3$). To remove the potential confound of intersubject variability of total brain volume, the region analysis was conducted on relative region volumes. The relative volume of each region, expressed as a proportion, was calculated by dividing its volume by the individual's total brain volume and multiplying by 100.

Reactivity and motivation tests

We maintained exactly 7 days between MRI acquisition and the reactivity and motivation tests to allow lambs to recover from anaesthesia and to avoid bias due to possible interaction between anaesthesia and behavioural tests.

Reactivity test

Each day, 4 lambs (2 males and 2 females) were selected (2 of each group) to be tested. Each lamb was tested individually. A blood sample was taken before leaving their breeding enclosure to measure the basal levels of cortisol and oxytocin. The testing arena consisted of a 2 x 4 m rectangle delimited by wooden panels 2 m high and cut into 8 equal zones (1 m^2). The test was divided into three 10-minute phases and was carried out in the morning:

- A phase of social isolation during which the lamb was alone in the testing area in silence. This environment was unknown to the lamb (SI).
- A phase of social isolation with music during which the lamb was alone in the testing area with classical music played by two speakers behind the wall of zones 7 and 8 (SI+M).

- A phase of social isolation with a known passive person known to the lamb sitting against the wall between zones 7 and 8 in silence (SI+H).

Between the SI+M and SI+M phases, a blood sample was taken to measure the levels of cortisol and oxytocin.

For each phase, the behavior and the location in the testing area were analyzed continuously for each lamb according to the ethogram described in table 2. During the experiment, the number of bleats and excrement were counted; all other parameters were analyzed in the video recordings.

Activity	Description
Location	The lamb has both front legs in the zone 1 - 8
Escape	The lamb jumps against the wall or puts its front legs on the wall
Sniffing	The lamb scents with physical contact the wall or the ground for a minimum of two secondes
Locomotion	The lamb walks and puts both front legs in another zone
Bleating	Number of bleats
Lying	The lamb is lying on the floor for a minimum of 2 secondes
Immobile	The lamb is not moving for a minimum of 2 secondes
Excrements	Number of urines and feces

Table 2: Description of each activity measured with Boris during reactivity test.

Motivation test

This test took place in the afternoon of the reactivity test and the lambs were tested in the same order as for the reactivity test. The testing arena was the same as for the reactivity test. However, in zones 1 and 2, the wall was open and there were 4 unknown lambs of the same age on the other side. The wall was open but barred, which meant that the lambs could touch but not join the lambs on the other side of the open barrier. The test was divided into four 2-minute phases:

- A phase during which the lamb was alone in the testing area (apart from the congeners) in silence (Known Environment, KE).

- A phase during which the lamb was alone in the testing area (apart from the congeners) with classical music played by two speakers behind the wall of zones 7 and 8 (Music, M).
- A phase during which the music was off and a construction cone was placed against the wall along the wall between zones 7 and 8. This cone was similar to the one present in the lamb pen during breeding (Known Object, KO).
- A phase in which a known passive person sat against the wall between zones 7 and 8 with no music (Human, H).

For each phase, the behavior and the location in the testing area were analyzed continuously for each lamb according to the ethogram described in table 3. During the experiment, the number of bleats and excrements were counted; all other parameters were analyzed in the video recordings.

Activity	Description
Location	The lamb has both front legs in the zone 1 - 8
Escape	The lamb jumps against the wall or puts its front legs on the wall
Sniffing	The lamb scents with physical contact the wall or the ground for a minimum of two secondes
Locomotion	The lamb walks and puts both front legs in another zone
Immobile	The lamb is not moving for a minimum of 2 secondes
Lying	The lamb is lying on the floor for a minimum of 2 secondes
Contact with the congeners	The lamb is in physical contact with the wall where the congeners are located (any part of the body)
Bleating	Number of bleats
Excrements	Number of urines and feces

Table 3: Description of each activity measured with Boris during motivation test.

Statistics

All statistical tests were conducted using R software (R Core Team, 2020). Data are presented as mean +/- std error and individual values.

Weight

For the weight, mixed-effect ANOVA with 3 factors were conducted: Day of observation as a within factor and Group (Music vs No Music) and Gender (Male vs Female) as between factors. If the Gender was not significant, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Day of observation as a within factor and Group as a between factor.

Health status

Statistics were conducted only for cleanliness of the posterior and the presence or not of diarrhea. Cleanliness of the posterior was tested using Wilcoxon test and the diarrhea was tested using Fisher test.

Cortisol and Oxytocin assay

For the cortisol and oxytocin level, mixed-effect ANOVA with 3 factors were conducted: Day of collect as a within factor and Group (Music vs No Music) and Gender (Male vs Female) as between factors. ANOVA assumptions were checked using Shapiro-Wilk normality test (function `shapiro_test` from the `rstatix` package) and Levene's test for homogeneity of variance (function `levene_test` from the `rstatix` package).

MRI analysis

For the brain volume, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Group (Music vs No Music) and Gender (Male vs Female) as between factors. If the Gender was not significant, t-test were conducted between the two groups.

For the relative volume of brain subdivisions and brain regions, mixed-effect ANOVA with 3 factors were conducted: Hemisphere (Left vs Right) as a within factor and Group (Music vs No Music) and Gender (Male vs Female) as between factors. If the Gender was not significant, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Hemisphere as a within factor and Group as a between factor.

Behavioral measurements

The behaviors “Stand and Explore”, “Lay down and Rest”, “Food”, “Food - Milk” and “Food - Solid” were tested using mixed-effect ANOVA with 3 factors: Day of observation as a within factor and Group (Music *vs* No Music) and Gender (Male *vs* Female) as between factors. If the Gender was not significant, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Day of observation as a within factor and Group as a between factor.

Reactivity test

The locomotion, number of bleats, number of escape attempts, time spent immobile, sniffing time and lying time were tested using mixed-effect ANOVA with 3 factors: Phase (SI *vs* SI-M *vs* SI-H) as a within factor and Group (Music *vs* No Music) and Gender (Male *vs* Female) as between factors. If the Gender was not significant, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Phase as a within factor and Group as a between factor. The number of excrement was tested with a Wilcoxon test.

Motivation test

The locomotion, number of bleats, number of escape attempts, time spent motionless, sniffing time, contact time with congeners and lying time were tested using mixed-effect ANOVA with 3 factors: Phase (SI *vs* SI-M *vs* SI-H) as a within factor and Group (Music *vs* No Music) and Gender (Male *vs* Female) as between factors. If the Gender was not significant, mixed-effect ANOVA with 2 factors were conducted: Phase as a within factor and Group as a between factor. The number of excrement was tested with a Wilcoxon test.

Results

Breeding

Weight (Figure 1)

The weight was unaffected by the gender of the lambs ($F = 1.9669$, $p > 0.05$). There was a significant interaction between the Group and the Day of weight ($F = 15.541$, $p < 0.001$). The weight of Music

lambs was significantly less than the weight of No Music lambs in the last weeks of the experiment (day of observation: 30/09, 07/10 and 14/10).

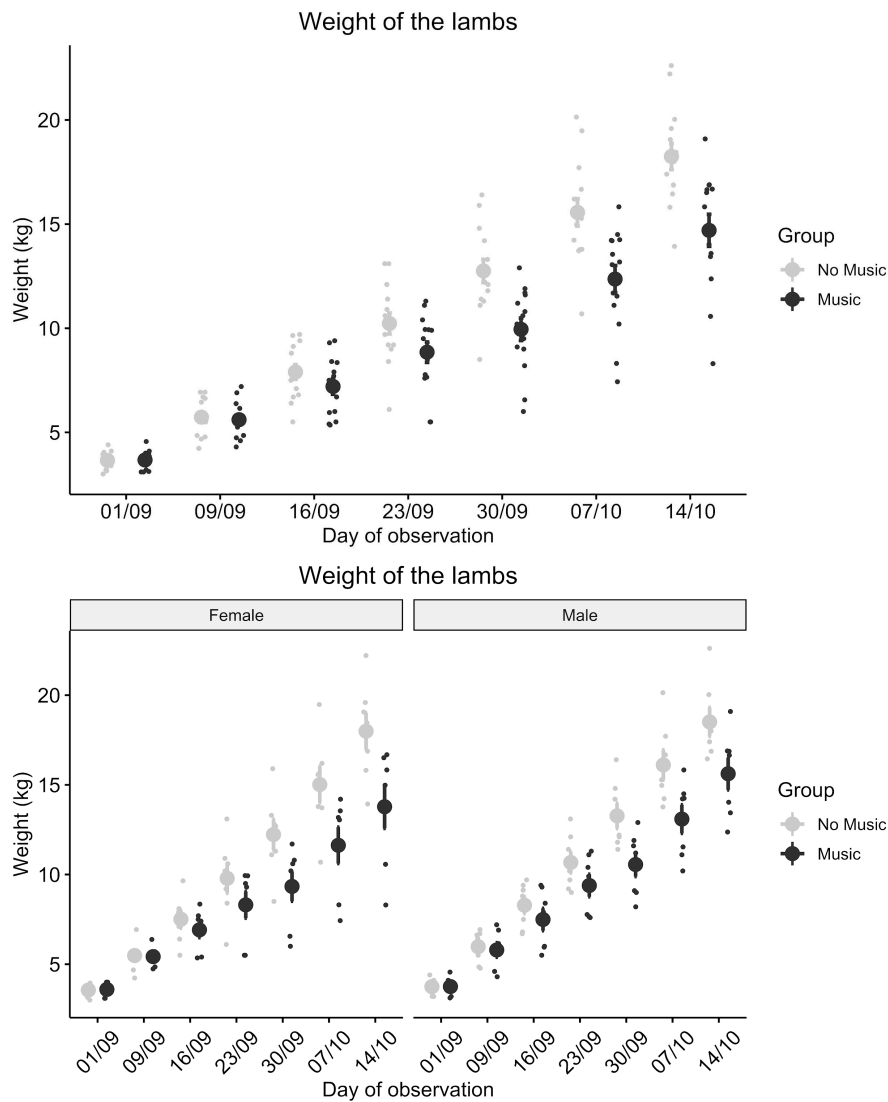


Figure 1: Individual and mean (\pm standard error) body weights (kg) measured throughout the breeding (top) and separated for gender (bottom).

Sanitary status

There was no significant difference between the two groups for the cleanliness of the posterior or diarrhea. Cases of cough were very rarely observed whatever the group.

Cortisol assay (Figure 2)

The cortisol level was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.043$, $p > 0.05$). There was a significant interaction between the Group and the Day of collect ($F = 2.205$, $p < 0.05$). The cortisol

levels were significantly higher for the Music lambs than the No Music lambs only on 23/09 and 14/10.

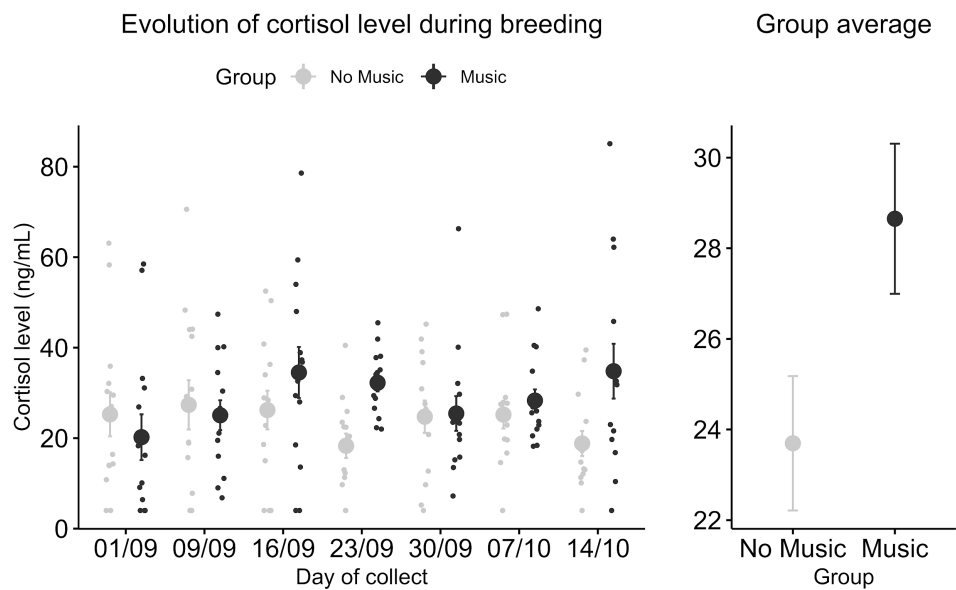


Figure 2: Mean (\pm standard error) and individual plasma cortisol level measured throughout the breeding (left) and the overall mean per group (right).

Oxytocin assay (Figure 3)

The oxytocin level was unaffected by the gender of the lambs ($F = 2.353$, $p > 0.05$). There was a significant interaction between the Group and the Day of blood sample ($F = 3.231$, $p < 0.05$). The levels of oxytocin were significantly lower for the Music lambs than the No Music lambs only at days 09/09, 16/09, 23/09 and 14/10.

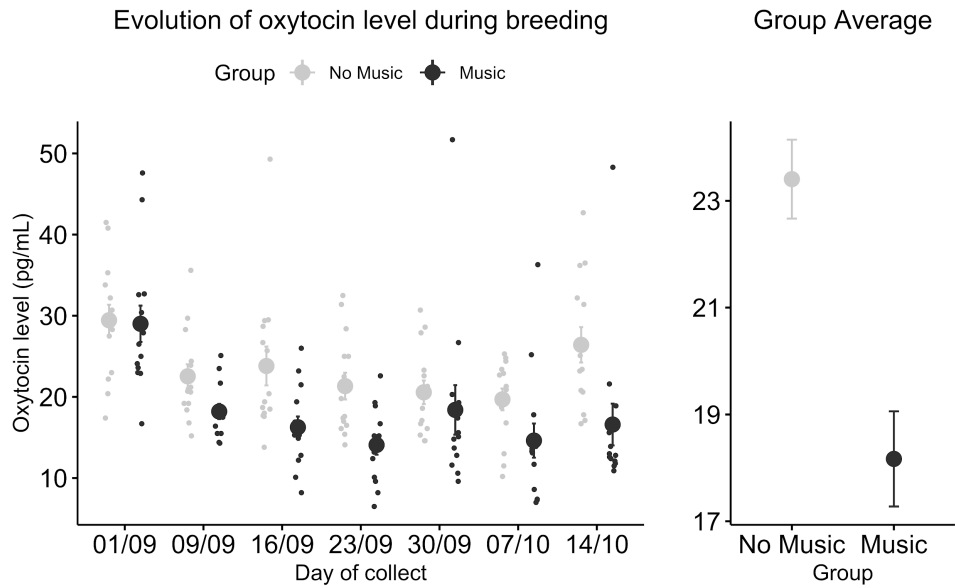


Figure 3: Mean (\pm standard error) and individual plasma oxytocin level measured throughout the breeding (left) and the overall mean per group (right).

Behavioral measurements

Impact of music diffusion evaluated by comparing No Music and Music group according to the global activity throughout the breeding

The behavior “Stand and Explore” was unaffected by the gender of the lambs ($F = 2.044$, $p > 0.05$) (Figure 4). There was a significant interaction between the Group and the Day of observation: over the entire breeding period, the No Music lambs were more often seen standing up exploring than the Music lambs ($F = 9.547$, $p = 0.005$). However, the differences were not always in the same order according to the Day of observation ($F = 7.240$, $p < 0.001$).

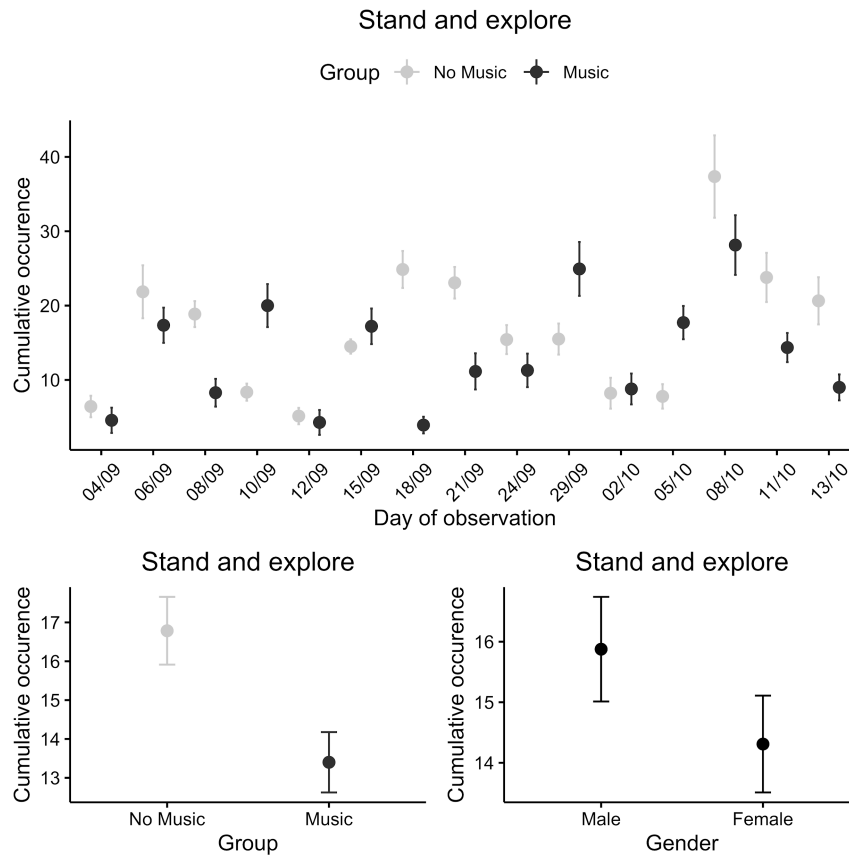


Figure 4: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Stand and explore” measured throughout the breeding (top) and the overall mean per group (bottom left) and gender (bottom right).

The behavior “Lay down and Rest” was unaffected by the gender of the lambs ($F = 3.858, p > 0.05$) (Figure 5). The number of times the lambs were seen lying down and resting decreased over time until they reached a plateau ($F = 16.438, p < 0.001$). Over the entire breeding period, the No Music lambs were less often seen lying down resting than Music lambs. However, the differences were not always in the same order according to the Day of observation ($F = 4.150, p < 0.001$).

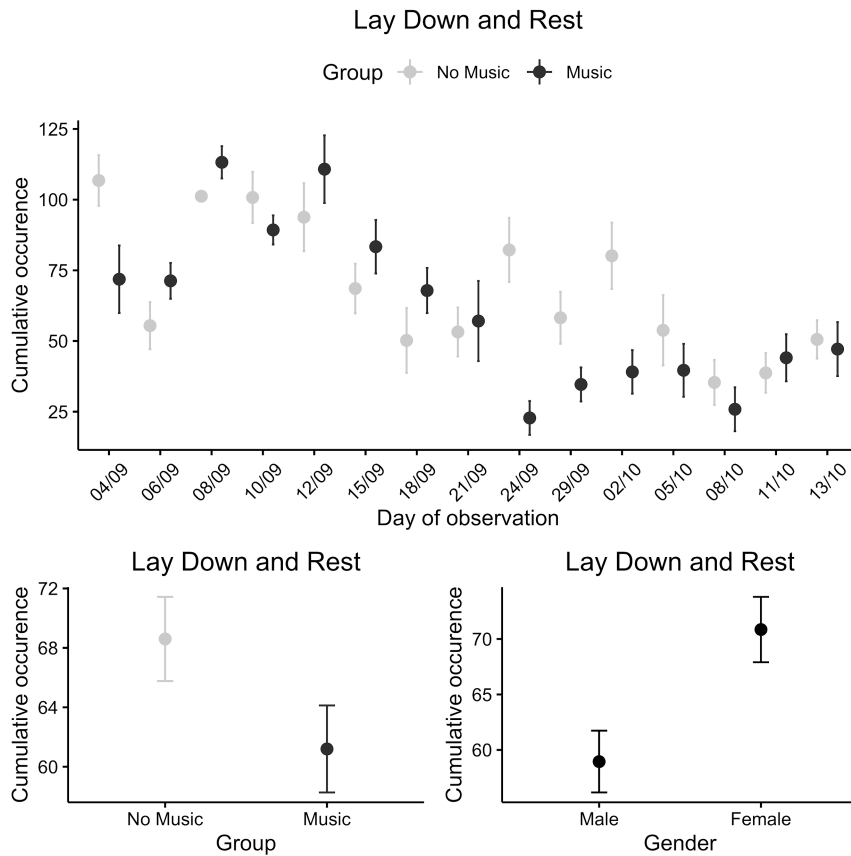


Figure 5: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Lay down and Rest” measured throughout the breeding (top) and the overall mean per group (bottom left) and per gender.

The total food intake was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.026$, $p > 0.05$). Over the entire experiment, the Music lambs were seen eating more often than the No Music lambs (9.301 , $p = 0.005$). This group effect varied throughout the experiment, the differences were not always in the same order according to the Day of observation ($F = 5.426$, $p < 0.001$) (Figure 6).

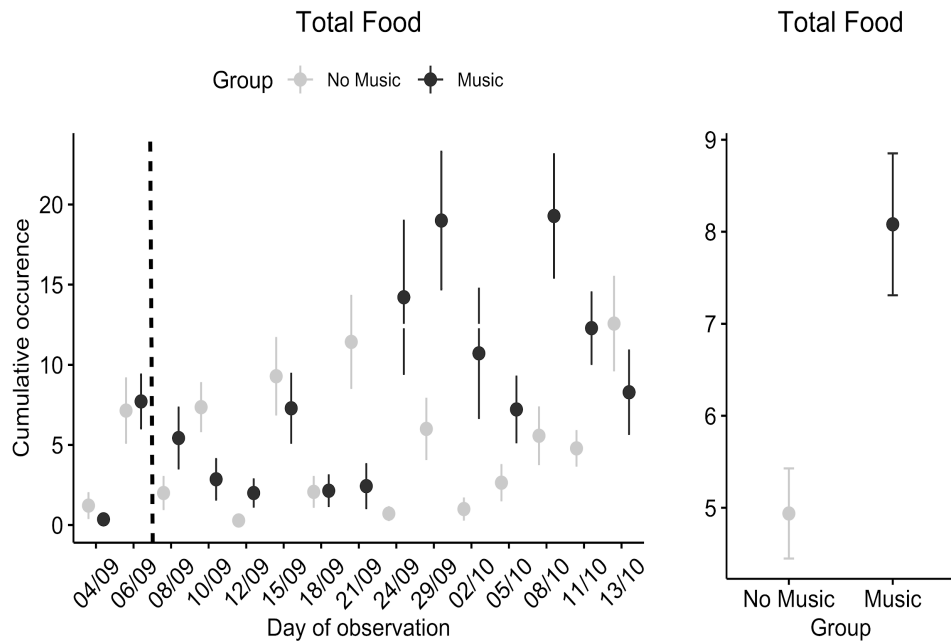


Figure 6: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Total Food” measured throughout the breeding (left) and the overall mean for each group (right). The “Total Food” represents the mean total number of times that the lambs were observed to be either drinking milk or eating solid food. The dashed line represents the day the barriers were opened giving access to the entire enclosure.

The milk consumption was unaffected by the gender of the lambs ($F = 1.780, p > 0.05$). Over the entire experiment, the lambs of the Music group were seen drinking milk more often than once of the No Music group ($F = 13.171, p = 0.001$). This milk consumption decreased over time ($F = 6.999, p < 0.001$) (Figure 7).

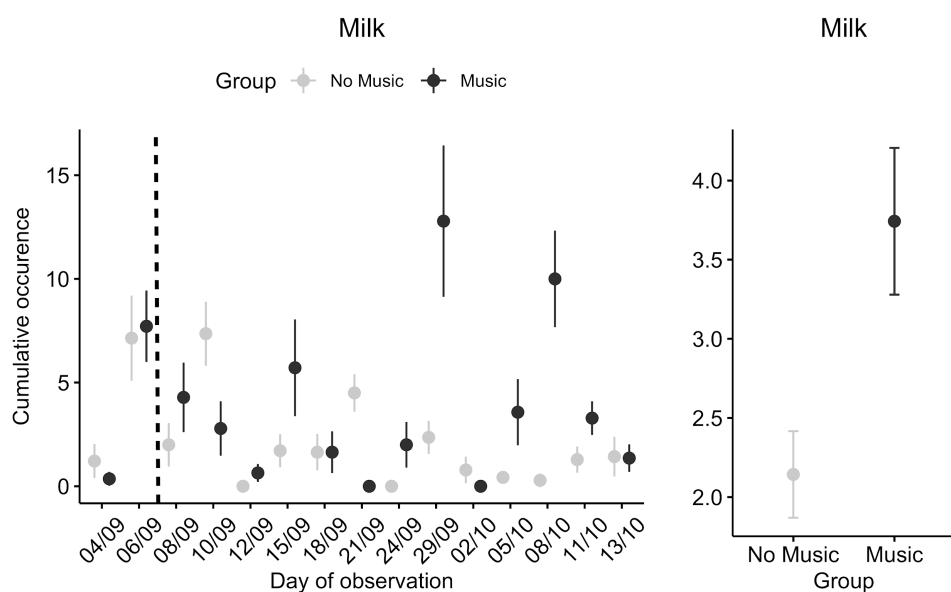


Figure 7: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Milk” measured throughout the breeding (left) and the overall mean for each group (right). The dashed line represents the day the barriers were opened giving access to the entire enclosure.

There was an interaction between the gender and the group for the consumption of solid food ($F = 4.664$, $p = 0.041$): the females of the Music group were seen more often eating solid food than the females of the No Music group, whereas no difference was found between No Music and Music males. The consumption of solid food tended to increase over time ($F = 4.624$, $p < 0.001$) (Figure 8).

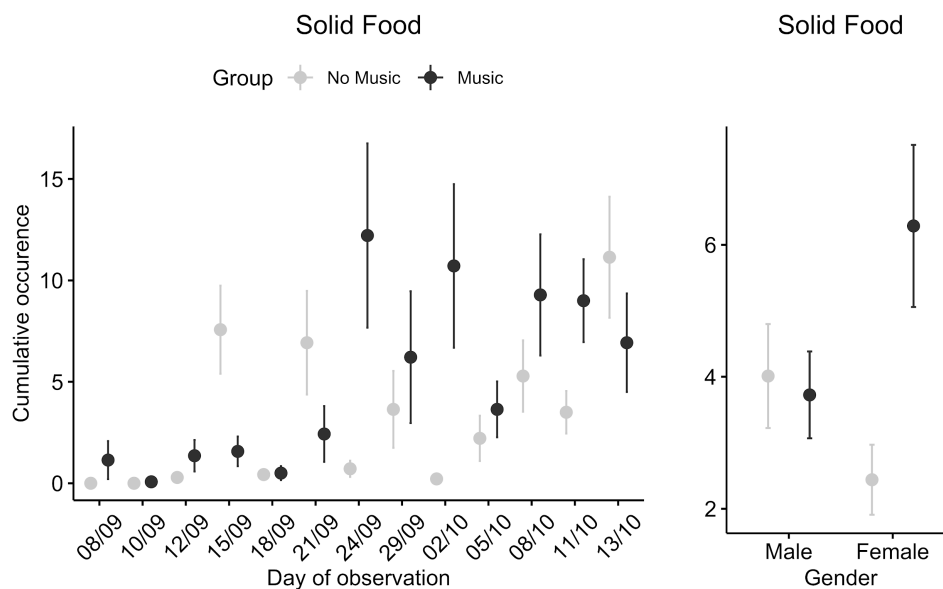


Figure 8: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Solid Food” measured throughout the breeding (left) and the overall mean for each group and gender (right).

Impact of music diffusion evaluated by comparing periods with and without music in the Music group

The behavior “Stand and Explore” was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.213$, $p = 0.652$). The Music lambs were more often seen standing up exploring during periods without music than periods with music ($F = 22.737$, $p < 0.001$) (Figure 9).

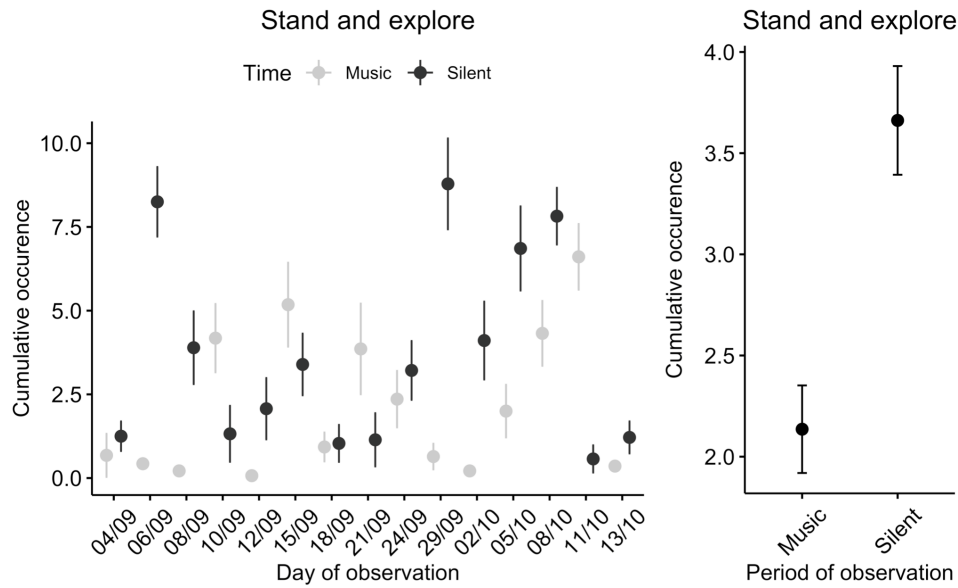


Figure 9: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Stand and explore” measured throughout the breeding period with or without music (left) and the overall mean for each period (right).

The behavior “Lay down and Rest” was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.713$, $p = 0.415$). The Music lambs were more often seen lying down and resting during periods with music than periods without music ($F = 11.352$, $p = 0.005$). Moreover, the time spent lying down and resting decreased over time until they reached a plateau ($F = 11.810$, $p < 0.001$) (Figure 10).

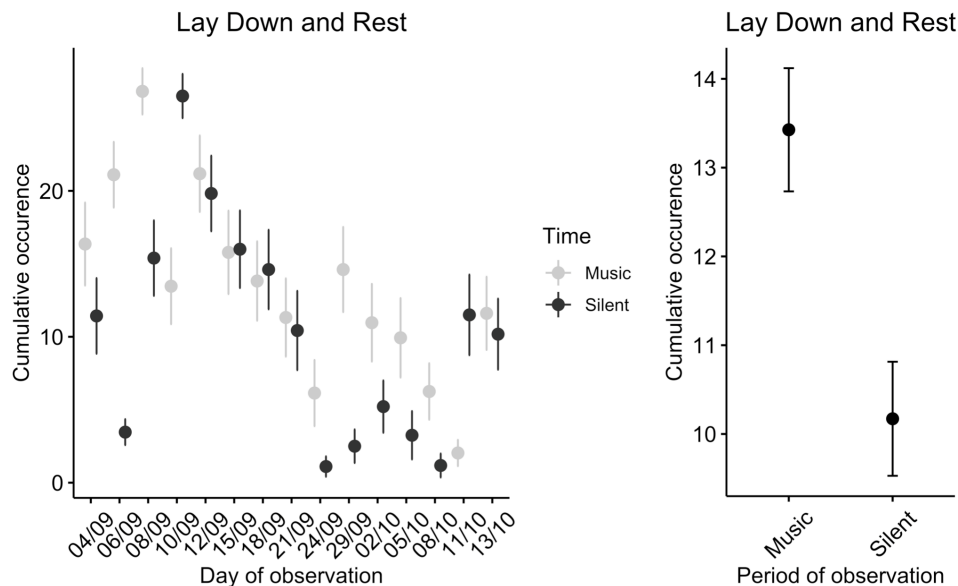


Figure 10: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Lay Down and Rest” measured throughout the breeding period with or without music (left) and the overall mean for each period (right).

The total food intake was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.668$, $p = 0.430$). The Music lambs were more often seen eating during periods without music than periods with music ($F = 15.415$, $p = 0.002$).

The milk consumption was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.410$, $p = 0.534$). The Music lambs were more often seen drinking milk during periods without music than periods with music ($F = 34.248$, $p < 0.001$) (Figure 11).

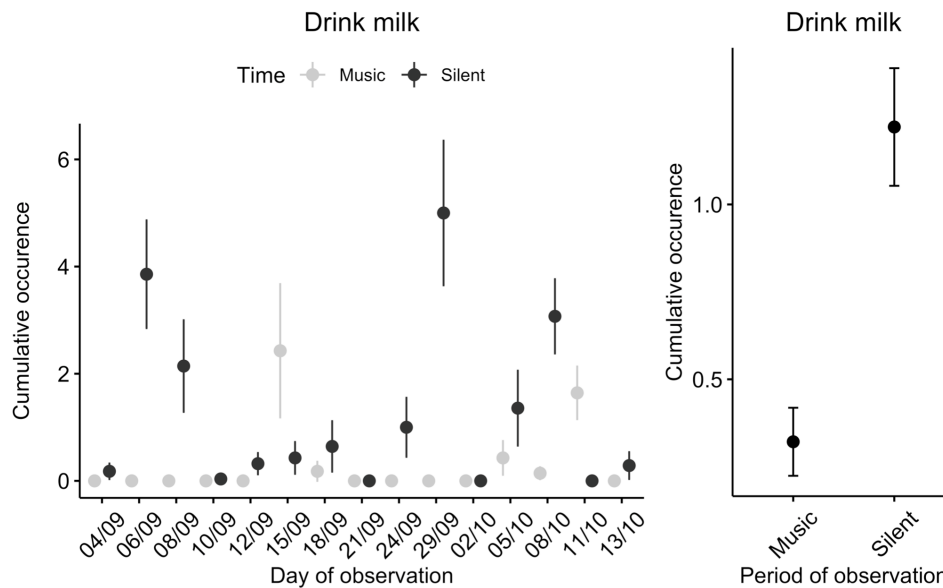


Figure 11: Mean (\pm standard error) cumulative occurrence of “Drink milk” measured throughout the breeding period with or without music (left) and the overall mean for each period (right).

The consumption of solid food was unaffected by the gender of the lambs ($F = 2.095$, $p = 0.173$) and no difference between periods with or without music were found ($F = 0.01$, $p = 0.972$).

MRI analysis:

Brain volume

The brain volume was unaffected by the gender of the lamb ($F = 0.764$, $p > 0.391$). The t-test did not show a significant difference between the two groups ($t = 1.975$, $p = 0.065$). However, subjective observation of the data indicates that the brain volume of the Music group ($84,51 \pm 8,024 \text{ cm}^3$) was smaller than the brain volume of the No Music group ($89,661 \pm 5,089 \text{ cm}^3$).

Relative volumes of brain subdivisions (Figure 12)

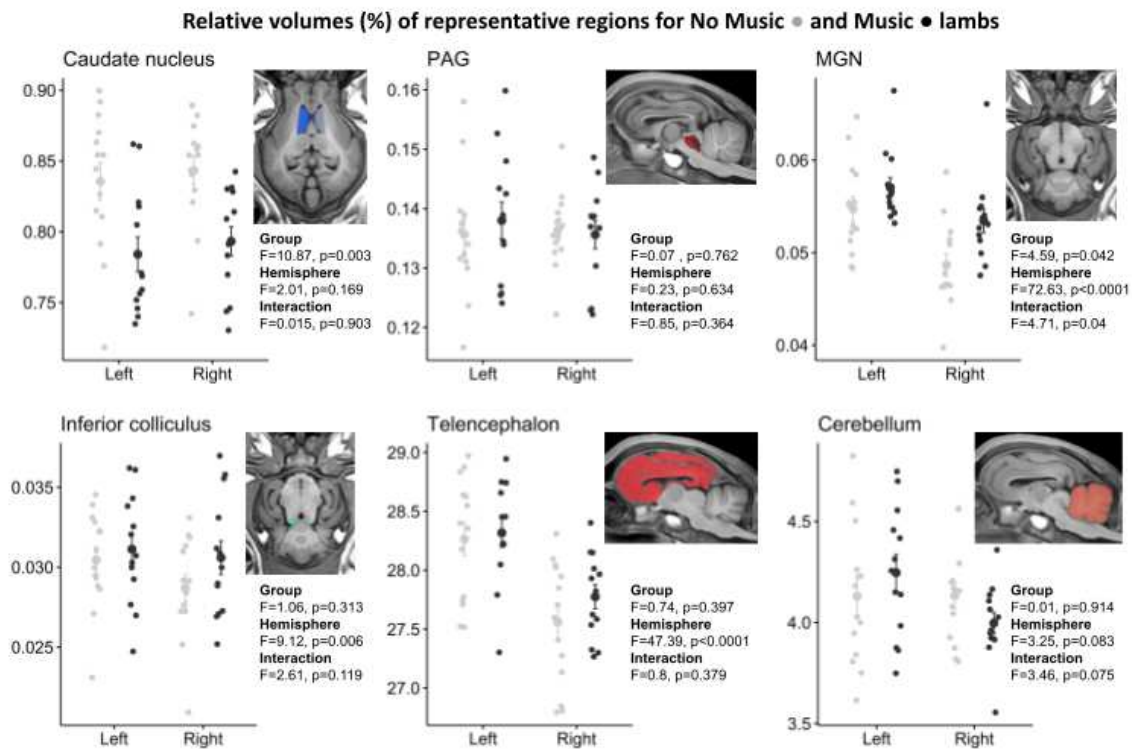


Figure 12: Mean (\pm standard error) and individual relative volumes (% of total brain volume) in the left and right hemispheres for both the No Music and Music lambs. Each region is displayed as a colored overlay on the T₁w study-specific template.

The relative volume of the telencephalon was the only subdivision affected by the gender of the lambs: its relative volume was larger for the females than the males ($F = 8.217$, $p = 0.009$). The relative volumes of the telencephalon, the pons and the medulla oblongata were significantly bigger in the left than in the right hemisphere. There was no significant difference between groups or hemispheres for the diencephalon, the mesencephalon and the cerebellum.

Relative volumes of brain regions (Table 4)

Brain Region	No Music lambs		Music lambs		Statistical values		
	Left-H	Right-H	Left-H	Right-H	Group	Hemisphere	Interaction
Caudate nucleus	<u>0.836 ± 0.05</u>	<u>0.843 ± 0.038</u>	0.784 ± 0.044	0.793 ± 0.037	F=10.871 p=0.003	F=2.006 p=0.169	F=0.015 p=0.903
Periaqueductal gray	0.135 ± 0.01	0.136 ± 0.006	0.138 ± 0.111	0.135 ± 0.009	F=0.071 p=0.762	F=0.232 p=0.634	F=0.855 p=0.364
Amygdala	0.499 ± 0.03	0.498 ± 0.032	0.499 ± 0.017	0.508 ± 0.026	F=0.271 p=0.607	F=2.415 p=0.133	F=2.748 p=0.11
Olfactory bulb	0.397 ± 0.035	0.382 ± 0.031	0.402 ± 0.055	0.376 ± 0.05	F=0.000 3 p=0.987	F=16.517 p=0.0004	F=1.234 p=0.277
Hippocampus	0.519 ± 0.045	0.518 ± 0.044	0.516 ± 0.04	0.516 ± 0.031	F=0.028 p=0.868	F=0.037 p=0.850	F=0.007 p=0.934
Medial geniculate nucleus	0.055 ± 0.005	0.049 ± 0.005	<u>0.057 ± 0.004</u>	<u>0.053 ± 0.005</u>	F=4.597 p=0.042	F=72.632 p<0.0001	F=4.713 p=0.04
Inferior colliculus	0.03 ± 0.003	0.029 ± 0.003	0.031 ± 0.003	0.031 ± 0.004	F=1.06 p=0.313	F=9.122 p=0.006	F=2.609 p=0.119
Cochlear nucleus	0.028 ± 0.002	0.278 ± 0.002	0.028 ± 0.002	0.029 ± 0.002	F=0.544 p=0.468	F=0.388 p=0.539	F=0.838 p=0.369
Telencephalon	28.264 ± 0.519	27.56 ± 0.519	28.318 ± 0.44	27.775 ± 0.365	F=0.743 p=0.397	F=47.39 p<0.0001	F=0.8 p=0.379
Diencephalon	2.394 ± 0.099	2.371 ± 0.099	2.389 ± 0.102	2.387 ± 0.088	F=0.025 p=0.876	F=1.910 p=0.179	F=1.459 p=0.238
Mesencephalon	1.417 ± 0.072	1.416 ± 0.071	1.44 ± 0.091	1.437 ± 0.085	F=0.566 p=0.459	F=0.035 p=0.853	F=0.016 p=0.9
Pons	0.351 ± 0.029	0.334 ± 0.023	0.361 ± 0.027	0.336 ± 0.017	F=0.768 p=0.389	F=14.877 p=0.0007	F=0.608 p=0.443
Medulla Oblongata	1.077 ± 0.074	1.045 ± 0.069	1.113 ± 0.074	1.052 ± 0.052	F=1.241 p=0.276	F=7.302 p=0.012	F=0.66 p=0.424
Cerebellum	4.129 ± 0.343	4.133 ± 0.237	4.245 ± 0.323	3.997 ± 0.189	F=0.012 p=0.914	F=3.251 p=0.083	F=3.458 p=0.075

Table 4: Relative region volumes (% of total brain volume) and statistical values. Mean relative volumes ± standard errors are displayed for each hemisphere and group. Underlined values highlight the group with the larger volume; bold font highlights the hemisphere with the larger volume.

The relative volume of the studied regions were not affected by the gender of the lambs. The relative volume of the caudate nucleus was significantly smaller in the Music lambs than in the No Music lambs ($F = 10.871$, $p = 0.003$). There was an interaction between the groups and hemispheres for the medial geniculate nucleus ($F = 4.713$, $p = 0.04$): its relative volume was larger for the Music group than the No Music group only in the right hemisphere. The relative volume of the olfactory bulb and the inferior colliculi was larger in the left than in the right hemisphere. There was no significant difference (Group or Hemisphere) for the periaqueductal gray, amygdala, hippocampus and cochlear nucleus.

Reactivity test

Hormonal responses (Figure 13)

Cortisol assay

The cortisol level was unaffected by the gender of the lambs for the reactivity test ($F = 0.069$, $p > 0.05$). There was no significant difference between the groups for the cortisol level ($F = 0.518$, $p > 0.05$). However, the cortisol level was significantly higher after the social isolation phase with music than the cortisol level in the breeding enclosure ($F = 93.185$, $p < 0.001$).

Oxytocin assay

The oxytocin level was unaffected by the gender of the lambs for the reactivity test ($F = 1.565$, $p > 0.05$). The oxytocin levels were significantly lower for the lambs exposed to classical music than the control lambs before the test and after the phase where classical music was played ($F = 11.162$, $p < 0.01$). This difference was already observed during breeding. There was no significant difference between the two phases ($F = 1.713$, $p > 0.05$).

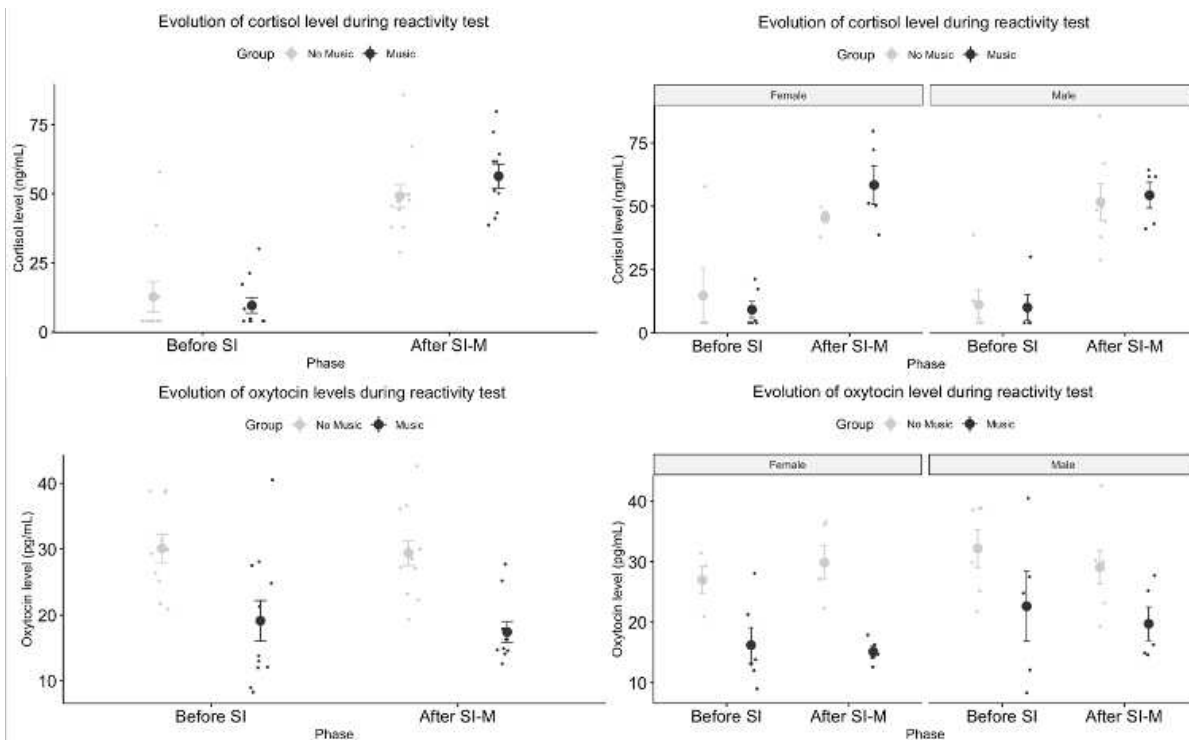


Figure 13: Mean (\pm standard error) plasma cortisol level measured during the reactivity test (top, left) with gender influence (top, right) and plasma oxytocin level measured during the reactivity test (bottom, left) with gender influence (bottom, right).

Behavioral responses

The locomotion, evaluated by the number of crossed zones, was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.373$, $p = 0.548$). There was a significant interaction between the group and the phase ($F = 6.364$, $p = 0.003$): the locomotion was bigger for the Music group than for the No Music group only during the SI phase (Figure 14). The number of escape attempts was unaffected by the gender of the lambs ($F = 1.093$, $p = 0.308$). There was a significant interaction between the group and the phase for the number of escape attempts ($F = 4.271$, $p = 0.02$): the number of escape attempts was significantly bigger for the Music group than the No Music group only for the SI phase (Figure 14).

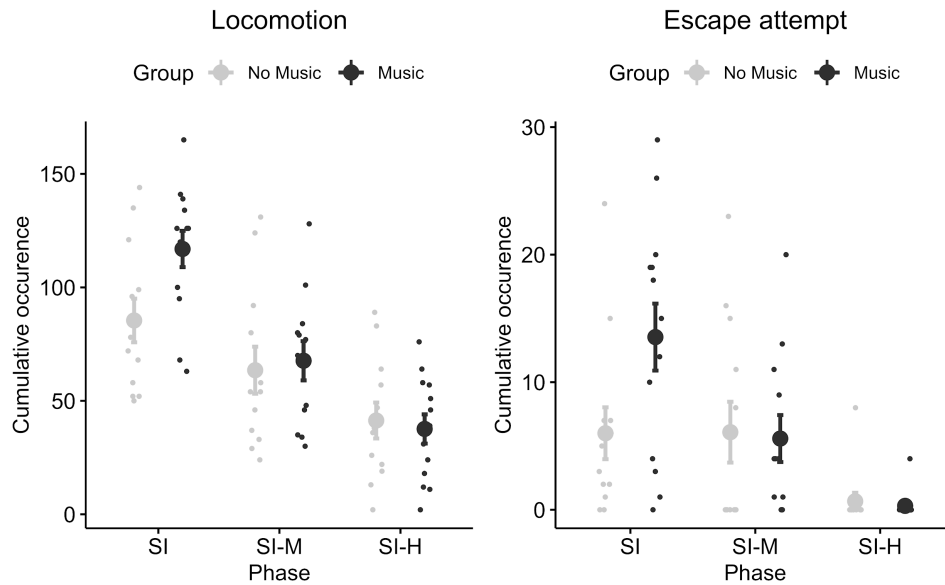


Figure 14: Mean (\pm standard error) and individual cumulative occurrence of locomotion (number of times the lamb changed zones) and (left) and escape attempts (right) during each phase of the reactivity test. SI = Social Isolation phase; SI-M = Social Isolation phase with music diffusion; SI-H = Social Isolation with the presence of a passive man.

The number of bleats was significantly higher for females than males ($F = 12.030$, $p = 0.002$) and was significantly different between the three phases: the number of bleats was higher during the SI phase than during the SI+M and SI+H phase and was higher in the SI+M phase than during the SI+H phase. The number of bleats decreased across the phases (Figure 15).

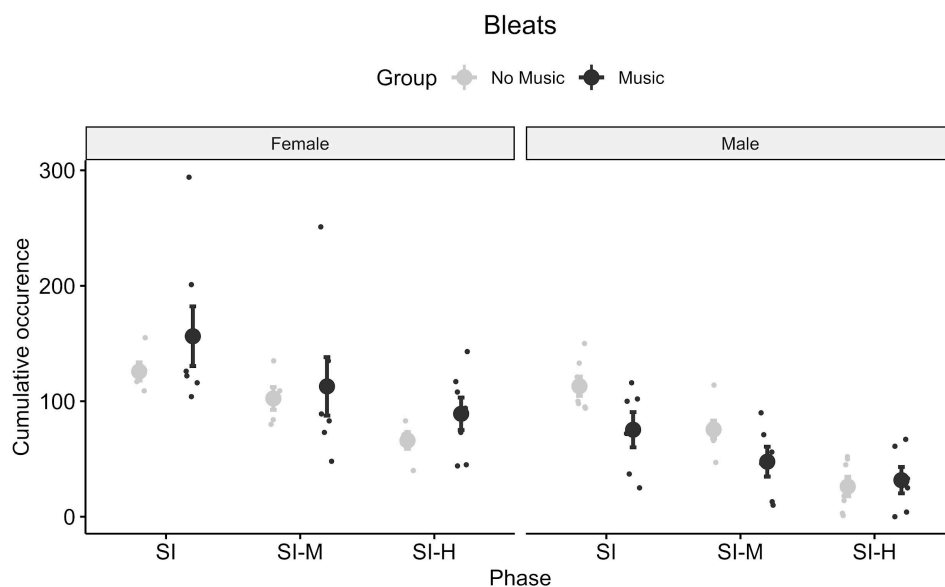


Figure 15: Mean (\pm standard error) and individual cumulative occurrence of bleats for female (left) and male (right) lambs during each phase of the reactivity test. SI = Social Isolation phase; SI-M = Social Isolation phase with music diffusion; SI-H = Social Isolation with the presence of a passive man.

The time spent immobile was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.820, p = 0.376$). The time spent immobile was not different between groups ($F = 0.015, p = 0.904$) but was significantly different between phases ($F = 9.197, p = 0.00046$): it was significantly shorter during the SI phase than the SI+M and SI+H phases (Figure 16).

The sniffing time was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.352, p = 0.560$). The sniffing time was not different between groups ($F = 1.127, p = 0.300$) but was significantly different between phases ($F = 31.696, p < 0.001$): it was significantly shorter during the SI+H phase than during the SI and SI+M phases (Figure 16).

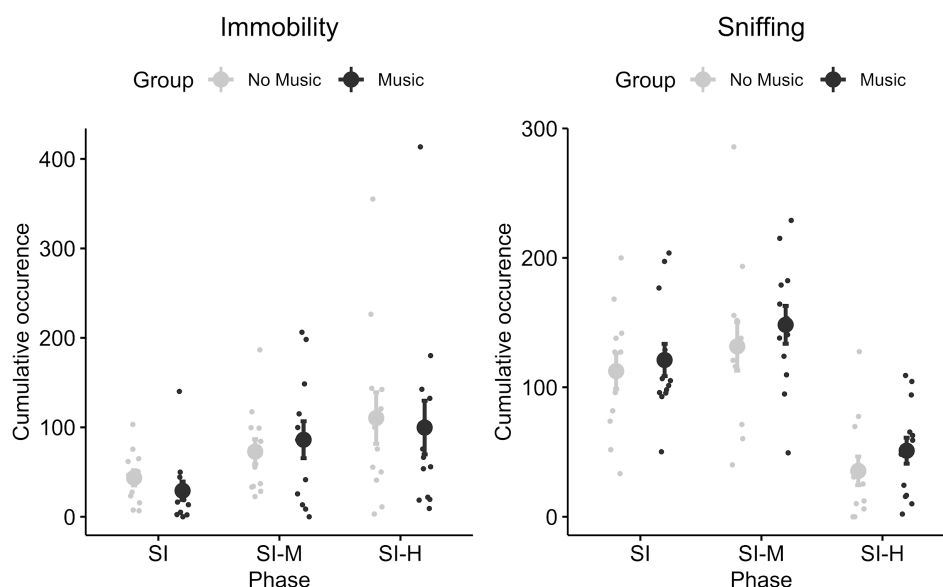


Figure 16: Mean (\pm standard error) and individual cumulative occurrence of immobility and (left) and sniffing (right) during each phase of the reactivity test. SI = Social Isolation phase; SI-M = Social Isolation phase with music diffusion; SI-H = Social Isolation with the presence of a passive man.

The time lying on the floor was affected by the gender of the lambs ($F = 4.500, p = 0.047$): males spent significantly more time lying on the floor than females. However, there was no group or phase difference for the time lying on the floor.

There were no interaction, group or phase differences for the number of excrements.

Subjective observation of the time spent in each zone showed that the lambs were more often located in zones 7 and 8 when the familiar human was present, the Music lambs being more often in these zones than the No music lambs (Figure 17).

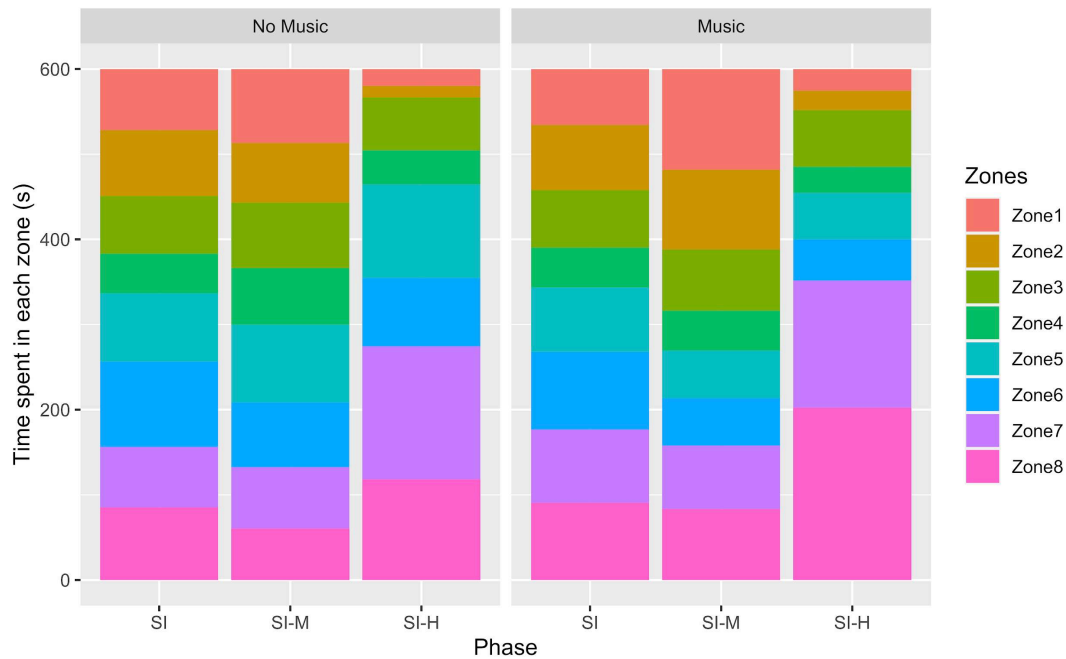


Figure 17: Mean time (in seconds) spent in each zone during each phase of the reactivity test. SI = Social Isolation phase; SI-M = Social Isolation phase with music diffusion; SI-H = Social Isolation with the presence of a passive man.

Motivation test

The locomotion was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.086$, $p = 0.772$). There were no Group or Phase differences for the locomotion (Figure 18).

The number of bleats was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.305$, $p = 0.586$). There was an interaction between Group and Phase factors for the number of bleats ($F = 3.275$, $p = 0.026$) (Figure 18).

The time spent immobile was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.216$, $p = 0.647$). This time spent immobile increased during the experiment: it was significantly longer in KO phase than in KE and M phases. It was also significantly longer in the H phase than in the KO phase. However, it was not different between groups ($F = 0.180$, $p = 0.676$) (Figure 18).

The sniffing time was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.067$, $p = 0.798$). The sniffing time was significantly different between phases ($F = 9.288$, $p < 0.001$): it was significantly longer for the M phase than the SI phase and was also longer for the H phase than for the KO phase. However, there was no difference between groups ($F = 1.136$, $p = 0.298$) (Figure 18).

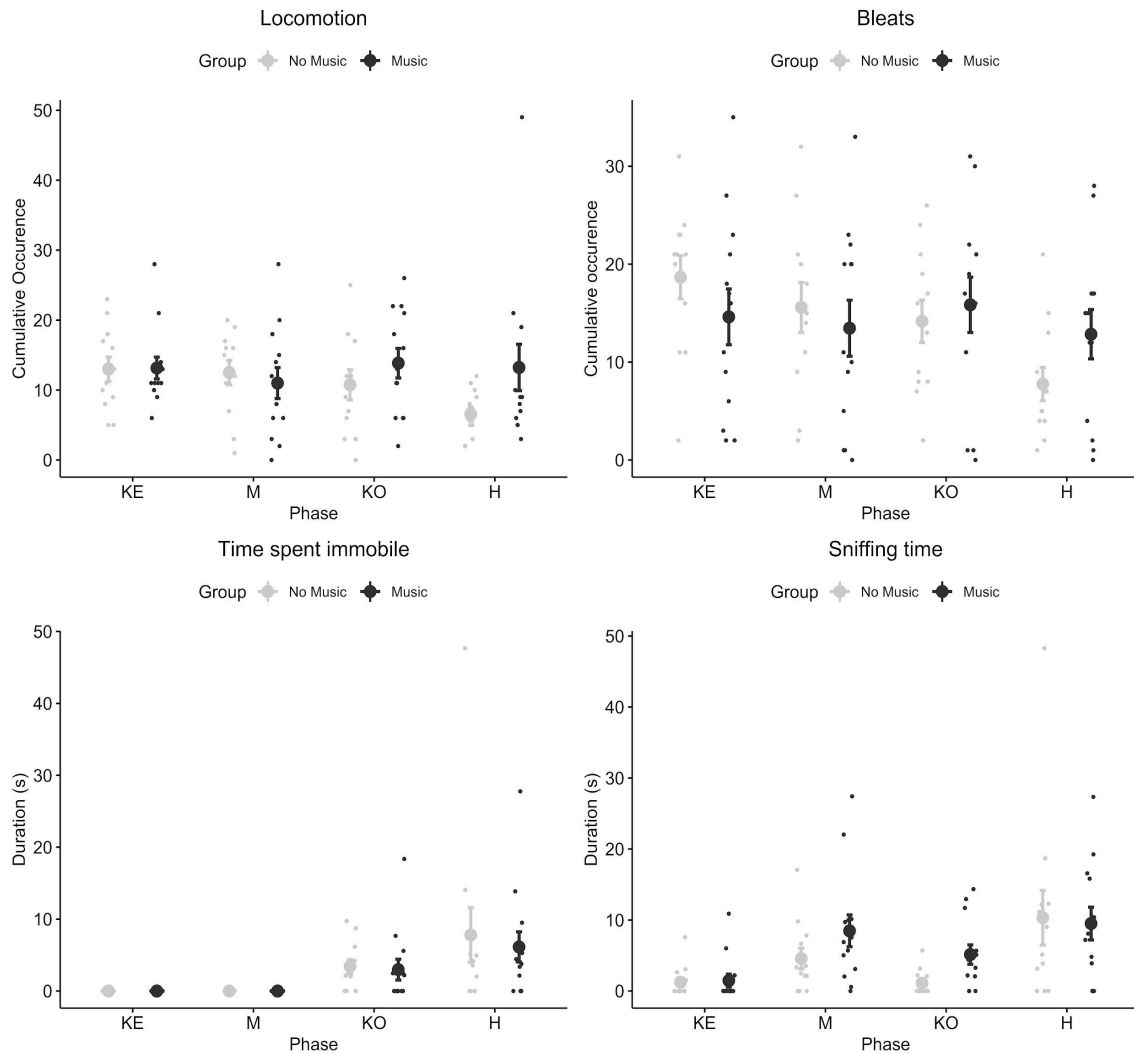


Figure 18: Mean (\pm standard error) and individual cumulative occurrence of locomotion and (top left) and bleats (top right) or duration (in seconds) of time spent immobile (bottom left) and sniffing (bottom right) during each phase of the motivation test. KE =Known Environment; M = Music; KO = Known Object; H = Human.

The contact time with congeners was unaffected by the gender of the lambs ($F = 0.950, p = 0.341$). The contact time was significantly different between phases ($F = 21.529, p < 0.001$): this contact time decreased with time.

There were no interaction, group or phase differences for the number of excrements.

The examination of the time spent in each zone showed that the lambs were more often located in zones 7 and 8 during music diffusion and when the familiar human was present (Figure 19).

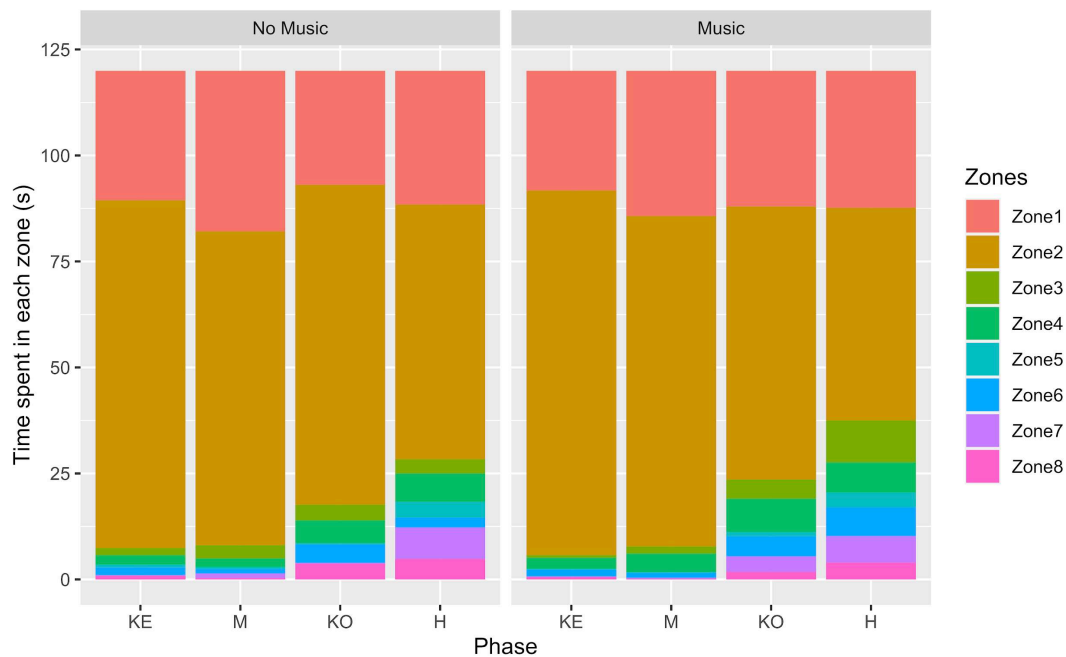


Figure 19: Mean time (in seconds) spent in each zone during each phase of the motivation test. KE = Known Environment; M = Music; KO = Known Object; H = Human.

Discussion

Global impact of music during breeding

No impact of music exposure was noticed for the lambs' sanitary status. However, the presence of diarrhea and dirty posterior was observed regardless of group. The sanitary status of our lambs bred by mother-deprivation with milk replacement is in accordance with the literature and indicates that their sanitary status was degraded (Belanche et al., 2019; Napolitano et al., 2008).

The body weight of the No Music group was superior to the weight of the Music group from day 28. Two hypotheses may explain this difference: the No Music lambs eat more than the Music lambs or the Music lambs have a higher activity than the No Music lambs. However, neither of these hypotheses were validated during the experiment. That said, the examination of the feeding behavior of Music lambs showed that they ate and explored less during music diffusion than during the periods of no music, whereas it was the contrary for "lay and rest" behavior. These observations suggest that music diffusion could interrupt the activities of lambs, which become more immobile with music. To explore this idea further, our perspective is to analyse behaviors in longer periods with and without music diffusion. Moreover, in order to understand where this difference comes from, it would be

interesting to explore the metabolism of lambs and examine their body composition, in particular the rate of fat and muscle mass growth.

Working with young lambs bred by mother-deprivation with milk replacement, two main behavioral changes were expected: the modification of feeding behavior with the access to solid food 10 days after birth, and the decreased time spent lying down, the time in exploration increasing with the age of lambs. We did observe these two phenomena in our study but with some differences according to the music diffusion. First, Music lambs were the first to eat the solid food a couple of days before the No music lambs. Next, because the solid food access was associated with an access to the entire enclosure, we also observed an impact on exploration and resting behaviors. As expected, the time spent “Lay down and Rest” decreased over time, certainly due to the fact that the lambs develop and acquire autonomy.

The examination of the behavioral activities throughout the breeding period highlighted an impact of music diffusion on behavioral activities but without clear increased well-being. Perhaps even on the contrary, the music could have disrupted the lambs behavior. Indeed, by comparing the phases with music and without music, we observed that lambs spent less time in exploration and ate less when music was diffused, whereas they spent more time in laying and resting posture. Further examination of this latter posture should allow us to discriminate whether lambs are in tonic immobility posture (in stress) or in a relaxation posture.

The examination of basal hormonal profiles of oxytocin and cortisol could help us to interpret the impact of music diffusion. The cortisol level was not different between the two groups except for two days (where the cortisol level was higher for the Music group than the No Music group). Because we do not observe an evident and constant impact of music on basal cortisol level, we conclude, with this parameter, that the music exposure had neither a positive nor a negative effect to counteract the absence of mother in lambs. However, we noticed high basal levels of plasma cortisol for both groups. In rhesus macaque (Clarke, 1993) and sheep (Moberg et al., 1980), it has been shown to have a high level of cortisol after birth that decreases during the following weeks. In our study, the level of cortisol did not decrease. Thus, our results are in accordance with the literature indicating that mother-deprivation with milk replacement could lead to an early stressful situation resulting in deregulation of the HPA axis (Gaudin, 2015). Concerning oxytocin, our study highlighted higher basal levels of plasma oxytocin in No Music lambs than in Music lambs. Because specific oxytocin plasma levels (high or low) cannot be used as reliable biomarkers of a specific emotional state (Sippel et al., 2017), it is difficult to conclude about the impact of music on lambs' well-being. In Gaudin's study (Gaudin et al., 2018), elevated plasma oxytocin levels were observed in maternally deprived lambs. This high level of oxytocin was interpreted as being due to the absence of a maternal figure. In our study, Music

lambs had lower basal levels of plasma oxytocin that could be interpreted in two opposite ways: a diminution of chronic stress due to absence of mother or an increase of chronic stress. In this context, based on our hypothesis, our results did not suggest that music was able to counteract the deleterious impact of the absence of the mother or to increase lamb well-being (table 5).

Breeding period		
<i>Variables</i>	<i>Expected data</i>	<i>Observed data</i>
Body weight	Music \geq No Music	Music < No Music
Sanitary status	Music \geq No Music	Music = No Music
Stand and Explore	Music > No Music	Music < No Music
Lay down and Rest	Music < No Music	Music < No Music
Food intake	Music > No Music	Music > No Music
Milk drinking	Music > No Music	Music > No Music
Solid Food intake	Music > No Music	Music > No Music
Oxytocin	Music \geq No Music	Music < No Music
Cortisol	Music \leq No Music	Music > No Music

Table 5: Summary of the differences between No Music and Music group during breeding

Impact of music on brain morphology

The diffusion of music early after birth may have modified the development of brain regions or brain structures specifically involved in auditory perception, in locomotor activity or cognition. Based on our results, the impact of music diffusion, after about 2 months of exposure, is limited to the caudate nucleus and the medial geniculate nucleus.

The relative volume of the caudate nucleus was smaller for the Music group than the No Music group. It has previously been reported that the caudate nucleus is larger for lambs bred with their mother

(Love et al., 2021), probably due to high locomotor and cognitive activity. In our experiment, the No Music lambs were seen more often standing up and exploring than the Music group: this locomotor difference may be at the origin of the difference in caudate nucleus relative volume. The relative volume of the medial geniculate nucleus was larger for the Music group than for the No Music group in the right hemisphere. As the medial geniculate nucleus is involved in the auditory system (Henkel, 2018), this difference in relative volume of the medial geniculate nucleus may be due to the diffusion of music during breeding. Music may promote the development of this brain region. This part of our work would benefit from further investigation by studying other MRI parameters (signal intensity, FA...) and by studying the dynamics of specific brain structure development. Indeed, it has been observed that some impact of early experience could be transitory (Love et al., 2021).

Emotional reactivity

Our hypothesis was that if music is able to improve well-being, lambs exposed to music would be less sensitive to stress. We predicted that Music lambs would present lower stress responses than the No music lambs (table 6). Our observations did not confirm our hypothesis since music-exposed lambs presented similar high plasma cortisol levels, high numbers of bleats, higher escape attempts and locomotor activity than the No Music lambs, suggesting that music-exposed lambs were more stressed by social isolation. As we expected, the presence of the familiar human appeased the lambs of both groups. Interestingly, and as predicted, music diffusion during social isolation appeased exclusively the Music lambs. During this phase, Music lambs presented lower occurrences of locomotion and escape attempts than during the social isolation, this calming effect of music was not observed for No Music lambs. However, we noticed that, for both groups, females bleated more than males, which is consistent with the literature indicating that females are more stressed than males (Viérin & Bouissou, 2003). This result can be confirmed by the fact that the males also spent more time lying down during the test than the females, indicating that the males were less stressed than females. We also noticed that the animals from both groups spent more time close to music and human during the second and third phases showing that No Music lambs were also attracted by music (table 6).

Reactivity test						
Variables	Expected data			Observed data		
	SI	SI+M	SI+H	SI	SI+M	SI+H
Cortisol	Music \leq No music	Music \ll No Music		Music = No Music	Music = No Music	
Oxytocin	Music \geq No music	Music \gg No music		Music < No Music	Music < No Music	
Locomotion	Music \leq No music	Music \ll No Music	Music = No Music	Music > No music	Music = No Music	Music = No Music
Bleats	Music \leq No music	Music \ll No Music	Music = No Music	Music = No Music	Music = No Music	Music = No Music
Escape	Music \leq No music	Music \ll No Music	Music = No Music	Music > No music	Music = No Music	Music = No Music
Lay down	Music > No Music	Music > No Music	Music = No Music	Music = No Music	Music = No Music	Music = No Music
Location (close to the stimulus Music or Human)		Music \gg no music	Music = no music		Music = no music	Music < no music

Table 6: Summary of the differences between No Music and Music group during reactivity test

Motivation

No difference was found between the Music and No Music lambs during this test except in the presence of the passive human. The number of bleats decreased during the H phase only for the No Music group. Music lambs may be less sensitive to human presence in the arena test and prefer unknown congeners. In this test, we also noticed that the animals were observed in the zones close to the stimuli when they were present (music and human), confirming the interest for music even for lambs that were not previously exposed to it.

Conclusion

To our knowledge this is the first investigation of the possibility that music could help to counteract the negative consequences of mother-deprivation and milk-replacement early after birth.

Preliminary results obtained in male lambs after one week of exposure at the age of 7-10 days suggested that music was able to modify behavior (Ubiema et al., 2021). Our study confirms this

preliminary conclusion but does not show a clear positive impact on lambs' well-being. While music seems to have a calming effect on socially isolated lambs exposed to music during early life, it does not seem to have a positive impact during breeding. Positive impact was reported in several species (Ubiema et al., 2021) and also recently described in pigs (J. Li et al., 2021). In this latter study, music has an impact on behavioral response and cortisol levels in growing pigs, for which exposure to music started at the age of 40 days. In our study, music started only a few days after birth and lasted for about 2.5 months, which may be too early to detect its effect. Contrary to our preliminary study, lambs were exposed to a novel environment with music, an unknown sound, immediately after being separated from their mother. These environmental changes were maybe too abrupt and disturbed the lambs, too young to be exposed to music.

In most studies, only one unique song is played throughout the experiment (Aoun et al., 2005; J. Li et al., 2021; Sutoo & Akiyama, 2004). However, we made the choice to diffuse podcasts of varied classical music (rhythm, presence of singing or not etc.) to avoid boring the animals. It could be interesting to study the impact of only one song and to test other types of music. It has been shown that, in mice, "New born" music has an impact on stress but not classical or pop music (Van Loo et al., 2004). Moreover, some human voices were kept in the podcasts, because we wanted to test a situation that could be easily translated in farms - simply turning on the radio. If the animals have associated human voices heard during the music phases with the caregiver's voices, this could explain some differences between Music and No music lambs found in reactivity and motivations tests when a passive human was present.

To go further, it would be relevant to compare the effect of music to other ambient and natural noises or to the noises of congeners as it has been tested in some other studies (Cloutier et al., 2000; Wells et al., 2006). However, our study demonstrates that lambs are not insensitive to classical music. First, we noticed that in stressful situations, lambs were attracted to music, which could be an indicator that music could have a calming effect. Second, for Music lambs, there is no doubt that behavioral activity was modified. At last, we noticed that it was less difficult to anesthetize the music-exposed lambs than the no music lambs. In this context, it may be interesting to repeat this experience to increase the groups' size.

Author contributions

MS, CP, RN, FL, SL, EC contributed to protocol design; MS, CP, MM, OL, DD, SL, EC performed data acquisition; CP, OL, DD gave animal care; QD segmented the MRI images; MS, CP conducted behavioural observation of video recordings; MS, SL EC performed data analysis and interpretation; MS, SL, EC wrote the first draft.

References

- Aoun, P., Jones, T., Shaw, G. L., & Bodner, M. (2005). Long-term enhancement of maze learning in mice via a generalized Mozart effect. *Neurological Research*, *27*(8), 791–796.
<https://doi.org/10.1179/016164105X63647>
- Belanche, A., Cooke, J., Jones, E., Worgan, H. J., & Newbold, C. J. (2019). Short- and long-term effects of conventional and artificial rearing strategies on the health and performance of growing lambs. *Animal*, *13*(4), 740–749. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002100>
- Brooker, J. S. (2016). An investigation of the auditory perception of western lowland gorillas in an enrichment study: Auditory Perception of Gorillas. *Zoo Biology*, *35*(5), 398–408.
<https://doi.org/10.1002/zoo.21312>
- Brunet, L., Coquil, X., & Trommenschlager, JM. (2016). *Nurses to breed replacement calves: An innovation combining work decrease and animal performances*. 1.
- Clarke, A. S. (1993). Social rearing effects on HPA axis activity over early development and in response to stress in rhesus monkeys. *Developmental Psychobiology*, *26*(8), 433–446.
<https://doi.org/10.1002/dev.420260802>
- Cloutier, S., Weary, D. M., & Fraser, D. (2000). Can Ambient Sound Reduce Distress in Piglets During Weaning and Restraint? *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *3*(2), 107–116.
https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0302_3
- de Jonge, F. H., Boleij, H., Baars, A. M., Dudink, S., & Spruijt, B. M. (2008). Music during play-time: Using context conditioning as a tool to improve welfare in piglets. *Applied Animal Behaviour Science*, *115*(3–4), 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.04.009>

- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Gaudin, S. (2015). *Attachement chez l'agneau: Approches comportementale, physiologique et neurobiologique*. Tours.
- Gaudin, S., Chaillou, E., Wycke, M.-A., Cornilleau, F., Moussu, C., Calandreau, L., Lainé, A.-L., & Nowak, R. (2018). All bonds are not alike: A psychoendocrine evaluation of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, 60(1), 90–103. <https://doi.org/10.1002/dev.21552>
- Henkel, C. K. (2018). The Auditory System. In *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* (pp. 306-319.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39632-5.00021-9>
- Hernandez, C. E., Matthews, L. R., Oliver, M. H., Bloomfield, F. H., & Harding, J. E. (2009). Effects of sex, litter size and periconceptional ewe nutrition on the ewe–lamb bond. *Applied Animal Behaviour Science*, 120(1–2), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.04.012>
- Howell, S., Schwandt, M., Fritz, J., Roeder, E., & Nelson, C. (2003). A Stereo Music System as Environmental Enrichment for Captive Chimpanzees. *Lab Animal*, 32(10), 31–36. <https://doi.org/10.1038/labani1103-31>
- Khan, A., & Ahmad, R. (1997). *Maternal immunoglobulins transfer and neonatal lamb mortality—A review*.
- Latham, N. R., & Mason, G. J. (2008). Maternal deprivation and the development of stereotypic behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 110(1–2), 84–108. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.026>

- Li, J., Li, X., Liu, H., Li, J., Han, Q., Wang, C., Zeng, X., Li, Y., Ji, W., Zhang, R., & Bao, J. (2021). Effects of music stimulus on behavior response, cortisol level, and horizontal immunity of growing pigs. *Journal of Animal Science*, *99*(5), skab043. <https://doi.org/10.1093/jas/skab043>
- Li, X., Zhao, J. N., Zhao, P., Zhang, X., Bi, Y. J., Li, J. H., Liu, H. G., Wang, C., & Bao, J. (2019). Behavioural responses of piglets to different types of music. *Animal*, *13*(10), 2319–2326. <https://doi.org/10.1017/S1751731119000260>
- Love, S. A., Haslin, E., Bellardie, M., Andersson, F., Barantin, L., Filipiak, I., Adriaensen, H., Fazekas, Cs. L., Leroy, L., Zelena, D., Morisse, M., Elleboudt, F., Moussu, C., Lévy, F., Nowak, R., & Chaillou, E. (2021). Maternal deprivation and milk replacement affect the integrity of gray and white matter in the developing lamb brain. *Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4714659>
- Moberg, G. P., Anderson, C. O., & Underwood, T. R. (1980). Ontogeny of the Adrenal and Behavioral Responses of Lambs to Emotional Stress. *Journal of Animal Science*, *51*(1), 138–142. <https://doi.org/10.2527/jas1980.5111138x>
- Napolitano, F., De Rosa, G., & Sevi, A. (2008). Welfare implications of artificial rearing and early weaning in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*, *110*(1–2), 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.020>
- Nowak, R. (1999a). *Comportement animal ete bien-être* (Zootechnie).
- Nowak, R. (1999b). *Comportement animal ete bien-être* (Zootechnie).
- Nowak, R., Murphy, T. M., Lindsay, D. R., Alster, P., Andersson, R., & S-Moberg, K. U. (1997). *Development of a Preferential Relationship With the Mother by the Newborn Lamb: Importance of the Sucking Activity*. 8.
- Nowak, R., & Poindron, P. (2006). From birth to colostrum: Early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development*, *46*(4), 431–446. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006023>

- Sanyal, T., Kumar, V., Nag, T. C., Jain, S., Sreenivas, V., & Wadhwa, S. (2013). Prenatal Loud Music and Noise: Differential Impact on Physiological Arousal, Hippocampal Synaptogenesis and Spatial Behavior in One Day-Old Chicks. *PLoS ONE*, 8(7), e67347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067347>
- Sippel, L. M., Allington, C. E., Pietrzak, R. H., Harpaz-Rotem, I., Mayes, L. C., & Olf, M. (2017). Oxytocin and Stress-related Disorders: Neurobiological Mechanisms and Treatment Opportunities. *Chronic Stress*, 1, 247054701668799. <https://doi.org/10.1177/2470547016687996>
- Sutoo, D., & Akiyama, K. (2004). Music improves dopaminergic neurotransmission: Demonstration based on the effect of music on blood pressure regulation. *Brain Research*, 1016(2), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.018>
- Ubiema, G., Siwiaszczyk, M., Parias, C., Bresso, R., Hay, C., Mulot, B., Love, S. A., & Chaillou, E. (2021). *The use and impact of auditory stimulation in animals*.
- Val-Laillet, D., Nowak, R., Giraud, S., Tallet, C., & Boivin, X. (2006). Nonnutritive sucking: One of the major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology*, 48(3), 220–232. <https://doi.org/10.1002/dev.20142>
- Val-Laillet, D., Simon, M., & Nowak, R. (2004). A full belly and colostrum: Two major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology*, 45(3), 163–173. <https://doi.org/10.1002/dev.20024>
- Van Loo, P. L. P., Croes, I. A. A., & Baumans, V. (2004). *Music for mice does it affect behavior and physiology?* Congress of the federation of european laboratory animam science association, Nantes, France.
- Viérin, M., & Bouissou, M.-F. (2003). Responses of weaned lambs to fear-eliciting situations: Origin of individual differences: Fear Reactions in Lambs. *Developmental Psychobiology*, 42(2), 131–147. <https://doi.org/10.1002/dev.10090>

Wells, D. L., Coleman, D., & Challis, M. G. (2006). A note on the effect of auditory stimulation on the behaviour and welfare of zoo-housed gorillas. *Applied Animal Behaviour Science*, *100*(3–4), 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.12.003>

Hypothèse phylogénie : les animaux sauvages

I. Les animaux de la faune sauvage, un modèle d'intérêt pour l'étude de la phylogénie

Comme nous l'avons vu en introduction générale, les comportements adaptatifs des animaux font l'objet d'une sélection constante au cours de l'évolution. Du point de vue de l'écologie comportementale, les comportements qui ont fait l'objet d'une sélection tout au long de l'évolution concernent l'habitat, la socialité ou l'alimentation des animaux. En neurosciences, ce cadre théorique a été repris dans des travaux de neuroanatomie comparée pour comprendre l'évolution du cerveau humain (Herculano-Houzel, 2019; Mota et al., 2019). Ces travaux ont examiné différents paramètres rendant compte de l'anatomie cérébrale, comme les volumes de matière grise corticale et de matière blanche sous corticale, et n'ont pas mis en évidence de relation universelle commune à toutes les espèces de mammifères (Mota et al., 2019). Au contraire, il semblerait même que de tels paramètres sont communs à différentes classes de mammifères (Herculano-Houzel, 2019). A l'échelle neuratomique, notre équipe a constaté que l'organisation des connexions de la PAG décrites chez la brebis adulte présentait des différences notables avec celle décrite chez le rat ou le chat mais qu'elle était proche de celle décrite chez le lapin ou le singe écureuil (Menant et al., 2018). Cette différence a été interprétée sur la base de l'écologie comportementale des différentes espèces, à savoir que la brebis, le lapin et le singe écureuil sont des proies alors que le rat et le chat sont des prédateurs.

C'est dans ce contexte que nous avons initié une approche de biologie comparée pour tester notre hypothèse sur la phylogénie. Nous avons pu envisager une telle démarche grâce à notre partenaire Beauval Nature et le ZooParc de Beauval qui a collecté les encéphales lors des autopsies des animaux décédés de cause naturelle dans le zoo parc. A l'image du don du corps pour les recherches en biologie humaine, la disponibilité des pièces anatomiques n'est pas prévisible et les approches proposées sont essentiellement qualitatives et descriptives. Pour initier notre travail, sur l'ensemble des pièces anatomiques prélevées, nous avons sélectionné dans un premier temps des espèces herbivores (sitatunga, bongo, cerf-souris, maki-catta) et des espèces carnivores prédatrices (jaguar, tigre, otarie). Bien qu'étant nés en captivité, les animaux expriment la plupart des comportements de l'espèce en particulier lorsque les enclos sont adaptés à leurs besoins en termes d'habitat et d'enrichissement (caches alimentaires par exemple). Ainsi, il existe toujours une hiérarchie sociale dans les groupes de félins ou de primates, qui s'exprime notamment lors de la distribution alimentaire. Quant aux comportements de chasse propres aux prédateurs, même s'ils ne peuvent s'exprimer comme en milieu naturel, il peut arriver que les animaux reproduisent leurs comportements de chasse avec de petites proies telles que des pigeons ou des rongeurs égarés dans les enclos ! S'agissant des herbivores, même

s'ils ne sont plus soumis à la prédation dans leurs enclos, ils présentent toujours un comportement craintif, notamment face à l'être humain, ainsi que leur caractère grégaire.

Dans ce travail, je présenterai brièvement les caractéristiques générales relatives à chaque spécimen étudié avant de présenter la méthodologie utilisée et les premiers résultats comparatifs.

1. Caractéristiques générales des spécimens

Les spécimens présentés ici sont :

- 3 ruminants : le sitatunga, le bongo, le cerf-souris
- 1 primate omnivore à tendance frugivore : le maki-catta
- 3 carnivores : le tigre, le jaguar, l'otarie.



Figure 12 : Photo d'un groupe de sitatungas prise au ZooParc de Beauval (Saint Aignan, France)

Le sitatunga (*Tragelaphus spekii*) ou Guib d'eau (Figure 12), de la famille *Bovidae*, du genre *Tragelaphus* est une antilope semi-aquatique (*Sitatunga (guib d'eau) : description + photos*, 2019; *Sitatunga - Wikipédia*, 2021). C'est un herbivore qui a la capacité de se nourrir en étant semi ou totalement immergé dans l'eau. Il se nourrit à la fois d'herbes, de feuilles, de plantes aquatiques et de fruits. Cette antilope se trouve en Afrique centrale mais aussi

Afrique de l'Est et Afrique de l'Ouest. Son habitat se trouve dans les grandes forêts africaines ainsi que dans les zones humides marécageuses. Du point de vue de la socialité, le sitatunga est un animal social et grégaire qui vit en troupeau de quelques individus, essentiellement constitué de femelles et de jeunes. Comme pour les ovins, les mâles vivent entre eux, et rejoignent les femelles en période de reproduction. Il existe un dimorphisme sexuel au niveau du pelage avec des mâles bruns foncés tandis les femelles présentent un pelage de couleur fauve. Les deux genres portent des rayures et des taches blanches sur leur pelage. La taille des individus diffère aussi avec le genre. Les mâles pèsent entre 70 et 110 kg, mesurent entre 150 et 160 cm pour une hauteur au garrot de 100 à 120 cm et possèdent des cornes en spirale pouvant mesurer jusqu'à 90 cm. Les femelles sont plus petites puisqu'elles mesurent environ 130-140 cm pour une hauteur de garrot d'environ 80-90 cm pour un poids d'environ 45 à 65 kg, elles ne possèdent pas de cornes. La durée de gestation est de 7 à 8 mois pour des portées de 1 à 2 petits maximum. Les petits arrivent à maturité sexuel à 1 an pour les femelles et plus tardivement pour les mâles, vers 1 an et demi. Leur longévité est d'environ 19 ans.

Le bongo (*Tragelaphus eurycerus*) de la famille *Bovidae*, du genre *Tragelaphus* est une grande antilope (Figure 13) (Bongo, 2021; Bongo (animal) — Wikipédia, 2021; Bongo : Fiche descriptive complète + photos, 2019). C'est un herbivore qui se nourrit de jeunes pousses d'arbustes, de bambous, de racines et de graminées. Son habitat se trouve principalement en Afrique équatoriale (pour la sous espèce



Figure 13 : Photo d'un bongo (*Tragelaphus eurycerus*)

Tragelaphus eurycerus eurycerus) et plus rarement dans une zone montagneuse du Kenya (pour la sous espèce *Tragelaphus eurycerus isaaci*). C'est un animal social et grégaire qui vit en groupe familial de 5 à 7 individus et parfois seulement en couple. Les animaux présentent un pelage roux avec des rayures verticales et des taches blanches, ainsi qu'une crête de poils au niveau de la colonne vertébrale. Les mâles pèsent entre 240 et 405 kg tandis que les femelles pèsent entre 210 et 235 kg. Ils mesurent entre 170 et 250 cm avec une hauteur au garrot de 125 cm. Les mâles mais aussi les femelles possèdent des cornes en spirales pouvant mesurer jusqu'à 1 m. La durée de gestation est de 9 à 10 mois pour des portées de 1 à 2 petits maximum. Les petits arrivent à maturité sexuelle à 20 mois. Leur longévité est d'environ 17 ans dans la nature et 19 ans en captivité.



Figure 14 : Photo d'un cerf souris (*Tragulus javanicus*) prise au ZooParc de Beauval (Saint-Aignan, France)

Le cerf souris (*Tragulus javanicus*) ou Petit kanchil de Java de la famille *Tragulidae*, du genre *Tragulus* est un herbivore (Figure 14) (*Cerf-souris – Tragulus kanchil*, 2021; *Tragulus javanicus — Wikipédia*, 2021). Il se nourrit d'herbes, de fruits, de jeunes pousses, de fruits mais aussi parfois d'insectes. Ce mammifère se trouve seulement sur l'île de Java en Indonésie, dans les forêts tropicales. C'est un animal qui vit en couple et parfois en solitaire lorsqu'il devient plus âgé. Il mesure 45 cm avec une hauteur au garrot de 20 à 25 cm et pèse environ 2 kg. Cela fait du cerf souris l'un des plus petits ongulés qui existe. Il ne possède pas de bois mais le mâle possède deux grandes canines qui

sortent de sa bouche et qui vont servir lors de combats. La durée de gestation est d'environ 150 jours pour des portées de 1 à 2 petits maximum. Les petits arrivent à maturité sexuelle à 4 ou 5 mois. Lors d'observations menées au ZooParc de Beauval, nous avons noté la capacité du cerf-souris à du toilettage grâce à sa longue langue (Figure 15).

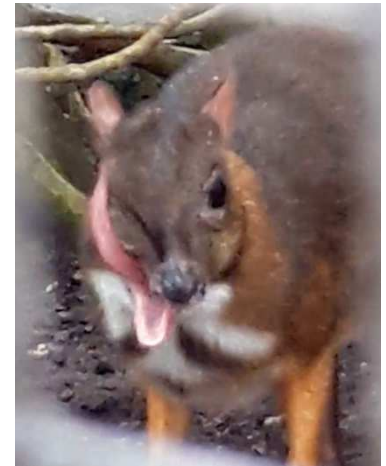


Figure 15 : Photo d'un cerf souris se toilettant (ZooParc de Beauval)

Le maki catta (*Lemur catta*) de la famille *Lemuridae*, du genre *Lemur* est un primate lemuriforme (Figure 16) (*Lémur catta* — Wikipédia, 2021; *Maki Catta*, 2021). Il est omnivore à tendance frugivore. Ce lémurien est présent exclusivement à Madagascar, plus précisément au sud et sud-ouest de l'île. Il vit dans des fourrés épineux ou des forêts sèches. C'est une espèce sociale qui vit en groupe d'une vingtaine d'individus ; souvent composé d'une femelle dominante et d'un seul mâle. Ils sont de couleur brun-gris sur le dos, gris clair sur la croupe et les membres, et blanche sur le poitrail. Sa queue mesure environ 60 cm et est annelée de noir et blanc, elle sert de balancier pour sauter dans les arbres. Ses membres ont 5 doigts terminés par un ongle plat et les mains ont des pouces opposables. Il mesure environ 40 cm et pèse entre 2,3 et 3,5 kg. La durée de gestation est d'environ 4 mois pour des portées de 1 à 2 petits maximum. Les petits arrivent à maturité sexuelle vers l'âge de 2-3 ans. La longévité du maki catta est de 20 à 25 ans.



Figure 16 : Photo d'un maki catta (*Lemur catta*)



Figure 17 : Photo d'un jaguar (*Panthera onca*)

Le jaguar (*Panthera onca*) de la famille des *Felidae*, du genre *Panthera* est un grand félin (Figure 17) (*Jaguar : Description du félin d'Amérique du Sud + photos*, 2021; *Jaguar* — Wikipédia, 2021). C'est un carnivore, chasseur opportuniste qui va manger à la fois des grandes proies (cervidés, serpents capibaras etc...) et des proies plus petites (grenouilles, poissons, tortues etc...). Le jaguar se trouve en

Amérique centrale et Amérique du Sud (du Mexique au Paraguay). Il vit essentiellement dans la forêt tropicale mais en présence d'étendues d'eau, c'est donc un très bon nageur. C'est une espèce solitaire et territoriale, les mâles et les femelles se rencontrent seulement pour l'accouplement. Leur pelage est jaune tacheté. Les femelles mesurent entre 1,10 et 1,70 m pour une hauteur au garrot de 70 cm et pèsent entre 40 et 70 kg. Les mâles sont plus imposants, ils mesurent entre 1,40 et 1,85 m et pèsent

entre 55 et 100 kg. La durée de gestation est de 91 à 111 jours pour une portée de 2 à 4 petits. Les petits arrivent à maturité sexuelle à l'âge de 2-3 ans pour les femelles et 3-4 ans pour les mâles. Leur durée de vie est d'environ 15 ans en milieu naturel et 23 ans en captivité.

Le tigre (*Panthera tigris*) de la famille *Felidae*, du genre *Panthera* est un grand félin (Figure 18) (*Tigre : description complète du félin + photos*, 2020; *Tigre — Wikipédia*, 2021). C'est un carnivore qui chasse de grosses proies telles que le cerf, le sanglier ou le buffle. Il se retrouve dans toute l'Asie (Inde, Népal, Bangladesh, Indonésie etc...). Il vit dans les forêts tropicales, les mangroves mais aussi dans les marécages.



Figure 18 : Photo d'un tigre (*Panthera tigris*)

C'est un très bon nageur capable de traverser des rivières. C'est une espèce solitaire et territoriale. Son pelage est orange avec des rayures noires verticales. Sa taille et son poids varient en fonction de la sous-espèce : ils peuvent mesurer de 1,40 à 3,30 m pour une hauteur au garrot de 80 cm à 1 m et peser entre 65 et 185 kg pour les femelles et 180 à 320 kg pour les mâles. La durée de gestation est de 3 à 4 mois pour une portée de 2 à 3 petits. Les petits arrivent à maturité sexuelle à l'âge de 3 ans pour les femelles et entre 3 et 6 ans pour les mâles. Leur durée de vie est d'environ 15 ans en milieu naturel et jusqu'à 25 ans en captivité.



Figure 19 : Photo d'un groupe d'otaries de Californie (*Zalophus californianus*)

L'otarie de Californie (*Zalophus californianus*) ou lion de mer de Californie, de la famille *Otariidae* et du genre *Zalophus*) est un mammifère marin carnivore, plus particulièrement piscivore (Figure 19) (*Lion de mer de Californie : description + photos*, 2019; *Otarie de Californie — Wikipédia*, 2021).

L'otarie se nourrit de poissons tels que le saumon, les anchois ou encore les pieuvres. Elle se trouve dans l'océan Pacifique, au niveau des côtes Ouest de la Californie,

de l'Alaska jusqu'au Costa Rica. L'otarie de Californie vit près des côtes et également près de zones fortement peuplées telles que les ports. C'est une espèce sociale et grégaire qui vit en colonies composées de dizaines d'individus. Leur pelage est brun foncé, les mâles ont en plus une coloration plus claire au niveau du ventre et des flancs. Il existe un important dimorphisme sexuel au niveau de la taille avec les mâles qui mesurent entre 2 m et 2,50m et pèsent de 200 à 300 kg tandis que les femelles mesurent de 1,50 à 2 m et pèsent entre 50 et 100 kg. La durée de gestation est de 11 à 12 mois pour une portée de 1 à 2 petits maximum. Les petits arrivent à maturité sexuelle entre 3 et 5 ans pour les femelles et 5 à 6 ans pour les mâles. Leur durée de vie est de 15 à 25 ans.

II. Méthodologie

1. Pièces anatomiques

Les cerveaux des sept spécimens ont été prélevés lors de l'autopsie systématique pratiquée après le décès constaté des animaux du ZooParc de Beauval (Saint-Aignan, France). Les décès naturels sont constatés lors des visites matinales des équipes, les dépouilles sont alors transportées et maintenues en chambre froide jusqu'à l'autopsie qui a lieu en fin de matinée ou en fin de journée selon la disponibilité des équipes vétérinaires. Sur la base de l'expérience du laboratoire d'anatomie et de l'association du don du corps (CHRU Bretonneau, Université de Tours), nous savons qu'au-delà de 12 heures après le décès, si la dépouille n'est pas conservée à +4°C, les organes commencent à se dégrader. Il a donc été convenu, en amont, du projet que seules les pièces pouvant être prélevées dans ce délai de 12 heures seraient collectées.

Lors de l'autopsie, les dépouilles ont été pesées, les encéphales ont été prélevés et immergés dans des flacons prêts à l'emploi contenant du formol 4% et conservés à 4°C pour être fixés. Après plusieurs semaines de fixation, les encéphales ont été pesés.

2. Acquisitions IRM

Au minimum 2 jours avant l'acquisition IRM, les encéphales ont été réhydratés dans une solution de tampon phosphate afin de récupérer du signal puis immergés dans du Fluorinert.

En fonction de la taille du cerveau, les acquisitions ont été réalisées avec des scanners IRM et des antennes adaptés. Les cerveaux du cerf souris, du maki catta, du sitatunga, du bébé jaguar et du bébé tigre étant de petite taille, ils ont été imagés avec un scanner IRM préclinique Bruker BioSpec de 11,7

Tesla ($G_{\max}=780\text{mT/m}$, $\text{slew-rate}=9500\text{T/m/s}$) associé à une antenne émettrice-réceptrice Bruker. Les cerveaux du bongo et de l'otarie de Californie étant de taille plus grosse, ont été imagés avec un scanner IRM clinique Siemens de 7 Tesla ($G_{\max}=50\text{mT/m}$, $\text{slew-rate}=333\text{T/m/s}$) associé à une antenne Nova Médical 1Tx/32Rx.

Pour les cerveaux imagés avec le scanner IRM préclinique 11,7 Tesla, une acquisition anatomique a été réalisée en utilisant une séquence 2D Écho de Spin (SE) pondérée en T_2 . La résolution a été adaptée en fonction de chaque individu : $175\ \mu\text{m}$ pour le cerf souris, $150\ \mu\text{m}$ pour le maki catta, $200\ \mu\text{m}$ pour les bébés tigre et jaguar ainsi que pour le sitatunga. Les autres paramètres de la séquence étaient : $\text{TE/TR} = 16/9000\text{ms}$, $\text{flip angle} = 90^\circ$, 9-10 excitations, 1 répétition. La durée d'acquisition était d'environ 5 heures pour chaque pièce anatomique. Pour les cerveaux de bongo et d'otarie de Californie imagés avec le scanner IRM clinique 7 Tesla, une acquisition anatomique a été réalisée en utilisant une séquence 3D SPACE pondérée en T_2 . La résolution d'acquisition était de $500\ \mu\text{m}$. Les autres paramètres de la séquence étaient : $\text{TE/TR} = 193/3200\text{ms}$, 1 excitation, 1 écho, $\text{flip angle} = 120^\circ$. La durée d'acquisition était d'environ 55 minutes.

Les images RM ont été réorientées selon l'axe CA-CP avant d'être segmentées.

3. Segmentation des images IRM

a. Encéphale

A partir des images RM, chaque encéphale a été segmenté semi automatiquement. Un seuil a été appliqué pour sélectionner autant de tissu cérébral que possible tout en excluant l'arrière-plan de l'image ce qui a permis de créer des masques de chaque encéphale. Ces masques ont ensuite été corrigés manuellement sur le logiciel de segmentation ITK-Snap pour s'assurer que tout le tissu cérébral était inclus dans le masque.

b. Régions d'intérêt

Pour chaque cerveau, des régions d'intérêts ont été délimitées manuellement à l'aide du logiciel ITK-Snap. Les régions segmentées sont la PAG et le noyau caudé.

III. Résultats

1. Caractéristiques morphologiques des spécimens

Le tableau 2 présente les différentes caractéristiques morphologiques des spécimens étudiés :

Espèce animale	Âge	Poids corporel (kg)	Poids encéphale (g)	Volume encéphale (mm ³)
Bongo	2 ans	150	386	353600
Cerf souris	1 an	1,438	15	12080
Cerf souris				
Jaguar	1 mois	3,1	66,2	56280
Maki catta	-	2,75	29	25590
Otarie	-	212	399,99	377800
Sitatunga	2 ans et 9 mois	28,12	138,8	-
Tigre	- (bébé)	1,145	59,9	52680

Tableau 2 : Tableau indiquant les différentes caractéristiques des spécimens étudiés : âge, poids corporel, poids et volume de l'encéphale

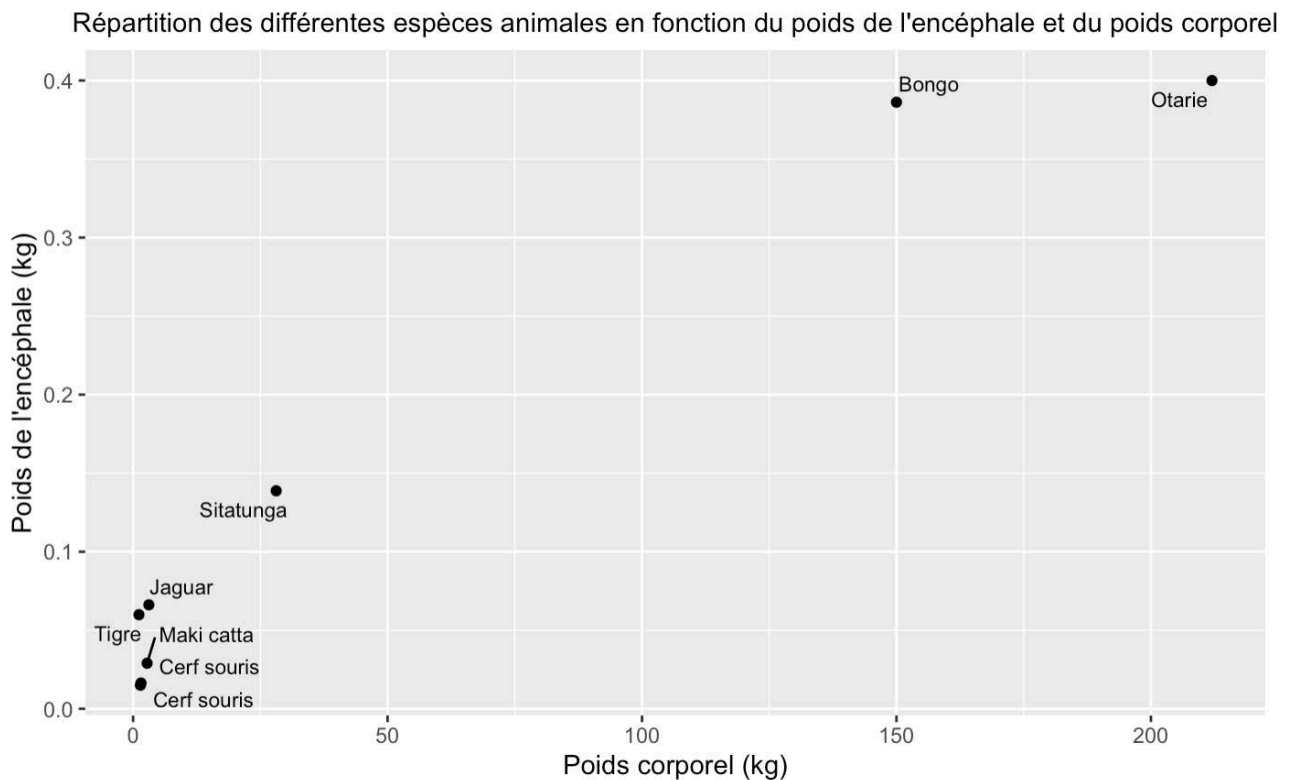


Figure 20 : Répartition des différentes espèces animales en fonction du poids de leur encéphale et de leur poids corporel

La représentation du poids des encéphales en fonction du poids corporel montre que plus l'animal est grand, plus son encéphale est lourd (Figure 20). Cette relation semble linéaire pour nos individus. Dans la littérature, il a été montré que chez les mammifères, le poids de l'encéphale est déterminé à 90 % par le poids corporel (Dicke & Roth, 2016). Cependant, à l'échelle de chaque espèce, certaines respectent plus ou moins cette relation. Le cerveau du dauphin, du chimpanzé ou de l'Homme est plus gros qu'attendu tandis que le cerveau de l'hippopotame ou de la baleine bleue est plus petit que ce que laisse penser cette relation.

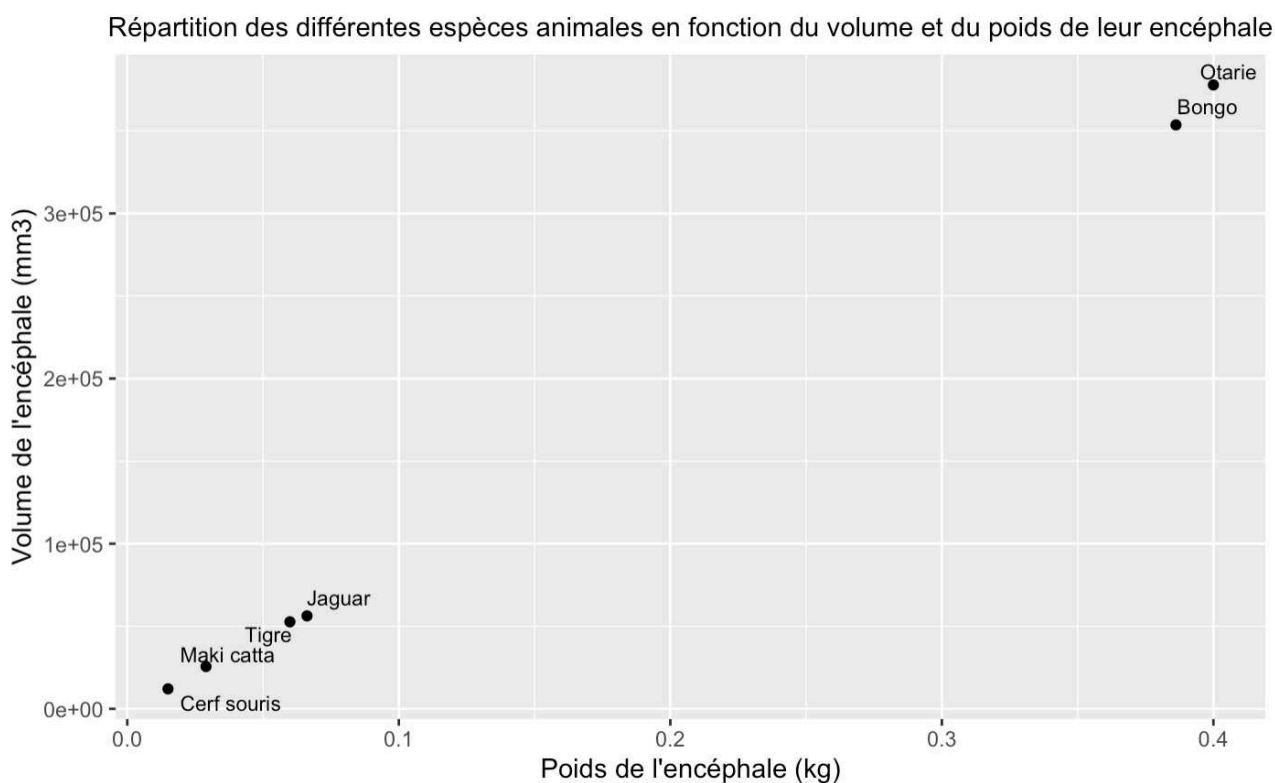


Figure 21 : Répartition des différentes espèces animales en fonction du volume (mm³) et du poids (kg) de leur encéphale

La représentation du volume en fonction du poids de l'encéphale semble également linéaire bien que deux cerveaux (tigre et jaguar) soit des cerveaux de juvéniles qui ne sont donc probablement pas matures. L'immatunité de ces deux encéphales est perceptible à l'examen des images RM peu contrastées (Figure 21) pour lesquelles les faisceaux de fibres blanches sont moins visibles que pour les spécimens adultes.

2. Morphologie des régions d'intérêt

Pour chaque spécimen, l'encéphale a été segmenté ainsi que la PAG et le noyau caudé (Figure 22 à Figure 27).

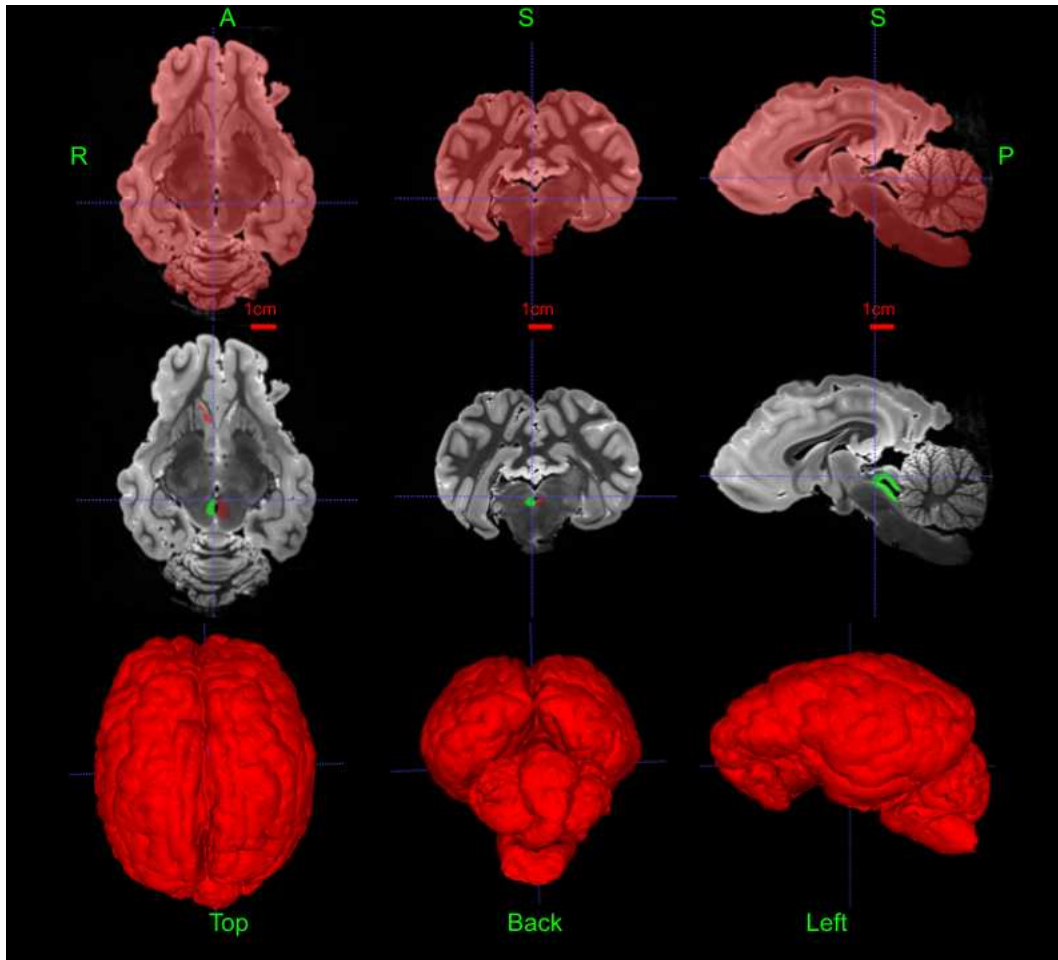


Figure 22 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de bongo superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 7 Tesla à NeuroSpin.

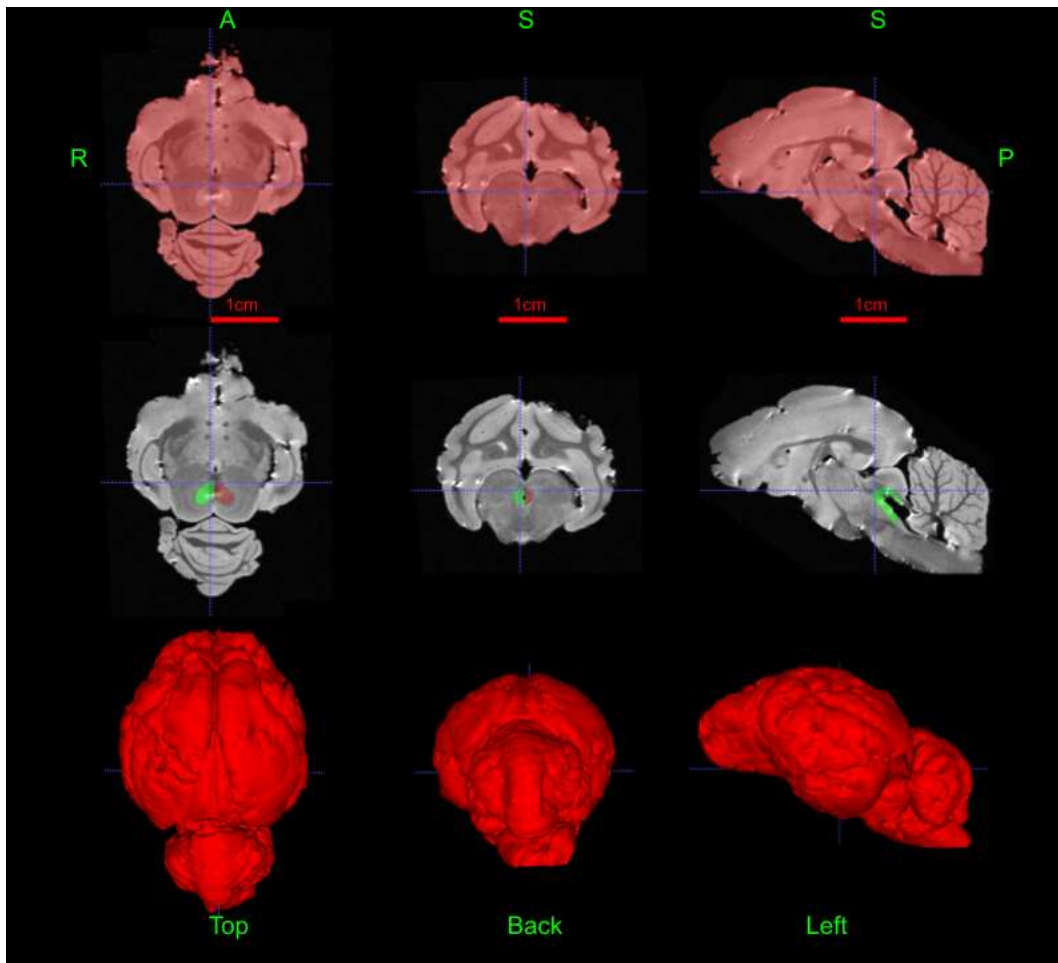


Figure 23 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de cerf souris superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin.

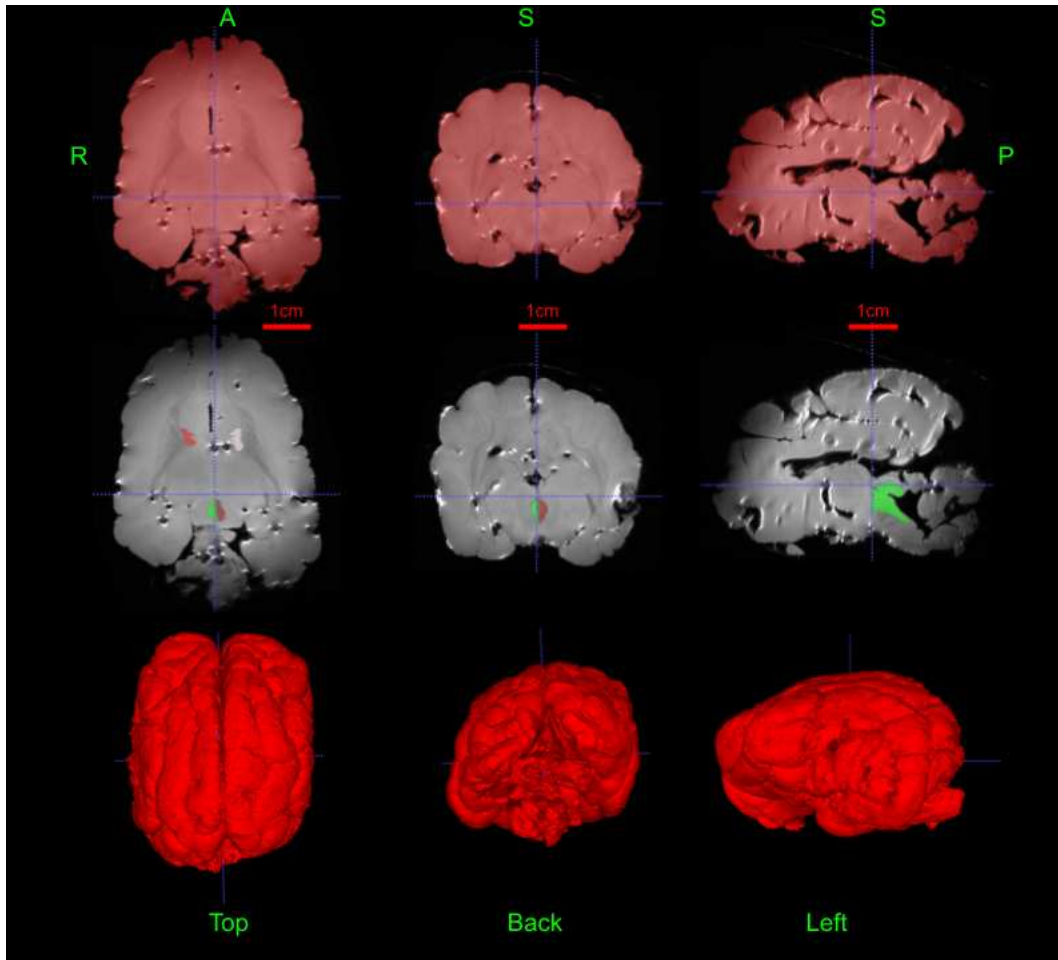


Figure 24 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de jaguar juvénile superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin

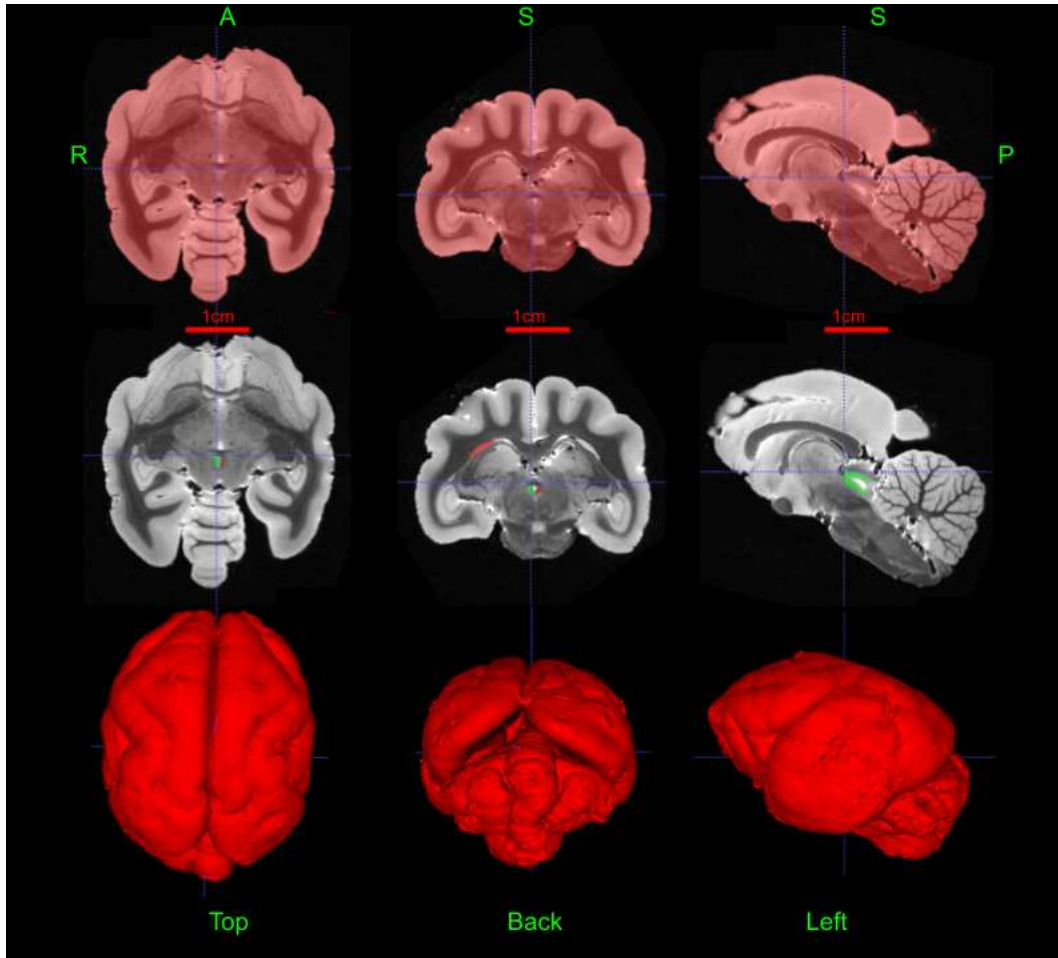


Figure 25 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de maki catta superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin

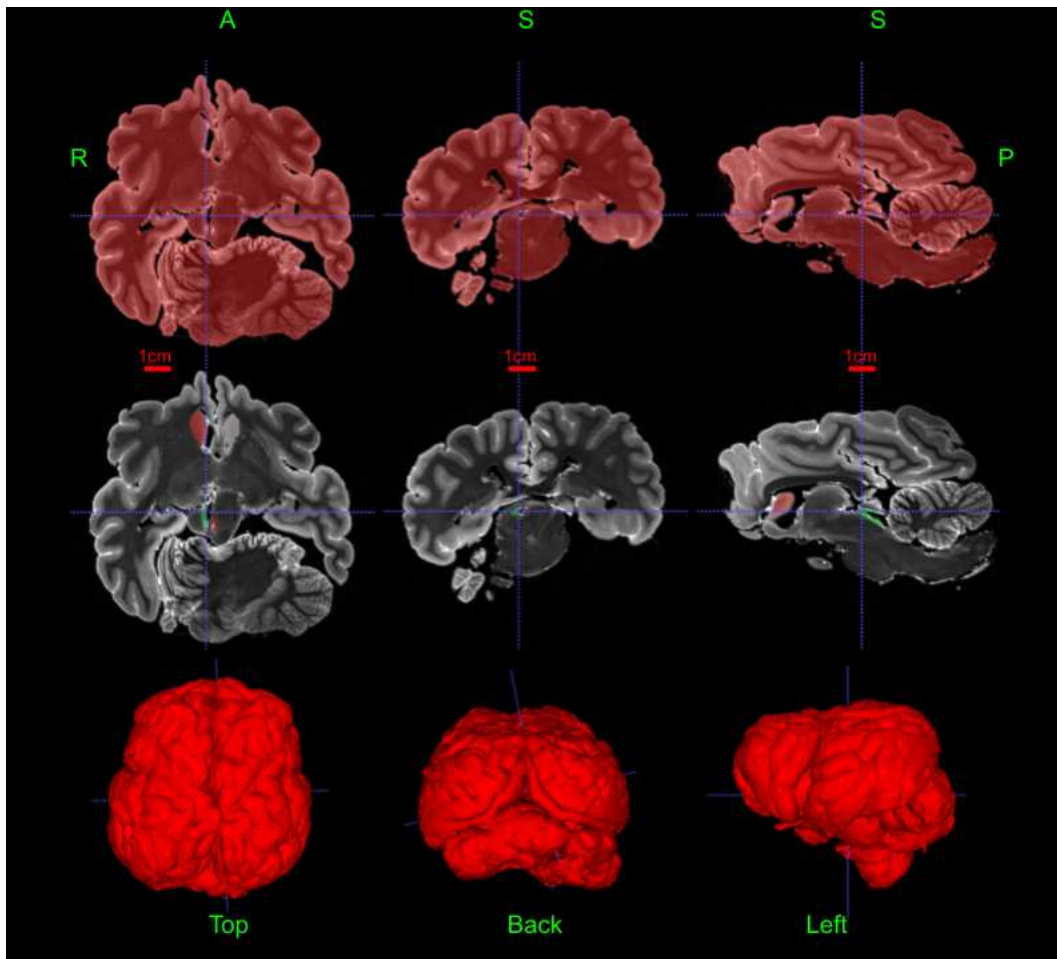


Figure 26 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale d'otarie superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 7 Tesla à NeuroSpin.

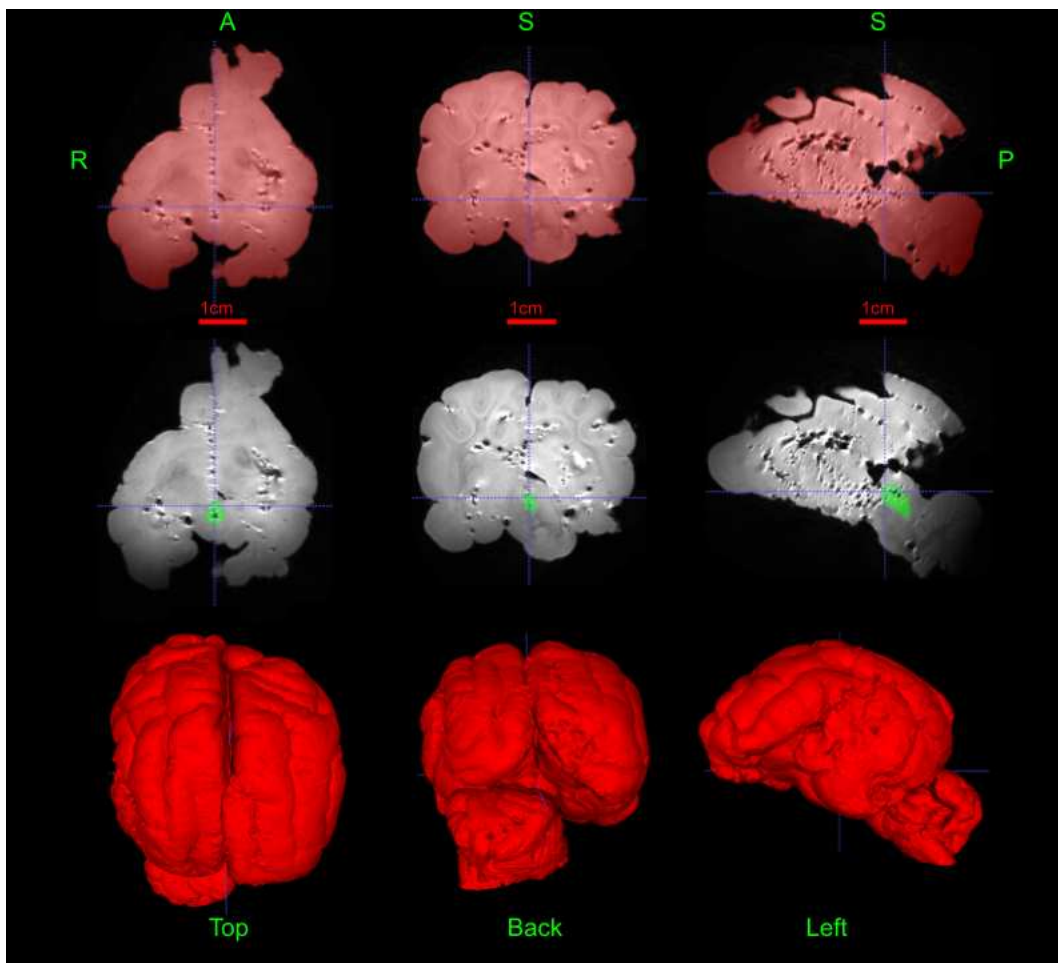


Figure 27 : Coupes axiales (gauche), coronales (milieu) et sagittales (droite) d'un encéphale de tigre superposées avec le masque cérébrale (en haut) et les régions d'intérêt (au milieu) focalisées sur la PAG (en vert). La rangée du bas présente la reconstruction 3D du masque cérébral. A = Avant, S = Supérieur, P = Postérieur, R = Hémisphère droit. Images acquises avec un scanner IRM 11.7 Tesla à NeuroSpin

Quelle que soit l'espèce considérée, la forme du noyau caudé comme celle de la PAG sont très similaires. L'examen des volumes relatifs de ces structures (Tableau 3) suggère que la PAG occupe un volume dans l'encéphale plus petit que le noyau caudé chez toutes les espèces. Chez le tigre et le jaguar, la PAG occupe un volume environ deux fois plus petit que le noyau caudé. Pour le bongo et le cerf souris, les volumes occupés par la PAG et le noyau caudé sont relativement égaux. Chez le maki catta et l'otarie, le volume occupé par la PAG semble être cinq fois plus petit. Suite à ces observations, il semble donc que le volume occupé par la PAG et par le noyau caudé diffère selon les espèces étudiées.

Animal	Volume de l'encéphale (mm ³)	Volume de la PAG (mm ³)	Volume du noyau caudé (mm ³)	% du volume de la PAG en fonction du volume de l'encéphale	% du volume du noyau caudé en fonction du volume de l'encéphale
Bongo	353600	704,5	993,65	0,199	0,281
Maki catta	25590	22,55	198,9	0,088	0,777
Cerf souris	12080	57,68	63,48	0,477	0,525
Otarie	377800	214,1	2157,5	0,057	0,571
Tigre	52680	106,6	303,15	0,202	0,575
Jaguar	56280	153,18	271,1	0,272	0,482

Tableau 3 : Récapitulatif du volume de l'encéphale, de la PAG, du noyau caudé ainsi que du pourcentage du volume de la PAG et du noyau caudé en fonction du volume de l'encéphale pour chaque espèce

IV. Améliorations de la préparation des pièces anatomiques

1. Gestion des prélèvements

Dans les spécimens présentés ici, tous les encéphales ont été extraits de la boîte crânienne pour être immergés directement dans le formol. Cette manière de procéder rend la manipulation des tissus compliquée de par leur fragilité. En effet, lors de l'extraction, la boîte crânienne est découpée avec un craniotomie (petite scie circulaire) qui selon l'épaisseur du crâne de l'individu peut engendrer des lésions sur l'encéphale (« coup de scie »). Par ailleurs, l'encéphale est prélevé sans être fixé par perfusion (cf. modalité de prélèvement des encéphales de caille), ce qui le fragilise d'autant plus notamment lorsqu'il est placé dans le contenant pour la fixation. A cette étape, l'encéphale peut être déformé (cas de l'otarie) en prenant par exemple la forme de son contenant. Enfin, la fragilité du tissu « frais » rend sa manipulation délicate, les différentes parties de l'encéphale pouvant être séparés lors

de l'extraction de la boîte crânienne ou de l'immersion dans le formol (cas du *sitatunga* non présenté ici).

Afin d'améliorer cette étape cruciale, il a été décidé de ne plus extraire les encéphales des têtes et de réaliser une fixation sur les têtes dépecées. Cela permet de maintenir le tissu en place dans la boîte crânienne. Cette nouvelle méthode de fixation est toujours en cours de validation, puisqu'elle pose également des problèmes de fixation, le liquide ne parvenant pas forcément à rentrer parfaitement dans les tissus. La solution idéale serait de réaliser des perfusions pour réaliser une fixation optimale. Cependant, cette technique demanderait des aménagements ainsi qu'une certification des bâtiments pour la sécurité des personnels et de l'environnement.

2. Préparation des pièces pour acquisition :

Lors des segmentations des régions anatomiques des IRMs acquises *ex vivo* (cailles et animaux issus de la faune sauvage), nous avons été confrontés à la difficulté de segmenter le système ventriculaire. Ce dernier contient le liquide cébrospinal qui présente un contraste noir sur des images pondérées en T_1 et acquises *in vivo*. Sur les images acquises *ex vivo*, en pondération T_2 , le système ventriculaire présente un contraste noir ou blanc, cette différence étant liée à la présence ou non d'air dans les ventricules. L'air peut pénétrer dans les ventricules lors du prélèvement, lors du rinçage des pièces anatomiques ou lors du transfert des pièces dans le milieu d'acquisition (fluorinert®). La présence de la boîte crânienne n'empêche pas la pénétration de l'air dans les ventricules qui se vident probablement de leur contenu lors des manipulations successives. Nous l'avons constaté pour la segmentation du template de l'encéphale de caille, avec des prises de contraste totalement différentes pour le ventricule latéral entre deux coupes successives.

Confrontés au même problème avec les pièces anatomiques humaines, nos partenaires du laboratoire d'anatomie (*iBrain*, Inserm) ont mis en place un système d'agitation sous vide pour les bains de fixation, de rinçage ou d'immersion dans le tampon d'acquisition. De cette manière, la pénétration des liquides dans le système ventriculaire est améliorée, ce qui garantit une prise de contraste homogène.

V. Perspectives

Sur les images actuelles, nous allons poursuivre la segmentation de structures clés comme l'hippocampe, l'amygdale et extraire pour chacune de ces structures les tractogrammes. Le recalage

de ces tractogrammes sur les images anatomiques permettra d'identifier les structures auxquelles sont connectés le noyau caudé, la PAG, l'hippocampe et l'amygdale. En comparant qualitativement ces connexions, nous chercheront s'il existe des spécificités selon les classes de mammifères étudiées. D'un point de vue plus quantitatif, nous pourrions évaluer la densité de ces connexions en recherchant le nombre de fibres entre deux structures par exemple.

A plus long terme, sur la base des pièces disponibles, nous appliquerons le protocole de préparation des pièces anatomiques afin d'améliorer la prise de contraste à l'acquisition. En priorité, nous traiterons les pièces issues d'herbivores pour lesquelles nous disposons de plusieurs spécimens d'une même espèce. Nous pourrions poursuivre notre travail comparatif en incluant le modèle ovin pour lequel nous disposons déjà de données de connectivités.

Discussion – Conclusion générale

Tout au long de ces travaux de thèse, nous avons testé l'influence de la sélection génétique, de l'expérience précoce et de la phylogénie sur la plasticité anatomique des régions impliquées dans les comportements adaptatifs.

L'étude sur les cailles japonaises a permis de mettre en évidence l'influence de la sélection génétique sur la morphologie anatomique de régions impliquées dans les processus sensoriels et émotionnels. Cette étude ayant été menée sur des individus à maturité sexuelle, il serait intéressant d'étudier la trajectoire développementale de ces différences morphologiques pour comprendre à quel moment elles apparaissent (*in ovo*, à la naissance ou au début de la maturation sexuelle). De plus, des acquisitions en IRMd ayant été réalisées, la prochaine étape est de réaliser des cartes de connectivité pour étudier l'impact de la sélection génétique sur la connectivité, en particulier des régions dont on sait que la morphologie est impactée.

L'étude sur la diffusion de musique chez des agneaux en allaitement artificiel a permis de mettre en évidence l'influence de l'expérience sur la morphologie cérébrale du noyau caudé et du noyau géniculé médial. D'autres régions telles que l'hypophyse restent à étudier. Au cours de cette étude, des acquisitions en IRMd et en IRMf ont été réalisées et restent à analyser. Grâce à ces acquisitions, nous allons pouvoir étudier l'impact de l'expérience précoce sur la connectivité anatomique et plus particulièrement l'impact de la diffusion de musique sur la connectivité anatomique de régions impliquées dans les processus auditifs (par exemple, le noyau géniculé médial) mais aussi dans les processus émotionnels (par exemple, la PAG). L'hypothèse est que la musique a stimulé le développement des connexions entre ces régions cérébrales, ce qui pourrait se manifester par un plus grand nombre de fibres. Nous allons également pouvoir étudier l'impact de la diffusion précoce de musique sur le fonctionnement cérébral. L'analyse du resting state va permettre de localiser précisément le cortex auditif dans le cerveau de mouton. L'analyse des stimulations auditives va permettre de comprendre si la musique a modifié l'activité de certaines régions cérébrales. Pour aller plus loin dans l'étude de l'influence de l'expérience précoce, il serait intéressant de comparer nos images acquises chez des animaux en allaitement maternel avec des images acquises chez des animaux maternés.

Les premiers résultats comparatifs obtenus pour tester l'hypothèse phylogénie sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature : l'existence d'une relation linéaire entre volume et poids de l'encéphale, même chez des individus juvéniles dont l'encéphale est encore immature. Pour aller plus loin dans l'étude de ces encéphales, il serait intéressant de segmenter d'autres régions telles que

l'hippocampe ou le thalamus. Cependant, comme expliqué précédemment, cette segmentation ne sera pas possible pour tous les individus à cause du manque de contraste et de la torsion de certains encéphales. Pour les spécimens imagés, des acquisitions en IRM ont également été réalisées, il serait donc intéressant d'exploiter les connectomes de ces animaux et de les comparer entre eux. L'idée est de voir si la connectivité de certaines régions telles que la PAG est la même selon que l'animal soit une proie ou un prédateur mais aussi un carnivore ou un herbivore. En effet, les stratégies d'adaptations comportementales diffèrent selon les individus. Il serait intéressant de voir si cela se traduit au niveau cérébral par une différence de connectivité au niveau des régions impliquées dans ces comportements. Pour aller plus loin, il faut continuer à imaginer les spécimens mis à notre disposition et en priorité les espèces dont on possède plusieurs individus (par exemple, le cerf souris), cela permettrait de réaliser une étude plus exploratoire des cerveaux.

Au cours de cette thèse, une place importante a été donnée à la médiation scientifique et aux sciences participatives notamment grâce à la mise en place des ateliers Ciboulot au collège André Bauchant de Château-Renault mais aussi grâce à la participation à différents événements tels que la Fête de la science, la Semaine du cerveau ou encore le Salon international de l'agriculture. Ce partage de connaissances avec un public non scientifique est à la fois enrichissant pour le public mais également pour le scientifique. En effet, les personnes qui assistent à ces événements ou les élèves qui participent aux ateliers sont des personnes en demande de connaissances. De part leurs questions, ils permettent de voir nos recherches sous un nouvel angle. Bien que très chronophages, les ateliers Ciboulot semblent avoir apporté beaucoup aux participants, tant aux professeurs qu'aux élèves. Les élèves ont pu acquérir des bases solides en neurosciences. Ces ateliers se déroulant en petits groupes, ils ont également permis d'inclure avec succès des élèves en difficulté scolaire. La situation sanitaire n'a malheureusement pas permis d'aller au bout de ce projet qui avait pour but la réalisation d'un épisode de WebRadio sur les neurosciences animé par les élèves ainsi que la création d'un escape game.

Cette thèse a permis de montrer que les systèmes sensoriels et plus généralement l'étape de perception de l'environnement social et physique ne doivent pas être négligés lors de l'étude des stratégies d'adaptation comportementale. En effet, ces différentes stratégies d'adaptation comportementale pourraient aussi avoir comme origine une différence au niveau de la perception de l'environnement.

Cette thèse a également permis de montrer l'importance de l'environnement physique dans le développement des agneaux élevés en allaitement artificiel. Les facteurs d'enrichissement utilisés pour contrecarrer les effets délétères de cet allaitement artificiel pourraient ne pas avoir le même

impact selon l'âge de l'animal. Par exemple, il semble que la musique n'ait pas le même effet en fonction de l'âge des agneaux : les jeunes agneaux sont-ils moins sensibles à la musique que les agneaux plus âgés ?

Cette thèse a également permis de montrer l'importance d'étudier la morphologie des systèmes cérébraux et leurs relations anatomiques dans leur ensemble. En effet, ce sont des systèmes dynamiques qui font intervenir de façon successive de nombreux paramètres, il est donc important de prendre en compte tous ces paramètres pour comprendre un phénomène tel que les stratégies d'adaptation comportementale.

Références bibliographiques

- Agreste. (2021). Agreste, la statistique agricole. <https://agreste.agriculture.gouv.fr/>
- Alliss. (2017). *Prendre au sérieux la société de la connaissance, Livre blanc* (Immerso).
- Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A Framework for Studying Emotions across Species. *Cell*, 157(1), 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.003>
- Assaf, Y., Alexander, D. C., Jones, D. K., Bizzi, A., Behrens, T. E. J., Clark, C. A., Cohen, Y., Dyrby, T. B., Huppi, P. S., Knösche, T. R., LeBihan, D., Parker, G. J. M., & Poupon, C. (2013). The CONNNECT project : Combining macro- and micro-structure. *NeuroImage*, 80, 273-282. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.055>
- Bandler, R., Keay, K. A., Floyd, N., & Price, J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. Passive emotional coping. *Brain Research Bulletin*, 53(1), 95-104. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00313-0)
- Barson, J. R., Mack, N. R., & Gao, W.-J. (2020). The Paraventricular Nucleus of the Thalamus Is an Important Node in the Emotional Processing Network. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 598469. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.598469>
- Benarroch, E. E. (2012). Periaqueductal gray : An interface for behavioral control. *Neurology*, 78(3), 210-217. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdde>
- Benmhammed, H., El Hayek, S., Berkik, I., Elmostafi, H., Bousalham, R., Mesfioui, A., Ouichou, A., & El Hessni, A. (2019). Animal Models of Early-Life Adversity. In F. H. Kobeissy (Éd.), *Psychiatric Disorders* (Vol. 2011, p. 143-161). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7_10
- Berridge, K. C. (2003). Pleasures of the brain. *Brain and Cognition*, 52(1), 106-128. [https://doi.org/10.1016/S0278-2626\(03\)00014-9](https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00014-9)
- Bindra, D. (1970). Emotion and behavior theory : Current research in historical perspective. In *Physiological correlates of emotion*. Academic Press.

- Biro, P. A., & Stamps, J. A. (2008). Are animal personality traits linked to life-history productivity? *Trends in Ecology & Evolution*, 23(7), 361-368. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.003>
- Boissy, A., Arnould, C., Chaillou, E., Colson, V., Desire, L., Duvaux-Ponter, C., Greiveldinger, L., Leterrier, C., Richard, S., Roussel, S., Saint-Dizier, H., Meunier-Salaün, M. C., & Valance, D. (2007). Émotions et cognition : Stratégie pour répondre à la question de la sensibilité des animaux. *INRAE Productions Animales*, 20(1), 17-22. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2007.20.1.3428>
- Bongo. (2021). ZooSafari de Thoiry. <https://www.thoiry.net/les-animaux/bongo>
- Bongo (animal)—Wikipédia. (2021). Fr.wikipedia.org. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Bongo_\(animal\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Bongo_(animal))
- Bongo : Fiche descriptive complète + photos. (2019). Instinct Animal. <https://www.instinct-animal.fr/bongo/>
- Brunet, L., Coquil, X., & Trommenschlager, JM. (2016). *Nurses to breed replacement calves : An innovation combining work decrease and animal performances*. 1.
- Brus, M., Meurisse, M., Keller, M., & Lévy, F. (2014). Interactions with the young down-regulate adult olfactory neurogenesis and enhance the maturation of olfactory neuroblasts in sheep mothers. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00053>
- Cairns, R. B. (1966). Attachment behavior of mammals. *Psychological Review*, 73(5), 409-426. <https://doi.org/10.1037/h0023691>
- Calandreau, L., Desmedt, A., Decorte, L., & Jaffard, R. (2005). A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learning & Memory*, 12(4), 383-388. <https://doi.org/10.1101/lm.92305>

- Canario, L., Mignon-Grasteau, S., Dupont-Nivet, M., & Phocas, F. (2013). Genetics of behavioural adaptation of livestock to farming conditions. *Animal*, 7(3), 357-377.
<https://doi.org/10.1017/S1751731112001978>
- Cerf-souris – Tragulus kanchil*. (2021). ASCPF. <https://www.ascpf.fr/documentaires/a-la-decouverte-dune-espece/cerf-souris-tragulus-kanchil/>
- Chaillou, E., Tillet, Y., & Andersso, F. (2012). MRI Techniques and New Animal Models for Imaging the Brain. In T. Mantamadiotis (Éd.), *When Things Go Wrong—Diseases and Disorders of the Human Brain*. InTech. <https://doi.org/10.5772/35834>
- Cook, C. J. (2001). Measuring of extracellular cortisol and corticotropin-releasing hormone in the amygdala using immunosensor coupled microdialysis. *Journal of Neuroscience Methods*, 110(1-2), 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(01\)00421-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(01)00421-6)
- Cook, C. J. (2002). Glucocorticoid feedback increases the sensitivity of the limbic system to stress. *Physiology & Behavior*, 75(4), 455-464. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00650-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00650-9)
- Coulon, M., Nowak, R., Andanson, S., Ravel, C., Marnet, P. G., Boissy, A., & Boivin, X. (2013). Human–lamb bonding : Oxytocin, cortisol and behavioural responses of lambs to human contacts and social separation. *Psychoneuroendocrinology*, 38(4), 499-508.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.07.008>
- Csillag, A., Kabai, P., & Kovach, J. (1995). Effects of diencephalic lesions on approach responses and color preferences in quail. *Physiology & Behavior*, 58(4), 659-667.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)00113-W](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)00113-W)
- da Costa, A. P., Leigh, A. E., Man, M.-S., & Kendrick, K. M. (2004). Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1552), 2077-2084. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2831>

- Dantzer, R. (2002). *Les émotions: Vol. 3e éd.* (Numéro 2380). Presses Universitaires de France; Cairn.info. <https://www.cairn.info/les-emotions--9782130527718.htm>
- Darwin, C. (1872). *The expression of the emotions in man and animals*. 10.1037/10001-000
- Deoni, S., Dean, D. C., Piryatinsky, I., O’Muircheartaigh, J., Waskiewicz, N., Lehman, K., Han, M., & Dirks, H. (2013). Breastfeeding and early white matter development : A cross-sectional study. *NeuroImage*, 82, 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.090>
- Deoni, S., Dean, D., Joelson, S., O’Regan, J., & Schneider, N. (2018). Early nutrition influences developmental myelination and cognition in infants and young children. *NeuroImage*, 178, 649-659. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.056>
- Dicke, U., & Roth, G. (2016). Neuronal factors determining high intelligence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1685), 20150180. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0180>
- Dingemanse, N. J., Kazem, A. J. N., Réale, D., & Wright, J. (2010). Behavioural reaction norms : Animal personality meets individual plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.07.013>
- Evans, E. F. (1992). Auditory processing of complex sounds : An overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 336(1278), 295-306. <https://doi.org/10.1098/rstb.1992.0062>
- Fahmy, M. H., & Robert, S. (1997). Ewe and lamb behaviour at parturition in prolific and non-prolific sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 77(1), 9-15. <https://doi.org/10.4141/A96-014>
- Franzmann, A. W., & Geist, V. (1972). Mountain Sheep : A Study in Behavior and Evolution. *The Journal of Wildlife Management*, 36(2), 673. <https://doi.org/10.2307/3799115>
- Gaudin, S. (2015). *Attachement chez l’agneau : Approches comportementale, physiologique et neurobiologique*. Tours.

- Gaudin, S., Chaillou, E., Wycke, M.-A., Cornilleau, F., Moussu, C., Calandreau, L., Lainé, A.-L., & Nowak, R. (2018). All bonds are not alike : A psychoendocrine evaluation of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, *60*(1), 90-103.
<https://doi.org/10.1002/dev.21552>
- Gentle, M. J., Jones, R. B., & Woolley, S. C. (1989). Physiological changes during tonic immobility in *Gallus gallus* var *domesticus*. *Physiology & Behavior*, *46*(5), 843-847.
[https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90046-2)
- Harlow, H. F. (1959). *Affectional Responses in the Infant Monkey*. 130, 12.
- Herculano-Houzel, S. (2011). Not All Brains Are Made the Same : New Views on Brain Scaling in Evolution. *Brain, Behavior and Evolution*, *78*(1), 22-36. <https://doi.org/10.1159/000327318>
- Herculano-Houzel, S. (2019). Life history changes accompany increased numbers of cortical neurons : A new framework for understanding human brain evolution. In *Progress in Brain Research* (Vol. 250, p. 179-216). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2019.06.001>
- Houdé, O., Mazoyer, B., & Tzourio-Mazoyer, N. (2002). *Cerveau et psychologie* (Première édition). Presses Universitaires de France.
- Howell, S., Schwandt, M., Fritz, J., Roeder, E., & Nelson, C. (2003). A Stereo Music System as Environmental Enrichment for Captive Chimpanzees. *Lab Animal*, *32*(10), 31-36.
<https://doi.org/10.1038/labani1103-31>
- INRAE. (2017). *Charte des sciences et recherches participatives en France*.
- Jaguar : Description du félin d'Amérique du Sud + photos*. (2021). Instinct Animal.
<https://www.instinct-animal.fr/jaguar/>
- Jaguar—Wikipédia*. (2021). Fr.wikipedia.org. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Jaguar>
- Jones, R. (1992). Fear and distress in Japanese quail chicks of two lines genetically selected for low or high adrenocortical response to immobilization stress*1. *Hormones and Behavior*, *26*(3), 385-393. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(92\)90008-J](https://doi.org/10.1016/0018-506X(92)90008-J)

- Jones, R. B., Mills, A. D., & Faure, J.-M. (1991). Genetic and Experiential Manipulation of Fear-Related Behavior in Japanese Quail Chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Comparative Psychology*, *105*(1), 15-24.
- Katajamaa, R., & Jensen, P. (2020). Selection for reduced fear in red junglefowl changes brain composition and affects fear memory. *Royal Society Open Science*, *7*(8), 200628.
<https://doi.org/10.1098/rsos.200628>
- Keay, K. A., & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *25*(7-8), 669-678.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00049-5)
- Keller, M., & Lévy, F. (2012). The main but not the accessory olfactory system is involved in the processing of socially relevant chemosignals in ungulates. *Frontiers in Neuroanatomy*, *6*.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00039>
- Kendrick, K. M., & Baldwin, B. A. (1987). Cells in Temporal Cortex of Conscious Sheep Can Respond Preferentially to the Sight of Faces. *Science*, *236*(4800), 448-450.
<https://doi.org/10.1126/science.3563521>
- Kirouac, G. (2004). *Cognition et émotions*. Les presses de l'université Laval.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W., & Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals : Current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *23*(7), 925-935. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00026-3](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00026-3)
- Kraimi, N., Calandreau, L., Zemb, O., Germain, K., Dupont, C., Velge, P., Guitton, E., Lavillatte, S., Parias, C., & Leterrier, C. (2019). Effects of a gut microbiota transfer on emotional reactivity in Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Journal of Experimental Biology*, *jeb.202879*. <https://doi.org/10.1242/jeb.202879>

- Landgraf, Wigger, Holsboer, & Neumann. (1999). Hyper-Reactive Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis in Rats Bred for High Anxiety-Related Behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, *11*(6), 405-407. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00342.x>
- Latham, N. R., & Mason, G. J. (2008). Maternal deprivation and the development of stereotypic behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, *110*(1-2), 84-108. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.026>
- Le Bihan, D. (2003). Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(6), 469-480. <https://doi.org/10.1038/nrn1119>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 155-184.
- Lee, W., Lee, S. D., Park, M. Y., Foley, L., Purcell-Estabrook, E., Kim, H., & Yoo, S.-S. (2015). Functional and diffusion tensor magnetic resonance imaging of the sheep brain. *BMC Veterinary Research*, *11*(1), 262. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0581-8>
- Lémur catta*—Wikipédia. (2021). [Fr.wikipedia.org](https://fr.wikipedia.org/wiki/Lémur_catta). https://fr.wikipedia.org/wiki/Lémur_catta
- Lent, P. C. (1974). *Mother-Infant Relationships in Ungulate. 1*.
- Leventhal, H., & Patrick-Miller, L. (2000). Emotions and physical illness : Causes and indicators of vulnerability. In *Handbook of emotions*. Guilford Press.
- Lévy, F., Batailler, M., Meurisse, M., & Migaud, M. (2017). Adult Neurogenesis in Sheep : Characterization and Contribution to Reproduction and Behavior. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 570. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00570>
- Lévy, F., Locatelli, A., Piketty, V., Tillet, Y., & Poindron, P. (1995). Involvement of the main but not the accessory olfactory system in maternal behavior of primiparous and multiparous ewes. *Physiology & Behavior*, *57*(1), 97-104. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00200-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00200-0)
- Li, J., Li, X., Liu, H., Li, J., Han, Q., Wang, C., Zeng, X., Li, Y., Ji, W., Zhang, R., & Bao, J. (2021). Effects of music stimulus on behavior response, cortisol level, and horizontal

- immunity of growing pigs. *Journal of Animal Science*, 99(5), skab043.
<https://doi.org/10.1093/jas/skab043>
- Li, X., Zhao, J. N., Zhao, P., Zhang, X., Bi, Y. J., Li, J. H., Liu, H. G., Wang, C., & Bao, J. (2019). Behavioural responses of piglets to different types of music. *Animal*, 13(10), 2319-2326.
<https://doi.org/10.1017/S1751731119000260>
- Ligout, S., & Porter, R. H. (2004). Effect of maternal presence on the development of social relationships among lambs. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(1-2), 47-59.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.03.010>
- Linnman, C., Moulton, E. A., Barmettler, G., Becerra, L., & Borsook, D. (2012). Neuroimaging of the periaqueductal gray : State of the field. *NeuroImage*, 60(1), 505-522.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.095>
- Lion de mer de Californie : Description + photos*. (2019). Instinct Animal. <https://www.instinct-animal.fr/lion-de-mer-de-californie/>
- Lormant, F., Cornilleau, F., Constantin, P., Meurisse, M., Lansade, L., Leterrier, C., Lévy, F., & Calandreau, L. (2018). A trait for a high emotionality favors spatial memory to the detriment of cue-based memory in Japanese quail. *Behavioural Processes*, 157, 256-262.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.10.006>
- Love, S. A., Haslin, E., Bellardie, M., Andersson, F., Barantin, L., Filipiak, I., Adriaensen, H., Fazekas, Cs. L., Leroy, L., Zelena, D., Morisse, M., Elleboudt, F., Moussu, C., Lévy, F., Nowak, R., & Chaillou, E. (2021). Maternal deprivation and milk replacement affect the integrity of gray and white matter in the developing lamb brain. *Zenodo*.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.4714659>
- Main, M. B., Weckerly, F. W., & Bleich, V. C. (1996). Sexual Segregation in Ungulates : New Directions for Research. *Journal of Mammalogy*, 77(2), 449-461.
<https://doi.org/10.2307/1382821>

- Maki Catta. (2021). ZooSafari de Thoiry. <https://www.thoiry.net/les-animaux/maki-catta>
- McIntosh, G. H., Baghurst, K. I., Potter, B. J., & Hetzel, B. S. (1979). Foetal Brain Development in the Sheep. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 5(2), 103-114.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1979.tb00664.x>
- Menant, O., Destrez, A., Deiss, V., Boissy, A., Delagrangé, P., Calandreau, L., & Chaillou, E. (2016). *Régulation des émotions chez l'animal d'élevage : Focus sur les acteurs neurobiologiques*. 14.
- Menant, O., Prima, M.-C., Morisse, M., Cornilleau, F., Moussu, C., Gautier, A., Blanchon, H., Meurisse, M., Delagrangé, P., Tillet, Y., & Chaillou, E. (2018). First evidence of neuronal connections between specific parts of the periaqueductal gray (PAG) and the rest of the brain in sheep : Placing the sheep PAG in the circuit of emotion. *Brain Structure and Function*, 223(7), 3297-3316. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1689-y>
- Meurisse, M., Chaillou, E., & Lévy, F. (2009). Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 37(2), 87-97.
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2008.09.001>
- Michaloudi, H., Karamanlidis, A. N., Dinopoulos, A., Papadopoulos, G., & Antonopoulos, J. (1986). Thalamic projections to the posterior sylvian and posterior ectosylvian gyri of the sheep brain, revealed with the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anatomy and Embryology*, 175(1), 77-90. <https://doi.org/10.1007/BF00315458>
- Mignon-Grasteau, S., Boissy, A., Bouix, J., Faure, J.-M., Fisher, A. D., Hinch, G. N., Jensen, P., Le Neindre, P., Mormède, P., Prunet, P., Van de Putte, M., & Beaumont, C. (2005). Genetics of adaptation and domestication in livestock. *Livestock Production Science*, 93(1), 3-14.
<https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.11.001>

- Miguel, P. M., Pereira, L. O., Silveira, P. P., & Meaney, M. J. (2019). Early environmental influences on the development of children's brain structure and function. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *61*(10), 1127-1133. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14182>
- Mills, A., Crawford, L., Domjan, M., & Faure, J. (1997). The behavior of the japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *21*(3), 261-281. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00028-0)
- Mills, A. D., & Faure, J.-M. (1991). Divergent Selection for Duration of Tonic Immobility and Social Reinstatement Behavior in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Chicks. *Journal of Comparative Psychology*, *105*(1).
- Mitkus, M., Potier, S., Martin, G. R., Duriez, O., & Kelber, A. (2018). Raptor Vision. In M. Mitkus, S. Potier, G. R. Martin, O. Duriez, & A. Kelber, *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.232>
- Mota, B., Dos Santos, S. E., Ventura-Antunes, L., Jardim-Messeder, D., Neves, K., Kazu, R. S., Noctor, S., Lambert, K., Bertelsen, M. F., Manger, P. R., Sherwood, C. C., Kaas, J. H., & Herculano-Houzel, S. (2019). White matter volume and white/gray matter ratio in mammalian species as a consequence of the universal scaling of cortical folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(30), 15253-15261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716956116>
- Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors : Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(19), 7212. <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>
- Nowak, R. (1999). *Comportement animal et bien-être*. Centre National de Promotion Rurale.

- Nowak, R., Chaillou, E., Gaudin, S., Guesdon, V., Lévy, F., & Lille, I. (2016). *Diversité des relations affiliatives chez les ovins en situation d'élevage : Mécanismes comportementaux et neurobiologiques*. 12.
- Nowak, R., Murphy, T. M., Lindsay, D. R., Alster, P., Andersson, R., & S-Moberg, K. U. (1997). Development of a Preferential Relationship With the Mother by the Newborn Lamb : Importance of the Sucking Activity. *Physiology & Behavior*, 62(4), 681-688.
- Nowak, R., & Poindron, P. (2006). From birth to colostrum : Early steps leading to lamb survival. *Reproduction Nutrition Development*, 46(4), 431-446. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006023>
- Otarie de Californie—Wikipédia. (2021). [Fr.wikipedia.org](https://fr.wikipedia.org).
https://fr.wikipedia.org/wiki/Otarie_de_Californie
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : Closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(3), 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Perret, G. (1986). *Races ovines*. ITOVIC.
- Poindron, P., Lévy, F., & Nowak, R. (2007). *Comportement de la mère et du nouveau-né chez les mammifères : Mécanismes d'activation*. 16.
- Pryce, C. R. (1994). Determinants of Motherhood in Human and Nonhuman Primates—A Biosocial Model. *3rd Schultz-Biegert Symposium*, 1-15.
- Réale, D., Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T., & Dingemans, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, 82(2), 291-318. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00010.x>
- Reite, M., Short, R., & Seiler, C. (1978). Physiological correlates of maternal separation in surrogate-reared infants : A study in altered attachment bonds. *Developmental Psychobiology*, 11(5), 427-435. <https://doi.org/10.1002/dev.420110507>

- Rolls, E. T. (2000). The brain and emotion. *Behavioral and Brain Sciences*, 23(2), 177-191.
<https://doi.org/10.1017/S0140525X00002429>
- Rovee, C. K., & Luciano, D. P. (1973). Rearing influences on tonic immobility in three-day-old chicks (*Gallus gallus*). *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 83(2), 351-354. <https://doi.org/10.1037/h0034429>
- Ruckstuhl, K. E., & Neuhaus, P. (2002). Sexual segregation in ungulates : A comparative test of three hypotheses. *Biological Reviews*, 77(1), 77-96.
<https://doi.org/10.1017/S1464793101005814>
- Saint-Dizier, H., Constantin, P., Davies, D. C., Leterrier, C., Lévy, F., & Richard, S. (2009). Subdivisions of the arcopallium/posterior pallial amygdala complex are differentially involved in the control of fear behaviour in the Japanese quail. *Brain Research Bulletin*, 79(5), 288-295. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.03.004>
- Saint-Dizier, H., Lévy, F., & Ferreira, G. (2007). Influence of the mother in the development of flavored-food preference in lambs. *Developmental Psychobiology*, 49(1), 98-106.
<https://doi.org/10.1002/dev.20197>
- Schack-Nielsen, L., & Michaelsen, K. F. (2007). Advances in Our Understanding of the Biology of Human Milk and Its Effects on the Offspring. *The Journal of Nutrition*, 137(2), 503S-510S.
<https://doi.org/10.1093/jn/137.2.503S>
- Schweitzer, C., Poindron, P., & Arnould, C. (2009). Social motivation affects the display of individual discrimination in young and adult japanese quail(*Coturnix japonica*). *Developmental Psychobiology*, 51(4), 311-321. <https://doi.org/10.1002/dev.20370>
- Sèbe, F., Aubin, T., Boué, A., & Poindron, P. (2008). Mother–young vocal communication and acoustic recognition promote preferential nursing in sheep. *Journal of Experimental Biology*, 211(22), 3554-3562. <https://doi.org/10.1242/jeb.016055>

- Sèbe, F., Nowak, R., Poindron, P., & Aubin, T. (2007). Establishment of vocal communication and discrimination between ewes and their lamb in the first two days after parturition. *Developmental Psychobiology*, 49(4), 375-386. <https://doi.org/10.1002/dev.20218>
- Serratrice, G. (2005). Émotion et émotions. *EMC - Neurologie*, 2(2), 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.emcn.2004.09.006>
- Sheep Breeds*. (2021). <http://afs.okstate.edu/breeds/sheep/>
- Shillito Walser, E., & Williams, T. (1986). Pair-association in twin lambs before and after weaning. *Applied Animal Behaviour Science*, 15(3), 241-245. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(86\)90094-8](https://doi.org/10.1016/0168-1591(86)90094-8)
- Sitatunga (guib d'eau) : Description + photos*. (2019). Instinct Animal. <https://www.instinct-animal.fr/sitatunga/>
- Sitatunga—Wikipédia*. (2021). [Fr.wikipedia.org](https://fr.wikipedia.org/wiki/Sitatunga). <https://fr.wikipedia.org/wiki/Sitatunga>
- Suomi, S. J. (1997). Early determinants of behaviour : Evidence from primate studies. *British Medical Bulletin*, 53(1), 170-184. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011598>
- Šuta, D., Popelář, J., & Syka, J. (2008). Coding of communication calls in the subcortical and cortical structures of the auditory system. *Physiological Research*, S149-S159. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931608>
- Tendler, B. C., Hanayik, T., Ansorge, O., Bangerter-Christensen, S., Berns, G. S., Bertelsen, M. F., Bryant, K. L., Foxley, S., van den Heuvel, M. P., Howard, A. F. D., Huszar, I., Khrapitchev, A. A., Leonte, A., Manger, P. R., Menke, R. A. L., Mollink, J., Mortimer, D., Pallegage-Gamarallage, M., Roumazeilles, L., ... Miller, K. L. (2021). *The Digital Brain Bank, an open access platform for post-mortem datasets* [Preprint]. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/2021.06.21.449154>

- Thompson, R. K. R., Foltin, R. W., Boylan, R. J., Sweet, A., Graves, C. A., & Lowitz, C. E. (1981). Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. *Animal Learning & Behavior*, 9(1), 145-149. <https://doi.org/10.3758/BF03212037>
- Tigre : Description complète du félin + photos. (2020). Instinct Animal. <https://www.instinct-animal.fr/tigre/>
- Tigre—Wikipédia. (2021). Fr.wikipedia.org. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Tigre>
- Toro, R., Perron, M., Pike, B., Richer, L., Veillette, S., Pausova, Z., & Paus, T. (2008). Brain Size and Folding of the Human Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex*, 18(10), 2352-2357. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm261>
- Tragulus javanicus—Wikipédia. (2021). Fr.wikipedia.org. https://fr.wikipedia.org/wiki/Tragulus_javanicus
- Valance, D., Boissy, A., Després, G., Constantin, P., & Leterrier, C. (2007). Emotional reactivity modulates autonomic responses to an acoustic challenge in quail. *Physiology & Behavior*, 90(1), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.09.022>
- Val-Laillet, D., Nowak, R., Giraud, S., Tallet, C., & Boivin, X. (2006). Nonnutritive sucking : One of the major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology*, 48(3), 220-232. <https://doi.org/10.1002/dev.20142>
- Val-Laillet, D., Simon, M., & Nowak, R. (2004). A full belly and colostrum : Two major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology*, 45(3), 163-173. <https://doi.org/10.1002/dev.20024>
- van Bodegom, M., Homberg, J. R., & Henckens, M. J. A. G. (2017). Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00087>

- Ward, L. M. (2013). The thalamus : Gateway to the mind: Gateway to the mind. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 4(6), 609-622.
<https://doi.org/10.1002/wcs.1256>
- Wigger, A., Loerscher, P., Weissenbacher, P., Holsboer, F., & Landgraf, R. (2001). Cross-Fostering and Cross-Breeding of HAB and LAB Rats : A Genetic Rat Model of Anxiety. *Behavior Genetics*, 34(4), 12.
- Zelena, D., Menant, O., Andersson, F., & Chaillou, E. (2018). Periaqueductal gray and emotions : The complexity of the problem and the light at the end of the tunnel, the magnetic resonance imaging. *Endocrine Regulations*, 52(4), 222-238. <https://doi.org/10.2478/enr-2018-0027>

Plasticité anatomique des régions cérébrales associées aux comportements adaptatifs

Résumé

Face à une situation identique, comme la présence d'un prédateur, les individus d'une même espèce peuvent réagir différemment en fuyant ou attaquant. Ces différentes réactions sont appelées comportements adaptatifs et sont sous le contrôle du cerveau. Pour comprendre le lien entre cerveau et comportements adaptatifs, nous avons mené une étude morphologique par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) sur plusieurs espèces animales dont la caille japonaise, l'agneau et les animaux sauvages. Nos résultats mettent en évidence que la morphologie de certaines régions du cerveau est différente selon les comportements adaptatifs identifiés.

Mots-clés : caille, ovin, cerveau, IRM, comportement

Résumé en anglais

When faced with an identical situation, such as the presence of a predator, individuals of the same species may react differently by fleeing or attacking. These different reactions are called adaptive behaviors and are under the control of the brain. To understand the link between the brain and adaptive behaviors, we conducted a morphological study using Magnetic Resonance Imaging (MRI) on several animal species including Japanese quails, lambs and wild animals. Our results show that the morphology of certain regions of the brain are different depending on the adaptive behaviors identified.

Keywords: quail, sheep, brain, MRI, behavior