

Mémoire réalisé par Charlotte Delage

(sous la tutelle du Dr. Charlotte Cornil)

Etude de l'interaction entre processus neuroimmunologiques et neuroendocriniens dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille japonaise (*Coturnix japonica*)



Travail de fin d'études en vue de l'obtention du grade de master en sciences biologiques des organismes et écologie à finalité approfondie

Remerciements

Ce travail ne saurait être complet sans remercier chaleureusement les nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Je remercie donc tout d'abord le Docteur Charlotte Cornil pour m'avoir épaulée au cours de cette année : sa motivation, sa bonne humeur et ses conseils avisés m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même et je lui en suis reconnaissante. Je tiens ensuite à remercier les membres du laboratoire de Neuroendocrinologie : Dr. Gorbanpor, Dr. Corona, Dr. Mommer, Olesya Shevchouk, Gilles Cornez, Meg-Anne Ceuleers, Vincent Hellier et Marie-Pierre de Bournonville pour m'avoir appris les ficelles du métier tout en me faisant passer d'excellents moments en leur compagnie. Mention supplémentaire à Marie-Pierre pour avoir courageusement gonadectomisé tous mes animaux d'expérience. Mes remerciements vont également à Marianne Fillet et Gwenaël Nys pour avoir accepté de doser mes échantillons, ainsi qu'à Alexandra Pieltain pour m'avoir enseigné l'art de l'immunohistochimie sur lames. Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Nadine pour son soutien indéfectible, Christelle pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée au cours de ces cinq années, Caroline pour ses tentatives aussi nombreuses qu'infructueuses pour me détendre et, enfin, mes parents pour leur soutien financier, leur disponibilité et leur compréhension à l'égard de mon engouement pour une carrière scientifique.

Etude de l'interaction entre processus neuroimmunologiques et neuroendocriniens dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille japonaise (*Coturnix japonica*)

Laboratoire de neuroendocrinologie du comportement du GIGA neurosciences. Promoteur :
Pr. Charlotte Cornil ; Co-promoteur : Pr. Jean-Christophe Plumier.

La mise en place de différences entre les cerveaux mâles et femelles ou différenciation sexuelle du cerveau est un processus dépendant globalement de l'œstradiol (E_2), un œstrogène, dont l'action opère durant un moment précis du développement appelé la période sensible. De manière contradictoire, la présence d' E_2 durant cette période masculinise les rats mâles mais démasculinise les cailles femelles. La masculinisation du cerveau des rats est également assurée par la prostaglandine E_2 (PGE_2), une hormone lipidique sous le contrôle de l' E_2 et impliquée dans l'inflammation, ainsi que par la microglie, les macrophages du cerveau, présente en plus grande quantité, particulièrement sous sa forme activée, chez les mâles. Ce travail avait trois objectifs : (1) tester le rôle de la PGE_2 lors de la différenciation sexuelle du cerveau de la caille japonaise afin de déterminer si elle pourrait expliquer la dichotomie observée entre l'effet précoce de l' E_2 chez les mammifères et chez les oiseaux. (2) qualifier et quantifier la microglie d'embryons des deux sexes dans l'aire pré-optique à différents stades de développement afin de déceler si une différence sexuelle est présente comme chez le rat durant la période sensible. Si ce n'est pas le cas, nous pourrions explorer l'hypothèse d'une réaction inflammatoire liée à l'interaction prolongée avec la mère pour expliquer la situation chez les rongeurs. (3) effectuer un suivi de la concentration en PGE_2 dans le cerveau de la caille durant le développement embryonnaire pour évaluer sa présence et l'existence d'une différence sexuelle des niveaux de cette prostaglandine.

Les résultats révèlent que l'inhibition, durant la période sensible, des enzymes responsables, notamment, de la synthèse de la PGE_2 interfère avec l'expression normale du comportement copulatoire des mâles sans l'éliminer complètement. Aucun effet du traitement n'a été décelé au niveau de la motivation à copuler, ni de l'innervation vasotocinergique sexuellement dimorphique du noyau pré-optique médian (POM). L'analyse de la quantité et de la morphologie de la microglie dans le POM au cours du développement montre qu'au douzième jour d'incubation, soit à la fin de la période de différenciation sexuelle du cerveau, les femelles possèdent plus de cellules microgliales que les mâles et en particulier deux fois plus de forme activée. Enfin, la PGE_2 est effectivement présente dans le cerveau embryonnaire de caille et sa concentration augmente durant le développement de manière similaire chez les mâles et les femelles. La différence sexuelle de la microglie nous permet d'infirmer l'hypothèse d'une réaction inflammatoire liée à l'environnement maternel, tandis que le dosage de PGE_2 infirme la possibilité d'un rôle de cette prostaglandine durant la différenciation sexuelle du cerveau. De manière générale, ces résultats indiquent donc que la microglie et un prostanoloïde, probablement autre que PGE_2 , jouent respectivement un rôle dans la démasculinisation et la masculinisation du comportement sexuel de la caille japonaise.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| I. Introduction | 1 |
| I.1 Les hormones sexuelles | 2 |
| I.2. Différenciation sexuelle du cerveau chez les mammifères et les oiseaux | 3 |
| I.2.1. Notion de sexe neutre..... | 4 |
| I.2.2. Effets organisateurs de la testostérone et de l'œstradiol chez les rongeurs..... | 5 |
| I.2.3. Effets organisateurs de la testostérone et de l'œstradiol chez la caille..... | 6 |
| I.2.4. La période sensible..... | 7 |
| I.2.4.1. La période sensible chez les rongeurs..... | 7 |
| I.2.4.2. La période sensible chez la caille..... | 8 |
| I.3. La microglie et son rôle dans la différenciation sexuelle des mammifères | 9 |
| I.3.1. Notions de base sur les cellules de la microglie..... | 9 |
| I.3.2. Origine de la microglie et colonisation du CNS..... | 11 |
| I.3.3. Rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle du rat..... | 14 |
| I.3.3.1. Différence sexuelle au niveau de la quantité et de la morphologie de la microglie..... | 14 |
| I.3.3.2. Influence de la prostaglandine E ₂ dans la masculinisation..... | 15 |
| I.4. La caille japonaise comme animal modèle dans l'étude du rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle | 17 |
| | |
| II. Buts du travail | 18 |
| | |
| III. Matériel et méthodes | 19 |
| III.1. Expérience 1 : inhibition de la synthèse de la prostaglandine E₂ et influence sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement reproducteur mâle | 19 |
| III.1.1. Animaux et conditions d'élevage..... | 19 |

| | |
|--|-----------|
| III.1.2. Préparation et injection de la solution d'indométhacine..... | 19 |
| III.1.3. Vérification de l'inhibition de la production de PGE ₂ par l'indométhacine..... | 20 |
| III.1.4. Gonadectomie..... | 20 |
| III.1.5. Implants de testostérone..... | 20 |
| III.1.6. Tests comportementaux des animaux adultes..... | 21 |
| III.1.7. Sacrifice et fixation des cerveaux..... | 22 |
| III.1.8. Marquage des fibres vasotocinergiques..... | 22 |
| III.1.9. Comptage des fibres vasotocinergiques..... | 24 |
| III.1.10. Analyse statistique..... | 24 |
| III.2. Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles..... | 25 |
| III.2.1. Embryons et conditions d'incubation..... | 25 |
| III.2.2. Récolte des cerveaux et fixation..... | 25 |
| III.2.3. Marquage immunohistochimique de la microglie..... | 25 |
| III.2.4. Comptage de la microglie et caractérisation de sa morphologie..... | 26 |
| III.2.5. Analyse statistique..... | 26 |
| III.3. Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE₂ dans l'HPOA d'embryons mâles et femelles à différents stades de développement..... | 27 |
| III.3.1. Embryons et conditions d'incubation..... | 27 |
| III.3.2. Récolte des HPOA et dosage de PGE ₂ | 27 |
| III.3.3. Analyse statistique..... | 28 |
| IV. Résultats..... | 28 |
| IV.1. Expérience 1 : inhibition de la production de PGE₂ par l'indométhacine..... | 28 |
| IV.2. Expérience 1 : Résultats des tests comportementaux..... | 29 |
| IV.2.1. Comportement consommatoire..... | 29 |
| IV.2.2. Comportement appétitif | 32 |

| | |
|---|-----------|
| IV.3. Expérience 1 : Résultats du comptage des fibres vasotocinergiques.. | 32 |
| IV.4. Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles..... | 33 |
| IV.5. Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE ₂ dans l'HPOA d'embryons mâles et femelles à différents stades de développement | 36 |
| V. Discussion..... | 37 |
| V.1. Expérience 1 : inhibition de la synthèse de la prostaglandine E ₂ et influence sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement reproducteur mâle..... | 37 |
| V.2. Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles..... | 40 |
| V.3. Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE ₂ dans l'HPOA d'embryons mâles et femelles à différents stades de développement | 42 |
| V.4. Discussion générale..... | 42 |
| VI. Conclusion..... | 43 |
| VII. Annexe | |
| VIII. Références | |

I. Introduction :

L'élucidation des mécanismes régissant les comportements sexuels a toujours constitué un sujet d'intérêt pour l'Homme et continue régulièrement à défrayer la chronique. Une meilleure compréhension de ces mécanismes chez l'humain peut être acquise en étudiant le comportement reproducteur hautement stéréotypé des animaux. En effet, chez ces derniers, le mâle est généralement le sexe qui monte, copule et transmet sa semence, tandis que le comportement femelle se caractérise par la posture de réceptivité. Cette stéréotypie tire sa source de **différences** dans les cerveaux mâles et femelles qui se mettent en place lors du développement embryonnaire, voire post-natal précoce. Ce phénomène porte le nom de **différenciation sexuelle du cerveau et du comportement**. Il est aujourd'hui largement accepté que les hormones sexuelles stéroïdiennes interviennent dans la différenciation sexuelle du cerveau de la plupart des mammifères et des oiseaux. Plus particulièrement, l'œstradiol ou œstradiol-17 β (E_2), **œstrogène** principal, joue un rôle prépondérant dans cette étape en participant à la mise en place du comportement propre à l'un ou l'autre sexe, mais aussi à son activation lors de la maturité sexuelle des individus. De façon intéressante, l'œstradiol, produit à partir d'un **androgène**, la testostérone, exerce un effet totalement opposé sur la circuiterie nerveuse des mammifères et des oiseaux. Ainsi, les œstrogènes produits dans le cerveau pendant la période périnatale masculinisent les rats mâles, tandis que ceux issus des ovaires démasculinisent les oiseaux femelles durant le développement embryonnaire. Par ailleurs, des études menées au niveau de l'aire pré-optique des rongeurs, une région clé pour l'expression du comportement sexuel, ont révélé l'implication, lors de la différenciation sexuelle, de deux autres acteurs : la **microglie**, les macrophages localisés spécifiquement dans le cerveau, et la **prostaglandine E_2** (PGE_2), une hormone lipidique sous le contrôle de l'œstradiol et impliquée dans l'inflammation. Il serait donc intéressant de savoir si le rôle de la PGE_2 est conservé chez les vertébrés et en particulier si la prostaglandine E_2 pourrait constituer le chaînon manquant permettant d'expliquer cette dichotomie des effets produits par l' E_2 , ce qui amènerait donc à mieux comprendre le phénomène de différenciation sexuelle du cerveau. En outre, l'implication de la microglie lors de la différenciation sexuelle du cerveau des mammifères laisse penser à une influence des processus immunitaires et inflammatoires au cours de ce phénomène et qui pourrait être liée au développement de l'embryon dans l'utérus de sa mère. L'étude de ces macrophages chez l'oiseau, qui se développe dans un œuf, permettrait ainsi de tester cette hypothèse en se plaçant dans un environnement exempt de l'influence maternelle potentielle. Pour répondre à ces deux problématiques, nous utiliserons la caille japonaise (*Coturnix japonica*), un animal modèle de choix pour l'étude de la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement.

Ce travail sera constitué de trois objectifs : premièrement, mettre en évidence un éventuel rôle de la prostaglandine E_2 lors de la différenciation sexuelle du cerveau de la caille, ce qui pourrait faire de cette hormone le chaînon manquant expliquant la dichotomie observée entre les mammifères et les oiseaux par rapport à l'action précoce de l'œstradiol. Deuxièmement, qualifier et quantifier la microglie de l'aire pré-optique d'embryons des deux sexes et sélectionnés à différents stades du développement afin de déceler l'existence d'une différence sexuelle permettant de tester l'hypothèse d'une réaction inflammatoire liée à la mère pour

expliquer l'implication de la microglie lors de la différenciation sexuelle des mammifères. Enfin, effectuer un suivi de la concentration en PGE₂ dans le cerveau durant le développement embryonnaire pour confirmer ou infirmer la présence de la prostaglandine E₂ chez le futur poussin et déterminer l'existence d'une différence sexuelle des niveaux de PGE₂.

I.1. Les hormones sexuelles :

Les hormones sexuelles sont des **messagers chimiques stéroïdiens**, c'est-à-dire des composés dont le précurseur est le cholestérol. Leur nature lipidique rend possible la liaison à un récepteur aussi bien membranaire que nucléaire, modifiant ainsi l'activité cellulaire de diverses façons. En effet, ces hormones peuvent influencer une cellule-cible soit à **court terme** (de quelques secondes à quelques minutes) en déclenchant une réaction en cascade par interaction avec un récepteur associé dans la membrane, soit à **long terme** (de quelques heures à quelques jours) en agissant comme facteur de transcription de gènes spécifiques. Elles sont donc capables d'engendrer une large gamme de réponses physiologiques et comportementales (Cornil *et al.*, 2013).

Deux grands groupes d'hormones sexuelles sont ici à considérer : d'une part, les **androgènes** composés de 19 atomes de carbone (C₁₉) qui regroupent la testostérone (**T**), la dihydrotestostérone (**DHT**) ainsi que l'androstenedione et, d'autre part, les **œstrogènes** formés de 18 atomes de carbone (C₁₈) qui sont constitués de l'œstradiol (**E₂**), l'œstriol (**E3**) et l'œstrone (**E1**). Ces hormones sont respectivement appelées hormones mâles et femelles car elles induisent l'apparition des caractères sexuels secondaires et sont majoritairement synthétisée par les gonades mâles et femelles, respectivement. En réalité, cette catégorisation est discutable puisqu'on retrouve aussi bien des androgènes chez la femelle que des œstrogènes chez le mâle et, fait intéressant, ces deux familles de stéroïdes sont également produites dans d'autres tissus comme le **cerveau** (Do Rego *et al.*, 2009 ; Robel & Beaulieu, 1995). Cela dit, malgré un chevauchement important, les concentrations circulantes en androgènes restent plus élevées chez le mâle tandis que celles en œstrogènes sont plus importantes chez la femelle.

L'inadéquation de la notion d'hormones mâles et femelles est également démontrée par **l'hypothèse de l'aromatisation** (Naftolin *et al.*, 1975). Elle propose que la testostérone module le comportement reproducteur masculin chez l'adulte à la condition d'être transformée en œstradiol dans le cerveau par l'**aromatase**. Cette enzyme, aussi connue sous le nom d'œstrogène synthase, catalyse une réaction d'aromatisation, soit une oxydation couplée à la disparition d'un des groupements méthyl du cycle A de l'androgène, ce qui conduit à la formation d'un noyau aromatique (**Fig.1**). Les modifications engendrées expliquent aisément la différence du nombre de carbones entre la testostérone et l'œstradiol. De manière similaire, les travaux de Mc Ewen (1977) démontrent que la différenciation sexuelle du cerveau du rat nécessite l'aromatisation *in situ* de la testostérone en œstradiol et constituent donc le pendant de l'hypothèse d'aromatisation de Naftolin. Notons néanmoins que l'aromatase ne s'exprime pas uniquement dans le cerveau mais aussi dans de nombreux tissus comme les ovaires, les testicules, la prostate, le placenta, voire même les os (Santen *et al.* 2009 ; Naftolin & Maclusky, 1982).

Cette dernière, si elle est réceptive, effectue un **squat**, c'est-à-dire s'accroupit en relevant les plumes de sa queue (Gutiérrez & Domjan, 2011).

Enfin, notons que le processus d'organisation/activation, bien que commun aux mammifères et aux oiseaux, est néanmoins plus nuancé et régulé de manière différente chez les deux espèces. Ainsi, certaines divergences intéressantes sont à mettre en évidence :

I.2.1) Notion de sexe neutre

Le sexe **neutre**, appelé aussi non différencié, correspond au sexe dont le comportement reproducteur est mis en place en l'absence d'hormones sexuelles. Une simple règle, applicable aux oiseaux et aux mammifères, permet aisément de déterminer l'individu dit neutre : il s'agit du sexe **homogamétique**, c'est-à-dire possédant deux chromosomes sexuels identiques (Adkins, 1975). Or, l'homogénéité du matériel génomique sexuel est respectivement assurée par la femelle, chez les mammifères (**XX**), et le mâle chez la caille japonaise (**ZZ**) (Maekawa et al., 2014). Chez le rat, la femelle est donc le sexe non différencié tandis qu'il s'agit du mâle pour la caille (**Fig.2**).

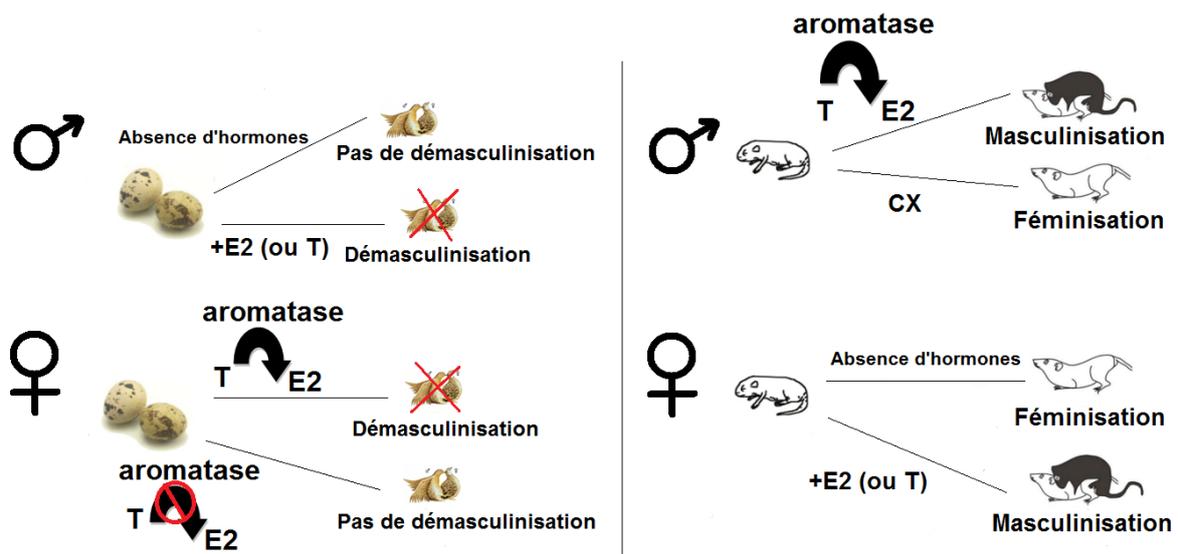


Figure 2. Schéma résumant la notion de sexe neutre. A gauche, cas de la caille japonaise et, à droite, du rat. Le panneau rouge illustre le blocage de l'aromatase par un inhibiteur. Légende : E₂ = œstradiol ; T = testostérone ; CX = castration. Adapté de Carere et Balthazart (2007), McCarthy (2012).

Ainsi, des expériences ont montré que l'injection de testostérone durant la période sensible de rates entraîne, chez elles, la mise en place du phénotype comportemental masculin (processus de **masculinisation**) en même temps qu'il inhibe l'établissement du phénotype féminin (processus de **défématisation**). Réciproquement, l'inhibition des effets de T par la castration de sujets mâles durant la phase organisationnelle résulte, en l'absence d'action hormonale, en un profil féminin au niveau de la circuiterie nerveuse (Raisman & Field, 1973) et du comportement (Phoenix et al., 1959). De manière semblable, un traitement à l'œstradiol durant la période sensible d'une caille mâle suffit à la **démasculiniser**, c'est-à-dire à modifier le système nerveux de telle manière à empêcher la copulation, alors que le même protocole appliqué sur une femelle ne change absolument pas son comportement reproducteur.

Parallèlement, utiliser un inhibiteur d'aromatase sur une femelle contrecarre la démasculinisation et résulte en l'établissement d'un phénotype comportemental masculin (Adkins, 1975 ; Adkins & Adler 1972 ; Balthazart et *al.*, 1992).

I.2.2) Effets organisateurs de la testostérone et de l'œstradiol chez les rongeurs

Comme discuté précédemment, il est admis que la testostérone intervienne dans la différenciation sexuelle du cerveau suite à son **aromatisation** en œstradiol. Chez le rat mâle, la T produite par les testicules embryonnaires rejoint le cerveau non différencié par le biais de la circulation sanguine. L'androgène est ensuite aromatisé en œstradiol par l'aromatase cérébrale (Amateau et *al.*, 2004 ; Konkle & McCarthy, 2011). L'E₂ nouvellement synthétisé influence alors les circuits neuronaux de l'aire pré-optique (**POA**), une zone cérébrale notamment impliquée dans le comportement reproducteur masculin, en les **masculinisant** et en les **déféminisant**. Il s'agit donc respectivement de mettre en place le futur phénotype comportemental mâle (copulation) et, *a contrario*, d'inhiber celui typiquement féminin (lordose). En revanche, la **féménisation**, ou mise en place d'un profil féminin, du cerveau du rat ne s'opèrerait qu'en l'**absence** d'interactions avec l'œstradiol, les ovaires étant **quiescents** durant le développement, et la femelle constituerait donc le sexe « par défaut » (McCarthy, 2012 ; Forger et *al.*, 2016 ; Negri-Cesi et *al.*, 2008 ; McCarthy, 2016). Cela dit, il semblerait pourtant que l'E₂ produit après la naissance participe tout de même à la féménisation du cerveau femelle chez le rat (Döhler et *al.*, 1984a) et la souris (Bakker & Brock, 2010). Par ailleurs, il est à noter que la liaison spécifique de l'E₂ maternel à l'**alpha-foetoprotéine**, une glycoprotéine produite par le fœtus, empêche l'hormone d'origine maternelle d'induire ses effets masculinisateurs sur les circuits cérébraux féminins (Bakker, 2006 ; Schwarz et McCarthy, 2008a). Enfin, lors de la puberté d'un individu totalement masculinisé et déféminisé, la présence d'un pic de testostérone **activera** le comportement reproducteur masculin préalablement établi (McCarthy, 2011). *A contrario*, l'ajout d'œstrogènes ou de progestérone exogène(s) chez ce même individu sera incapable d'entraîner le comportement féminin étant donné qu'il n'a pas été mis en place au préalable (Gerall et *al.*, 1998). Un raisonnement similaire peut être appliqué pour des animaux pubères entièrement féménisés dont le phénotype comportemental est activé par des hormones stéroïdes femelles.

Trois points essentiels sont à préciser par rapport à l'explication présentée ci-dessus : d'une part, la différenciation sexuelle ne s'arrête pas aux comportements reproducteurs et, *a fortiori*, à l'aire pré-optique. En effet, il est intéressant de constater que d'autres zones cérébrales comme l'**hippocampe** ou l'**amygdale** présentent également des différences sexuelles, notamment en ce qui concerne la réponse au stress (McCarthy & Konkle, 2005). Cependant, l'aire pré-optique constitue une région particulièrement intéressante dans le cadre de ce travail non seulement en raison de la grande densité de neurones ciblés par les stéroïdes qu'elle possède (Simerly, 2002), mais aussi car il s'agit d'une région-clé dans l'établissement et la régulation du comportement reproducteur (McCarthy, 2009). Un deuxième point important est que la **testostérone** peut également être réduite en **dihydrotestostérone** par l'activité enzymatique de la **5 α -réductase** (Kordon et *al.*, 2005) et ces deux hormones peuvent intervenir dans la différenciation sexuelle organisationnelle et/ou activationnelle au même titre que l'œstradiol. Un bon exemple au niveau de la phase d'organisation est celui des

motoneurons du noyau spinal du bulbe caverneux (**SNB**) responsables de l'innervation des muscles du pénis. En effet, chez le rongeur mâle adulte, ces cellules sont plus grandes et plus nombreuses par rapport à celles des femelles (Forger, de Vries & Breedlove, 2015) et ce, grâce à une exposition à la T et à la DHT pendant la phase organisatrice (Forger, 2006). De la même façon, le traitement de femelles avec ces hormones durant la période sensible permet d'augmenter le nombre de motoneurons du SNB à des niveaux identiques à ceux du mâle (Breedlove & Arnold, 1983). Enfin, des données récentes suggèrent également qu'une seconde période d'organisation se déroulerait durant la puberté des rongeurs et serait nécessaire à l'activation subséquente du comportement reproducteur approprié (Schulz & Sisk, 2006 ; Ahmed et al., 2008 ; Mohr et al., 2016 ; Brock, Baum & Bakker, 2011).

1.2.3) Effets organisateurs de la testostérone et de l'œstradiol chez la caille

Le mécanisme de différenciation sexuelle du cerveau de la caille est, d'une part, opposé à celui du rat, mais est aussi globalement moins connu. Ici, l'œstradiol, produit par l'ovaire embryonnaire fonctionnel **démasculinise** le cerveau (Balthazart, 1983), tandis que les circuits neuronaux du mâle se différencient en l'**absence** d'œstradiol ou, en tout les cas, d'une quantité suffisante du stéroïde (Balthazart & Ball, 1995). Dès lors, un individu pubère entièrement démasculinisé verra son comportement reproducteur féminin **activé** par un pic d'œstrogènes, la progestérone ne semblant pas intervenir de façon majeure dans le comportement féminin (Delville & Balthazart, 1987). *A contrario*, l'injection de testostérone exogène lors de cette période ne résultera pas en un comportement reproducteur masculin (copulation). Chez la caille, certaines composantes masculines précédant la copulation ne sont cependant pas organisées, ce qui signifie que l'apport d'une quantité donnée de T est **nécessaire et suffisante** pour permettre ce comportement chez les deux sexes adultes. On peut citer, par exemple, le **crow**, une vocalisation peu mélodieuse destinée à attirer la femelle (Balthazart et al., 2009). Il est d'ailleurs à noter qu'il s'agit ici d'un phénomène dépendant purement des androgènes, c'est-à-dire que la réponse observée provient de la DHT ou de la testostérone elle-même mais pas de son aromatisation en œstradiol (Schumacher & Balthazart, 1983). Parallèlement, la posture qu'acquiert une femelle réceptive (squat) n'est également pas organisée et peut être induite chez un mâle mature et castré par un traitement œstrogénique (Adkins-regan, 2002). Cela signifie donc que le contrôle hormonal du comportement de type femelle est uniquement de nature **activationnelle**.

D'autre part, il est important de rappeler que le comportement reproducteur mâle requiert la transformation de la testostérone en œstradiol pour être activé, exception faite de composantes comme le crow (Ball & Balthazart, 2004). Or, de manière intéressante, les œstrogènes femelles ne permettent pas l'expression du comportement mâle. Il semblerait donc que les cerveaux féminins aient développé, lors de la phase organisationnelle, une certaine **insensibilité** aux stéroïdes puisque, pour une même quantité d'hormone donnée, il y a activation du phénotype mâle chez des sujets masculins mais pas chez des individus femelles et ce, même si la dose est augmentée (Balthazart et al., 2009). Une possibilité est que les femelles ne pourraient produire l'E₂ local nécessaire à l'activation d'une partie du comportement masculin suite une activité enzymatique plus importante de l'aromatase neuronale mâle, comparée à celle de la femelle, en présence de testostérone (Schumacher &

Balthazart, 1986 ; Balthazart, 1997 ; Balthazart et *al.*, 1990 ; Balthazart et *al.*, 1996). Cette hypothèse est néanmoins contestée (Cornil et *al.*, 2011), laissant ainsi penser que la démasculinisation des femelles induit l'élimination de la circuiterie permettant d'engendrer une réponse en présence d'E₂.

1.2.4) La période sensible

1.2.4.1) La période sensible chez les rongeurs

La **période sensible** est définie comme l'intervalle de temps durant lequel les hormones stéroïdiennes sexuelles exercent un effet organisationnel sur l'individu, soit la mise en place définitive d'une ou de plusieurs différence(s) sexuelle(s), cérébrale(s) ou physiologique(s). En ce qui concerne les rongeurs, et plus particulièrement le rat, elle est comprise entre le moment où les testicules commencent à produire de la testostérone et celui où l'ajout d'androgènes exogènes ne permet plus de masculiniser le cerveau femelle. Concrètement, il s'agit d'une période comprise entre le **18^{ième} jour** embryonnaire, sur environ 20 jours de gestation, et le **10^{ième} jour** post-natal (McCarthy, 2008 ; Warren et *al.*, 1973). Durant cette période, les noyaux dits « sexuellement dimorphiques », soit des populations de neurones présentant une différence en taille, nombre ou d'ordre morphologique suivant le sexe considéré, se différencient (Döhler, 1986 ; Döhler et *al.*, 1984b). Chez les mammifères, il en existe deux dans l'aire pré-optique : le noyau sexuellement dimorphique (**SDN-POA**) et le noyau périventriculaire antéro-ventral (**AVPv**) (McCarthy, 2012). Le SDN-POA joue un rôle dans le **choix du partenaire**, tandis que l'AVPv exerce plutôt un contrôle sur l'activité des neurones produisant la gonadotropin releasing hormone ou **GnRH** (McCarthy, 2012 ; McCarthy et *al.*, 2009).

D'autres noyaux sexuellement dimorphiques sont présents dans le reste du cerveau : citons, à titre d'information, le noyau spinal du bulbe caverneux, dont nous avons fait mention précédemment, ainsi que la subdivision principale du noyau de la strie terminale (**pBNST**) (McCarthy, 2009). La différence sexuelle du SDN-POA et de l'AVPv est induite par l'**œstradiol** et se traduit par une différence de la taille du noyau. En effet, le SDN est typiquement plus grand chez le mâle par rapport à la femelle, alors qu'il s'agit de l'inverse pour l'AVPv (McCarthy et *al.*, 2015). Ces différences sexuelles reposent en partie sur la régulation du mécanisme **d'apoptose** par l'œstradiol (McCarthy, 2010). En effet, des études réalisées sur le SDN-POA, ont montré que l'E₂ entraîne l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques et la diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques, provoquant ainsi une apoptose, via la caspase-3, moins marquée chez les mâles (Tsukahara et *al.*, 2008 ; Wright et *al.*, 2010). A l'inverse, au niveau de l'AVPv masculin, les neurones dopaminergiques subissent une apoptose accrue liée à l'activation de caspases, tandis que la régulation du nombre de neurones GABAergiques est notamment liée à une production moindre de la cytokine de survie TNF α (Waters & Simerly, 2009 ; McCarthy, 2012).

1.2.4.2) La période sensible chez la caille

Chez la caille, la période de sensibilité aux œstrogènes est définie comme la période qui commence à partir du moment où les ovaires produisent de l'œstradiol et se termine lorsque l'administration d'E₂ exogène ne permet plus de démasculiniser le cerveau mâle. Elle s'étend donc du **6^{ème} au 12^{ème} jour d'incubation**, sachant que l'œuf éclot généralement après 17 jours (Carere & Balthazart, 2007). Cependant, des données suggèrent que cet intervalle serait uniquement correct pour les animaux mâles (Schumacher et *al.*, 1989). En effet, la démasculinisation des femelles peut être partiellement contrecarrée en dehors de cette période si elles sont ovariectomisées durant les quatre premières semaines de vie (Schumacher & Balthazart, 1984 ; Balthazart & Schumacher, 1984).

Tout comme chez le rat, il existe une zone dite sexuellement dimorphique dans l'aire pré-optique : le noyau pré-optique médian (**POM**). Ce dernier est vraisemblablement l'homologue du noyau pré-optique médian du rat dont la partie centrale est constituée par le SDN-POA présenté précédemment (Balthazart & Ball, 2007). Par ailleurs, le rôle clé du POM dans le contrôle du **comportement reproducteur mâle** a été confirmé dans de nombreuses études et, tout comme chez les rongeurs, cette région est plus grande chez les mâles (Viglietti-Panzica et *al.*, 1998 ; Panzica & Castagna, 1996). Cette différence sexuelle ne s'établit cependant pas durant la période sensible de l'animal. En effet, elle est activée lors de la puberté de l'oiseau, à savoir entre **5 et 6 semaines** de vie (Thompson & Adkins-Regan, 1992). La taille du noyau semble donc uniquement dépendre de la **testostérone circulante**, puisque que la gonadectomie de mâles et de femelles suivie d'un traitement de T suffit à annuler la différence sexuelle et à rétablir un volume identique à celui de mâles intacts (Panzica et *al.*, 1987). Dès lors, ces résultats contredisent ce qui a pu être dit jusqu'à présent puisque ce noyau semble dépendre de l'action **activationnelle** des hormones alors qu'il est, paradoxalement, impliqué dans le contrôle du comportement reproducteur masculin dépendant, au moins en partie, de l'action **organisationnelle**. En réalité, on a constaté que les neurones dorso-latéraux du POM étaient plus ou moins sensibles à la testostérone en fonction du sexe considéré : l'administration de T chez les mâles induit un **gonflement** de ces cellules tandis qu'il n'en est rien chez la femelle (Panzica et *al.*, 1991). Dès lors, une action organisationnelle est vraisemblablement présente au niveau de la réponse neuronale. Néanmoins, puisque qu'une femelle ovariectomisée et soumise à de la T exogène voit son POM atteindre un volume semblable à celui d'un mâle, cela signifie donc que le gonflement des neurones dorso-ventraux n'est pas le seul mécanisme en jeu. Une possibilité serait que le neuropile, c'est-à-dire l'espace inter-cellulaire de la substance grise comprenant notamment les cellules gliales, subirait également l'influence de la testostérone et expliquerait le changement de volume chez les femelles (Panzica et *al.*, 1996).

Enfin, la caille possède néanmoins un marqueur de différenciation sexuelle représenté par les **neurones vasotocinergique**, fabriquant de la vasotocine et homologue de l'hormone peptidique antidiurétique ou vasopressine trouvée chez les mammifères (Panzica et *al.*, 1996). Ce système est constitué de deux types de neurones : les **magnocellulaires**, principalement impliqués dans l'osmorégulation, sont localisés dans les noyaux supra-optiques et paraventriculaires et innervent la neurohypophyse. Les neurones **parvocellulaires** sont, quant

à eux, situés dans différentes régions des systèmes hypothalamiques et limbiques (Absil et al., 2002). Outre son rôle dans la réabsorption de l'eau, la vasotocine, comme la vasopressine, semble également intervenir dans l'expression du comportement reproducteur mâle (Castagna et al., 1998). De manière intéressante, une **différence sexuelle** s'observe, aussi bien chez le rat que chez la caille, au niveau du **POM** (ou le noyau pré-optique médian chez les mammifères), du noyau de la strie terminale (**BST**) et du noyau septal latéral (**SL**) : elle se traduit par la présence de fibres et de quelques corps cellulaires chez le mâle, tandis qu'il n'y en a pas ou peu chez la femelle (Viglietti-Panzica et al., 1992 ; Viglietti-Panzica et al., 1998). Ce dimorphisme du système parvocellulaire est conservé même après un traitement à la testostérone sur des animaux femelles adultes, ce qui indique qu'il dépend de l'action **organisationnelle** des œstrogènes (Viglietti-Panzica et al., 1992 ; Viglietti-Panzica et al., 1998). En effet, l'injection dans l'œuf, durant la période sensible, d'un inhibiteur d'aromatase masculinise, chez les femelles, la densité des fibres et des corps cellulaires exprimant la vasotocine. A l'inverse, l'administration d'œstrogènes réduit la présence de ces neurones et fibres chez les mâles (Viglietti-Panzica et al., 1998). En revanche, il est intéressant de constater que l'innervation des régions citées précédemment sont, chez les sujets mâles, dépendantes de la présence de la testostérone à l'âge adulte et plus particulièrement de son aromatisation en œstradiol (Viglietti-Panzica et al., 2001). Ainsi, des mâles castrés montrent une innervation vasotocinergique réduite mais la récupèrent après un traitement de quelques semaines à la T (Viglietti-Panzica et al., 1994 ; Panzica et al., 1999).

In fine, la différenciation sexuelle des mammifères et des oiseaux dans sa globalité est à la fois similaire, notamment en ce qui concerne les patrons moteurs typiques des mâles et des femelles ainsi que la différence sexuelle au niveau de l'innervation vasotocinergique, et très différente. Pour plus de clarté, un tableau récapitulatif reprenant l'ensemble de ces différences séparant les deux groupes se trouve dans le **tableau 1** (Annexe).

I.3) La microglie et son rôle dans la différenciation sexuelle des mammifères :

Dans un premier temps, il est important de noter que la microglie des oiseaux et des mammifères présente des caractéristiques similaires. Dès lors, les informations présentées ci-dessus sont valables pour les deux groupes, exception faite de certains sujets comme le mouvement des précurseurs microgliaux, qui a plutôt été étudié chez la caille, et leur rôle dans la différenciation sexuelle qui n'a, à ce jour, été qu'exclusivement étudié chez le rat.

I.3.1) Notions de base sur les cellules de la microglie

La microglie est une population de cellules immunocompétentes spécifiquement localisée et répartie de manière plus ou moins homogène dans le système nerveux central (cerveau et moelle épinière). Il s'agit en réalité de **macrophages spécialisés** qui représentent environ 10% du volume cellulaire sans compter les neurones (Perry, 1998). A l'instar de leurs homologues présents dans le reste du corps, leur rôle le plus connu consiste à surveiller constamment le milieu extra-cellulaire afin de détecter les agents pathogènes menaçant le bon fonctionnement du tissu. En outre, ils **phagocytent** les différents débris présents dans leur environnement proche, comme les corps apoptotiques, et interviennent dans le processus d'inflammation en sécrétant divers composés pro-inflammatoires (cytokines, prostaglandines,

chémokines, monoxyde d'azote, etc.). Néanmoins, de récentes études montrent que la microglie est également capable d'intervenir chez le sujet sain adulte en **élaguant** certains complexes synaptiques (Tremblay et *al.*, 2010 ; Schafer et *al.*, 2012) ou lors de la différenciation sexuelle du rat nouveau-né, comme nous le verrons plus loin. Dans le même ordre d'idées, elle régule le nombre de neurones chez l'adulte et le nouveau-né selon deux moyens complémentaires. D'une part, ces macrophages peuvent induire l'apoptose par la sécrétion de cytokines comme l'interleukine-6 (**IL-6**) ou le Tumor Necrosis Factor α (**TNF**) et, d'autre part, reconnaître ainsi que phagocyter spécifiquement les cellules apoptotiques (Sierra 2010 ; Sato, 2015 ; Marín-Teva et *al.*, 2004). Cela dit, la microglie peut également phagocyter des cellules non apoptotiques comme des précurseurs neuronaux et ainsi réguler leur nombre (Cunningham et *al.*, 2013). Enfin, il semblerait qu'elle soit impliquée dans la plupart des maladies neurodégénératives et mentales de par son rôle immunitaire (Vargas et *al.*, 2005 ; Bilbo, Smith & Schwarz, 2012 ; Long-Smith and *al.*, 2009 ; Solito & Sastre, 2012).

Au vu des fonctions décrites ci-dessus, il est relativement clair que ces macrophages sont des entités hautement dynamiques. Cette plasticité est d'ailleurs conservée dans les nombreuses morphologies qu'ils acquièrent au cours du temps. En effet, les cellules microgliales dites « quiescentes », ou plus correctement en « patrouillage », présentent de longues et nombreuses **ramifications** qui explorent leur environnement et dont l'aspect global fait songer à un corps d'araignée. Lors de l'entrée d'agents exogènes, la microglie s'active, élargit ses prolongements et en diminue drastiquement le nombre. Il ne subsiste alors qu'une **cellule amœboïde** ou grossièrement arrondie. Divers intermédiaires plus ou moins ramifiés existent également entre ces deux extrêmes (Ketenmann, 2011). Il est également intéressant de constater que la microglie colonise, sous sa forme amœboïde, le cerveau sain en développement. En parallèle de la maturation du système nerveux, elle s'y différencie progressivement jusqu'à obtenir son phénotype « d'araignée » et ce aussi bien chez le rongeur (Perez-Pouchoulen et *al.*, 2015) que la caille (Cuadros & Navascues, 1998). Dans le cadre de ce travail, quatre types morphologiques seront considérés tels que définis par Schwarz et *al.*, (2012) et illustrés dans la **figure 3** : la microglie amœboïde, la microglie à processus courts, la microglie à prolongements longs et épais et, enfin, celle à ramifications longues et fines.

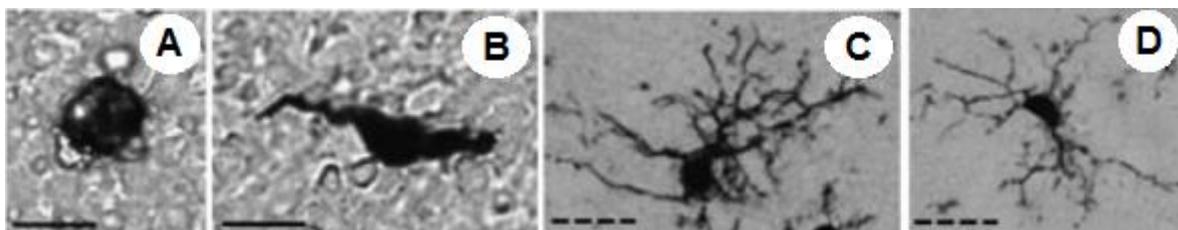


Figure 3. Marquage immunohistochimique de la microglie de rats nouveau-nés avec l'anticorps Iba-1. Différentes morphologies de la microglie peuvent être observées. A : microglie amœboïde (type activé) ; B : microglie à courtes ramifications (type activé) ; C : microglie à processus longs et épais (type intermédiaire) ; D : microglie dite « quiescente ». Echelle : Ligne continue = 10 μ m ; ligne en pointillés = 50 μ m. Adapté de Schwarz et *al.* (2012).

Néanmoins, l'évolution entre les différents stades est loin d'être à sens unique et il semblerait qu'il existe des fluctuations rapides entre phénotype amœboïde et ramifié. Cela

laisse donc penser que ces macrophages interagissent avec leur environnement proche dès leur entrée dans le système nerveux central (Legendre & Le Corronc, 2014). Un tel phénomène n'est, au final, pas si surprenant si l'on considère leur dynamisme extraordinaire.

I.3.2) Origine de la microglie et colonisation du CNS

Un débat a longtemps subsisté concernant l'ontogénie des cellules microgliales. D'aucuns estimaient qu'elles étaient issues du feuillet ectodermique, tandis que d'autres penchaient plutôt pour une origine mésodermique. Cette seconde hypothèse est aujourd'hui généralement privilégiée (Ginhoux et *al.*, 2013). La microglie serait donc issue de la **lignée myéloïde** du sac vitellin embryonnaire, celle-là même qui donne naissance aux macrophages présents dans le reste du corps (Prinz & Mildner, 2011 ; Ginhoux et *al.*, 2010). De manière étonnante, cette population étroitement liée aux cellules sanguines apparaît bien avant la mise en fonction des organes hématopoïétiques fœtaux comme le foie et la rate. En effet, les précurseurs de la microglie, ainsi que d'autres macrophages primitifs, colonisent respectivement en masse le cerveau et les tissus en formation à partir du **8,5^{ième}**, voire du **9^{ième} jour**, de gestation chez le rongeur (Ginhoux et *al.*, 2010) et d'incubation chez la caille (Cuadros et *al.*, 1994). Or, il faut attendre le 12^{ième} jour pour que l'hématopoïèse démarre dans les organes appropriés (Naito et *al.*, 1990). Plus intéressant encore, il semblerait que les macrophages tissulaires issus du sac vitellin soient progressivement remplacés au cours du développement de l'individu par des monocytes (notamment hépatiques). En revanche, ce ne serait pas le cas des cellules microgliales (Ginhoux et *al.*, 2013). Ainsi, la microglie constituerait une population quasi totalement **extra-embryonnaire**, capable de proliférer afin de se maintenir à une concentration plus ou moins constante dans le cerveau (Michell-Robinson et *al.*, 2015). En outre, elle serait relativement isolée des autres macrophages présents dans le corps en raison de la **barrière hémato-encéphalique (BBB)**. Cette barrière, constituée des pieds astrocytaires, de cellules endothéliales, de péricytes et d'un échantillon microglial a pour rôle, comme son nom l'indique de séparer le système vasculaire du reste du tissu nerveux (Bilbo & Schwarz, 2012).

Passons à présent à un second point important qui est le mode de colonisation de ces macrophages. Seront développés ici les trois modes de déplacement décrits par Navascues et *al.* (2000) qui sont :

D) La colonisation par le flux sanguin

Cette hypothèse est facilement envisageable lorsqu'on sait que l'envahissement du cerveau par la microglie et la mise en place du système circulatoire sont concomitants puisque ce dernier deviendrait fonctionnel entre le **8,25^{ième}** jour et le **10^{ième}** jour de gestation chez les mammifères (McGrath et *al.*, 2003) ainsi qu'à un moment équivalent chez la caille (Tomanek et *al.*, 2006). Cela dit, la circulation n'est peut-être pas encore tout à fait optimale pour assurer l'entièreté du transport. En outre, des précurseurs arrivent dans des zones **non vascularisées** comme la rétine de la caille (Marin-Teva et *al.*, 1998 ; Navascues et *al.*, 1995 ; Jeon et *al.*, 2004) ou bien colonisent le cerveau bien avant que la circulation sanguine ne soit mise en place, soit avant le 8^{ième} jour embryonnaire (Cuadros et *al.*, 1992a ; Cuadros et *al.*, 1992b). Enfin, si la microglie provenait exclusivement du circuit vasculaire, le front de colonisation

des cellules démarrerait à proximité des vaisseaux sanguins, ce qui n'est pas forcément le cas (Cuadros et *al.*, 1997 ; Cuadros et *al.*, 1994).

II) La colonisation par les ventricules

Cette voie de colonisation est plausible lorsque l'on peut observer des précurseurs traverser l'épithélium bordant les ventricules (Cuadros et *al.*, 1994). Par ailleurs, l'injection de billes recouvertes de phospholipase A2, une toxine issue du venin du serpent à sonnette *Crotalus durissus terrificus*, dans les ventricules recrute les macrophages s'y trouvant. De manière intéressante, si on laisse le système en place pendant deux semaines, ces cellules évoluent et finissent par adopter la forme de la microglie quiescente, laissant supposer que les précurseurs observés dans le tissu nerveux seraient bels et bien issus de l'espace ventriculaire (Kaur et *al.*, 1990). Bien entendu, cette interprétation repose sur le postulat que les macrophages se liant aux billes proviennent effectivement des ventricules et non du parenchyme nerveux.

III) La colonisation par les méninges

Cette dernière voie de migration est à nouveau possible au vu de l'observation de précurseurs traversant la pie-mère. Étonnamment, si le passage par cette dernière peut s'effectuer quasiment n'importe où, il semble pourtant exister des « **hot-spots** » préférentiels pour l'invasion (**Fig.4**).

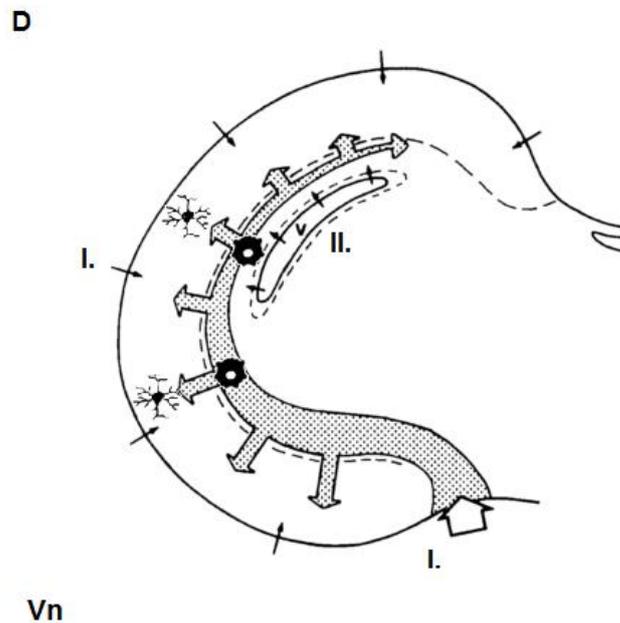


Figure 4. Représentation de deux voies de migration de la microglie dans le tectum optique de la caille japonaise selon une coupe coronale. **I. Colonisation par les méninges.** Sont illustrés le « hot spot » (flèche vide) et la diffusion plus aléatoire (flèches fines). Les flèches remplies montrent à la fois le déplacement tangential et radiale au cours duquel la microglie perd sa morphologie amœboïde pour prendre celle ramifiée. **II. Colonisation par les ventricules.** Légende : V : ventricule ; Vn : ventral ; D : dorsal. Adapté de Cuadros et Navascues (1998).

Néanmoins, *nonobstant* l'endroit de diffusion choisi, les étapes de colonisation restent les mêmes. En effet, des études réalisées chez la caille au niveau de la rétine, du tectum optique et du cervelet, montrent que la future microglie pénètre le tissu nerveux à partir des méninges selon deux voies de migration. Ainsi, les cellules se déplacent d'abord **tangentiellement** puis **radialement**, moment au cours duquel la morphologie des précurseurs évolue vers le stade fortement ramifié (Cuadros & Navascues, 1998).

In fine, il semblerait que la microglie procède de diverses façons pour envahir le système nerveux central. Ces trois voies sont possibles en raison de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique qui n'est encore qu'une **ébauche** ou fortement **permissive**. En effet, il semblerait qu'elle ne se mette en place qu'à partir, voire même après le 10^{ème} jour embryonnaire chez les mammifères et les oiseaux (Bauer & Bauer, 2000) et qu'elle reste largement perméable durant les premiers jours de vie dans les deux groupes (Schwarz & Bilbo, 2011 ; Navascues et *al.*, 2000).

Un autre point intéressant est la présence de précurseurs peuplant le cerveau avant le 8^{ème} jour de gestation/incubation, c'est-à-dire avant la colonisation massive de la microglie. Une première hypothèse serait de dire qu'il s'agit de futures cellules microgliales migrant un peu en avant du front de colonisation. Cette proposition est crédible lorsque ces macrophages apparaissent entre le 6^{ème} et le 7^{ème} jour du développement embryonnaire. Cependant, si ces précurseurs apparaissent dès les premiers jours de gestation, l'idée qu'ils soient destinés à une autre tâche devient envisageable. Ainsi, il pourrait s'agir, par exemple, d'une population de macrophages totalement transitoires qui seraient impliqués dans le développement et le façonnement de la trame de base du tissu neural. Trois rôles possibles sont évoqués par Cuadros et *al.*, 1993 :

- **Implication dans la mort cellulaire** : les précurseurs phagocytent les débris cellulaires engendrés lors du remaniement du parenchyme nerveux et de la mise en place des différentes régions cérébrales.
- **Interactions avec les axones** : les macrophages utiliseraient leur faculté de phagocytes professionnels pour libérer un chemin permettant aux axones de passer à travers le tissu. D'autre part, ils pourraient également détruire les projections axonales temporaires ou aberrantes et donc non nécessaires dans le cerveau mature. Cette hypothèse a pu être vérifiée depuis (Mallat et *al.*, 2005).
- **Mise en place de la vascularisation** : comme avec les axones, les précurseurs observés pourraient faciliter le passage des vaisseaux sanguins néo-synthétisés. De plus, ces macrophages participeraient à l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de tissu vasculaire à partir de cellules endothéliales préexistantes, en sécrétant des facteurs angiogéniques. A nouveau, cette hypothèse a pu être effectivement démontrée par la suite (Arnold & Betsholtz, 2013).

Les hypothèses présentées ci-dessus ne sont pas mutuellement exclusives et il n'est pas impossible que quelques précurseurs microgliaux colonisent plus tôt le système nerveux

central pour participer à son organisation, avant de se différencier plus tard en microglie. De plus, comme souligné, les trois rôles potentiels proposés s'accordent avec les données récentes mettant en lumière les multiples facettes de ces macrophages.

I.3.3) Rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle du rat

I.3.3.1) Différence sexuelle au niveau De la quantité et de la morphologie de la microglie

Précédemment, nous avons vu que l'œstradiol **masculinise** le système nerveux des rongeurs. Il s'avère que la microglie constitue également une source de différences entre mâles et femelles. Ainsi, une première expérience réalisée par Lenz et *al.* (2013) a démontré l'existence d'une différence sexuelle au niveau du **nombre** et de la **morphologie** des cellules microgliales présentes dans la POA de jeunes rats âgés de deux jours. Plus précisément, les femelles possèdent moins de microglie et un nombre de cellules **amœboïdes** ou **activées** deux fois moindre par rapport aux mâles. Par ailleurs, un traitement des femelles à l'œstradiol durant la période sensible résulte en un nombre de cellules microgliales typiquement masculin.

De manière intéressante, la microglie semble exprimer des récepteurs aux œstrogènes, mais les avis divergent quant à leur identité. Pour certains, seuls ER β (Jordan, 1999) serait présent, tandis que pour d'autres, c'est ER α qui serait exprimé (Bruce-Keller et *al.*, 2000 ; Sierra et *al.*, 2008), bien que la présence de ce dernier récepteur ne soit pas toujours certifiée (Lenz et *al.*, 2013). Quoi qu'il en soit, il est donc possible que l'œstradiol exerce, par le biais de ce(s) récepteur(s), un certain contrôle sur ces macrophages. Ce contrôle se traduirait par une régulation du mécanisme d'apoptose (Nielsen et *al.*, 2000), ce qui expliquerait potentiellement la différence observée entre le nombre de cellules microgliales femelles et mâles.

Alternativement, on peut imaginer que les différences sexuelles observées au niveau de la microglie ne dépendent pas d'une exposition aux œstrogènes mais seraient dues à l'environnement auquel est soumis le cerveau en développement. Margaret M. McCarthy (données non publiées) a émis l'idée que le phénotype activé des mâles serait en fait une réaction inflammatoire résultant d'une **réponse immunitaire** de la mère causée par la présence de l'individu mâle dans son utérus. Dès lors, il serait possible que les cellules microgliales mâles réagissent à des molécules maternelles, comme des cytokines par exemple, qui atteignent le cerveau grâce à une barrière hémato-encéphalique encore relativement permissive. En outre, le placenta lui-même dispose de macrophages spécialisés, appelés les **cellules de Hofbauer**, pouvant également émettre des composés pro-inflammatoires en réponse, notamment, aux anticorps maternels (Bilbo & Schwarz, 2012).

Enfin, il existe également une différence sexuelle au niveau de la morphologie et de la quantité de la microglie chez le rat **juvénile** et **adulte**. En effet, les femelles possèdent plus de cellules microgliales à prolongements longs et épais que les mâles et ce, dans diverses zones cérébrales comme l'hippocampe, le cortex pariétal et l'amygdale (Schwarz et *al.*, 2012). L'hypothèse proposée ici par les auteurs est que la différence sexuelle observée à l'âge adulte

est peut-être due à l'intervention des **hormones circulantes**, voire des **chromosomes sexuels**, ce qui expliquerait alors la différence entre mâles et femelles juvéniles.

Pour finir, il semblerait donc que **quatre facteurs** puissent influencer la quantité et la morphologie de la microglie : la présence d'œstradiol durant la période sensible, une réaction inflammatoire causée par la mère lors du développement, les chromosomes sexuels et les hormones circulantes à l'âge adulte.

I.3.3.2) Influence de la prostaglandine E₂ dans la masculinisation

Les **prostaglandines** sont des hormones lipidiques produites par la microglie, les astrocytes et les neurones (Lenz & McCarthy, 2014) et qui proviennent de la transformation de l'acide arachidonique, un constituant des phospholipides de la membrane plasmique. Plus précisément, l'acide arachidonique est cyclisé et oxydé par l'action d'une prostaglandine-endoperoxydase synthase ou cyclooxygénase (**COX**) localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Cette enzyme est formée de deux **sites catalytiques** : une cyclooxygénase et une peroxydase, responsables des réactions citées ci-dessus et produisant un précurseur, la prostaglandine H₂ (**PGH₂**) (Candelario-jalil & Fiebich, 2008 ; Simmons et *al.*, 2004). Celui-ci engendrera, par la suite, divers composés appelés prostanoïdes, dont les prostaglandines, et ce sous le contrôle d'isomérases, des enzymes remaniant la structure de la molécule impliquée (**Fig. 5**).

Notons toutefois qu'il existe deux isoenzymes COX, c'est-à-dire des enzymes effectuant un même rôle et dont les séquences d'acides aminés sont très proches. Il s'agit de la forme constitutive, **COX-1**, et de celle inductible, **COX-2**, toutes deux encodées par deux gènes distincts (Candelario-jalil & Fiebich, 2008 ; Simmons et *al.*, 2004). Une troisième variante, COX-3, est également présente mais comme il s'agit du résultat de l'épissage alternatif de COX-1 (Candelario-jalil & Fiebich, 2008), seules COX-1 et COX-2 seront considérées. Par ailleurs, si COX-2 est effectivement inductible suite à divers stimuli comme des molécules pro-inflammatoires (Candelario-jalil & Fiebich, 2008) ou une potentialisation à long terme (Chen et *al.*, 2002 ; Yang & Chen, 2008), elle serait également exprimée de manière basale au niveau des synapses actives de l'hippocampe (Yamagata et *al.*, 1993).

Considérons à présent l'impact de ces enzymes sur la différenciation sexuelle du rat. La prostaglandine d'intérêt est ici la prostaglandine E₂ (**PGE₂**) issue de la réaction entre la **PGE synthase**, une isomérase, et le précurseur PGH₂, formé par COX (**Fig. 5**). Sous l'influence de l'œstradiol synthétisé durant la période sensible, l'expression de COX-1 et COX-2 serait augmentée et conduirait à une production importante de PGE₂ (Lenz et *al.*, 2012). Une fois libérée dans le milieu, la molécule pro-inflammatoire se fixerait sur les récepteurs à prostaglandine E (**EP**), au nombre de quatre, situés sur les épines dendritiques des neurones du **POA**. Dans le cadre de la différenciation sexuelle, il semblerait que **EP2** et **EP4** soient majoritairement activés (Wright et *al.*, 2008). Il s'agit de récepteurs **métabotropiques** entraînant la production d'adénosine monophosphate cyclique par l'intermédiaire de l'adénylyl cyclase (Andreasson, 2010 ; Sugimoto & Narumiya, 2007 ; McCarthy, 2012). L'AMPc ainsi produit activerait une protéine kinase A ou **PKA** (Lenz & McCarthy, 2014). Or, il existerait plusieurs types de PKA, dont une intimement liée aux microfilaments d'actine

présents en grand nombre dans les épines dendritiques. Ce type de kinase serait attaché au cytosquelette par l'intermédiaire des protéines d'attachement de PKA (**AKAPs**) (McCarthy, 2012). L'échafaudage ainsi formé permettrait à la PKA de phosphoryler spécifiquement certaines sous-unités des **récepteurs AMPA**, comme GluR1 (Lenz et *al.*, 2011 ; Wright et McCarthy, 2009). A titre d'information, rappelons qu'il s'agit de récepteurs tétramériques ionotropiques, c'est-à-dire couplés à un canal d'ions qui sont ici le Na⁺ et le K⁺, activés par le **glutamate**, le principal neurotransmetteur exciteur dans le système nerveux central. Par la suite, la phosphorylation des récepteurs AMPA permettrait leur transport en masse vers la membrane des épines dendritiques augmentant ainsi leur nombre sur la surface membranaire. Enfin, l'activation de ces récepteurs par le glutamate permettrait la stabilisation et le maintien des épines dendritiques des mâles (Lenz et *al.*, 2012 ; McCarthy et *al.*, 2009).

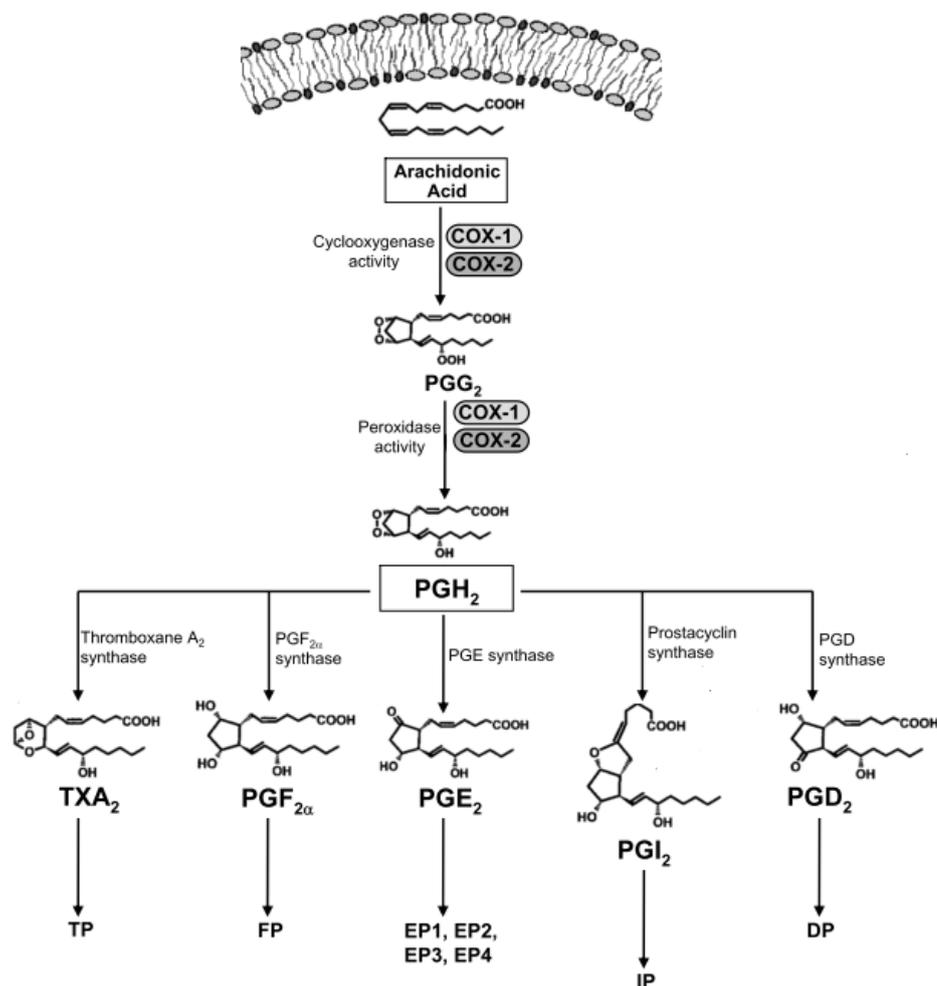


Figure 5. Schéma récapitulatif de la transformation de l'acide arachidonique en prostanoides : les prostaglandines (**PGE₂** ; **PGF_{2α}** ; **PGD₂**), la prostacycline (**PGI₂**) et les thromboxanes (**TXA₂**). La prostaglandine G₂ contenue dans un endoperoxyde (PGG₂) et la prostaglandine H₂ (PGH₂) sont les deux précurseurs découlant de l'activité respective des deux sites catalytiques des enzymes COX-1 et COX-2. Les récepteurs auxquels se lient les molécules formées sont indiqués en bas de la figure. Adapté de Simmons et *al.* (2004) et Candelario-Jalil (2008).

In fine, chez le rat, la présence de l'œstradiol causerait donc **l'augmentation** de la concentration en PGE₂ dans le milieu, ce qui résulterait en un nombre d'épines dendritiques deux à trois fois plus important dans le POA mâle par rapport à celui des femelles. Un lien entre cette différence sexuelle morphologique et la différence sexuelle au niveau du comportement a été fait (Amateau & McCarthy, 2002 ; Todd et al., 2005 ; McCarthy et al., 2009). En effet, l'inhibition de l'activité de COX-1 et de COX-2, par injection d'indométhacine, durant la période sensible suffit à empêcher la masculinisation du comportement de sujets mâles et à faire diminuer le nombre d'épines dendritiques à des niveaux similaires à ceux des femelles. Réciproquement, l'injection d'œstradiol ou de PGE₂ **masculinise** les femelles nouvellement nées et augmente la quantité d'épines dendritiques (McCarthy, 2010 ; Schwarz & McCarthy, 2008b). Par ailleurs, l'inhibition des cellules microgliales empêche cette différence sexuelle des épines dendritiques et l'établissement du comportement reproducteur sexuel masculin, ce qui laisse penser que ces macrophages joueraient, avec la PGE₂, un rôle dans la **masculinisation** (Lenz et al., 2013).

Pour terminer, il est intéressant de noter que si la microglie possède les cyclooxygénases nécessaires à la production de prostaglandine E₂, elle exprime également les récepteurs **EP1**, **EP2**, **EP4** (Nagano et al., 2014 ; Johansson et al., 2013) et vraisemblablement **EP3** (Slawik et al., 2004). En outre, une étude récente (Fu et al., 2015) a montré que la liaison de la PGE₂ avec le récepteur EP2 entraînait la mort cellulaire des cellules microgliales. La manière dont ce mécanisme pourrait influencer la différence sexuelle observée au niveau de la quantité de la microglie n'est pas tout à fait claire mais il reste intéressant de constater que les cellules microgliales constituent vraisemblablement un lien entre l'œstradiol et la PGE₂ puisqu'elles possèdent des récepteurs pour ces deux composés.

I.4) La caille japonaise comme animal modèle dans l'étude du rôle de la microglie dans la différenciation sexuelle :

Au vu du rôle de la PGE₂ et de la microglie lors de la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement des rongeurs, il serait intéressant de savoir si ces deux acteurs interviennent également dans la différenciation sexuelle de la **caille japonaise**. Plusieurs raisons viennent étayer la pertinence de cette interrogation : tout d'abord, nous avons vu que la différenciation sexuelle de la caille et des rongeurs différaient sur de nombreux points. Plus important encore, une même hormone sexuelle, **l'œstradiol**, induit des effets radicalement opposés dans les deux groupes : la **masculinisation** chez le rat et la **démasculinisation** chez la caille. Dès lors, estimer l'impact de la PGE₂, connue pour jouer un rôle-clé dans la **masculinisation** des rongeurs, chez l'oiseau où l'œstradiol **démasculinise** le tissu cérébral, permettrait peut-être d'expliquer la dichotomie observée vis-à-vis de l'action de l'E₂ sur la circuiterie nerveuse et ainsi de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant la différenciation sexuelle du cerveau des vertébrés en général. La PGE₂ pourrait donc constituer le chaînon manquant reliant les mammifères et les oiseaux. Ce dernier point conduirait éventuellement à appréhender de manière plus précise les phénomènes mis en jeu chez l'Homme malgré l'implication vraisemblablement plus importante des androgènes chez ces derniers. De plus, la comparaison des effets de l'œstradiol entre les mammifères et les oiseaux est tout à fait justifiée puisque les systèmes endocriniens et neuroendocriniens des oiseaux sont

extrêmement **proches** de ceux des mammifères (Wingfield, 2005). L'intérêt de l'étude de la caille repose également sur le fait qu'une partie du développement se déroule dans l'œuf, et donc en dehors d'une interaction maternelle prolongée comme c'est le cas chez les mammifères. Il serait donc possible de tester la possibilité que la différence sexuelle observée au niveau de la quantité et de la morphologie de la microglie soit une **réaction inflammatoire** en réponse à un ou plusieurs facteurs d'origine maternelle. *Nonobstant* la réponse à cette proposition, les résultats obtenus permettront d'apporter de nouvelles informations sur les cellules microgliales et leur rôle dans la différenciation sexuelle. Enfin, notons que la caille possède la particularité d'exprimer ses patrons comportementaux en captivité, ce qui contribue à son intérêt en tant qu'animal modèle (Ball & Balthazart, 2010).

II. Buts du travail :

Le but de ce travail est triple : nous étudierons l'implication de la microglie et de la prostaglandine E_2 dans la différenciation sexuelle du cerveau de la caille japonaise. Dans un premier temps, l'indométhacine, un inhibiteur de COX-1 et COX-2 responsables de la production de la prostaglandine E_2 , sera injectée dans des œufs à différents moments de la période sensible afin de déterminer si ce traitement influence l'expression du comportement sexuel mâle. Les cerveaux seront ensuite récoltés et l'expression d'un marqueur de différenciation sexuelle, l'innervation vasotocinergique au niveau du POM, sera comparée après immunohistochimie dans le but de démontrer un éventuel effet organisateur de la prostaglandine E_2 et de déterminer son implication dans la dichotomie des effets précoces de l'œstradiol chez les mammifères et les oiseaux.

Dans une seconde expérience, le **nombre** et la **morphologie** des cellules microgliales seront estimés au niveau de l'aire pré-optique de cerveaux d'embryons mâles et femelles récoltés à des stades clés du développement. Cette manipulation permettra de déterminer s'il existe une différence sexuelle concernant la microglie. De plus, elle apportera des éléments de réponse à l'hypothèse selon laquelle le profil de la population microgliale est causé par une réaction inflammatoire liée à la mère.

Enfin, un suivi de la concentration en PGE_2 dans le cerveau en développement sera effectué afin de déterminer si la PGE_2 est d'ores et déjà produite chez le futur poussin et, si tel est le cas, afin d'estimer s'il existe une différence sexuelle entre mâles et femelles au niveau de la concentration en prostaglandine E_2 . Pour ce faire, l'hypothalamus et l'aire pré-optique (HPOA) d'embryons des deux sexes seront récoltés à des stades clés du développement et un dosage de la PGE_2 dans ces échantillons sera réalisé.

III. Matériel et méthodes :

III.1) Expérience 1 : inhibition de la synthèse de la prostaglandine E₂ et influence sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement reproducteur mâle

III.1.1) Animaux et conditions d'élevage

Cette expérience impliquait septante cailles japonaises : trente-six mâles et trente-quatre femelles. Les animaux ont été élevés en groupe dans des cages mixtes jusqu'à cinq semaines de vie avant d'être transférés dans des cages individuelles jusqu'à la fin de l'expérience. Une gonadectomie a été réalisée à l'âge de trois semaines et un traitement à la testostérone sous forme d'implants chroniques a été appliqué à l'âge de cinq semaines afin de mimer l'exposition naturelle à cet androgène et qui débute normalement à cet âge. Le poids des individus et la taille de leur glande cloacale ont été mesurés à trois, cinq et enfin huit semaines de vie, correspondant approximativement au moment où les cailles atteignent l'âge adulte. Ces données ont respectivement permis de vérifier la bonne santé des sujets et l'efficacité du traitement à la testostérone, puisque la taille de la glande cloacale dépend des androgènes (Balthazart, Castagna & Ball, 1997).

Les animaux ont été maintenus dans des conditions photopériodiques de seize heures de lumière pour huit heures de nuit. L'eau et la nourriture ont été fournies *ad libitum* durant toute la durée de l'expérience.

III.1.2) Préparation et injection de la solution d'indométhacine

L'indométhacine est un anti-inflammatoire non stéroïdien ou NSAID qui bloque le site actif des deux isoenzymes COX et empêche donc la production de PGE₂ (Candelario-jalil & Fiebich, 2008). Chez les rongeurs et les oiseaux adultes, l'indométhacine est utilisée à dose égale ou équivalente (Soh & Koga, 1999 ; Sasaki, Shimada. & Saito, 1998 ; Sijben et *al.*, 2000 ; Kovács et *al.*, 2014 ; Rohde et *al.*, 2015 ; Sathyanesan et *al.*, 2015). Dès lors, sur base de résultats observés chez le rat nouveau-né (Amateau & McCarthy, 2002 ; Nugent et *al.*, 2009), il a été décidé d'injecter les œufs avec 50µg d'indométhacine (Sigma ; 50µl d'une solution de 1mg/ml) dissoute dans de l'huile de sésame (Sigma). Comme l'indométhacine ne se solubilise pas facilement, sa dissolution a été facilitée par sonication (Hölscher, 1995), une pratique consistant à soumettre la solution à des ultrasons pour briser les interactions moléculaires. Cinq sessions de trois minutes de sonication, à une fréquence de 50/60Hz, ont ici été nécessaires. La solution a par la suite été stérilisée en séjournant pendant 15 minutes dans un bain-marie à 90°C avant d'être placée dans un incubateur à 37°C afin de ne pas entraîner un choc thermique lors de l'injection. Les étapes de sonication, de stérilisation et de mise en incubateur ont été répétées pour la solution contrôle contenant uniquement de l'huile de sésame.

L'injection du traitement a eu lieu aux 7^{ième} et 9^{ième} jours de vie embryonnaire. Il s'agit respectivement des moments où la différenciation sexuelle du cerveau démarre et où la microglie, un des producteurs de prostaglandine E₂, commence à envahir le parenchyme nerveux. Les œufs (n=300) ont été incubés dans un incubateur (MG 140/200 rural, FIEM ;

37,8°C pour 47% d'humidité) et séparés en trois groupes : un premier injecté avec de l'indométhacine après une semaine d'incubation (**Indo E7**), un deuxième injecté après neuf jours d'incubation (**Indo E9**) et, enfin, un groupe contrôle constitués d'individus injectés avec de l'huile de sésame au 7^{ième} ou au 9^{ième} jour. Pour l'injection, les œufs ont été retirés de l'incubateur puis placés un à un sur un portoir, l'apex dirigé vers le haut, à proximité d'une flamme fournissant un environnement stérile. La surface de l'œuf a ensuite été désinfectée avec un mouchoir imbibé d'éthanol, avant d'injecter délicatement 50µl de la solution contrôle ou d'indométhacine avec une aiguille préalablement chauffée au rouge afin d'éviter toute contamination. Le trou résultant de la procédure a ensuite été bouché avec une goutte de paraffine liquide maintenue entre 40 et 60°C pour éviter toute combustion spontanée du composé. Une fois la manipulation achevée, les œufs ont été rapidement remis dans l'incubateur pour y poursuivre leur développement.

III.1.3) Vérification de l'inhibition de la production de PGE₂ par l'indométhacine

Afin de s'assurer que la dose d'indométhacine injectée bloque bel et bien la production de PGE₂ dans l'aire pré-optique et que les effets observés sont spécifiques au blocage des COX, un dosage de la prostaglandine E₂ a été réalisé sur des HPOA issus d'œufs injectés avec 50µg d'indométhacine ou de l'huile de sésame à E7 ou E9 selon les modalités décrites précédemment. Quatre individus de chaque sexe ont été sacrifiés aux âges étudiés, quatre heures après l'injection de la drogue ou de l'huile de sésame. La méthodologie employée pour doser la PGE₂ et récolter les HPOA est identique à celle utilisée dans l'expérience 3 (voir section III.3.2).

III.1.4) Gonadectomie

Les animaux ont subi une gonadectomie à trois semaines de vie, soit avant le début de leur maturation sexuelle et de la sécrétion d'hormones sexuelles par les gonades. Pour ce faire, les cailles ont été anesthésiées avec de l'isoflurane mélangé à 80% d'oxygène puis placées en position étirée sur le flanc, sur un portoir en bois, avec leurs ailes et leurs pattes attachées. La zone se situant au niveau de la cuisse a été délicatement déplumée et une incision a été pratiquée derrière la dernière côte flottante. Les testicules ou l'ovaire ont ensuite été retirés et deux points de sutures ont été réalisés avec du fil à coudre fin. Une fois cela fait, les animaux ont été placés près d'une source de chaleur contenant de l'eau et de la nourriture pendant environ une heure pour récupérer de l'opération. Passé ce délai, les individus ont été remis en cages communes.

III.1.5) Implants de testostérone

A l'âge de cinq semaines, les animaux ont reçu deux implants sous-cutanés Silastic® de 24mm remplis de testostérone et bouchés à chaque extrémité par 2 mm de silicone médical. La procédure d'implantation est la suivante : les implants sont d'abord chargés dans un tube en plastique à bout pointu. Ensuite, une légère incision est pratiquée au niveau d'une zone du cou dépourvue de plumes et le tube est glissé sous la peau, parallèlement à la colonne vertébrale, jusqu'au bas du dos de l'animal. Les implants sont ensuite poussés hors du tube. Le lendemain, une vérification est faite afin de s'assurer que les implants sont toujours en

place. La réussite du traitement est visible après deux semaines par le développement de la glande cloacale (Sachs, 1967).

III.1.6) Tests comportementaux des animaux adultes

A l'âge de huit semaines, correspondant plus ou moins au moment où les animaux deviennent adultes, le comportement reproducteur mâle a été testé chez les deux sexes. On distingue deux grandes catégories de patrons comportementaux : le comportement appétitif qui renseigne sur la motivation de l'individu et le comportement consommatoire, ou l'acte de copulation proprement dit. Etant donné que, chez la caille, le comportement appétitif comme les contractions de la glande cloacale permettant de fabriquer une mousse qui facilitera la fertilisation de la femelle, n'est pas organisé par les hormones sexuelles, les tests se sont principalement axés sur le comportement consommatoire. Ce dernier se décline en quatre composantes successives hautement stéréotypées : la prise des plumes au niveau du cou de la femelle (Neck grab ou NG), la tentative de monte (Mount attempt ou MA), la monte (Mount ou M) et, enfin, les mouvements de contact cloacaux (Cloacal contact movement ou CCM) au terme desquels le mâle transfère généralement sa semence dans le cloaque de la femelle (Hutchison, 1978). A cela s'ajoute deux autres patrons comportementaux non organisés et dépendant des androgènes : le crow, vocalise attirant la femelle, et le strut, une parade pré et post-copulatoire (Balthazart, 2009). Chez un individu femelle normal, seuls le crow et le strut peuvent être exprimés si et seulement si cette dernière a été traitée avec de la testostérone (Balthazart, 2009).

Les sujets ont été testés dans un ordre aléatoire chaque jour entre huit et quatorze heures et les tests comportementaux se sont déroulés comme suit : les individus avaient la possibilité d'interagir avec une femelle stimulus placée dans une arène de test (30 cm x 70 cm x 60 cm) pendant une période de cinq minutes. Notons que ces femelles sont des animaux non traités occupant des cages communes sans aucun contact avec les sujets testés. Le nombre de chaque composante comportementale exprimée par l'individu ainsi que le moment (en secondes) où cette composante est exprimée pour la première fois étaient alors consignés. Au total, 11 tests ont été effectués afin de permettre aux sujets d'étude naïfs d'exprimer le comportement de manière optimale. En effet, de jeunes mâles inexpérimentés passent beaucoup de temps à essayer d'agripper correctement la femelle et de tenter de la monter sans tomber. A l'inverse, des individus plus expérimentés et motivés sont capables d'effectuer un CCM en quelques secondes.

En ce qui concerne le comportement appétitif, un test comptabilisant les contractions de la glande cloacale (RCSM ou Rhythmic Cloacal Sphincter Movement ; Balthazart et *al.*, 1998) a été réalisé. Le but était ici de déterminer si l'indométhacine exerçait un effet organisé en agissant sur la motivation des individus plutôt que sur leur patrons-moteurs au vu des tentatives de monte très basse de certains sujets. Pour ce faire, la zone entourant le cloaque des animaux a d'abord été déplumée afin de pouvoir observer la glande cloacale à tout instant. Les animaux ont été testés dans une arène en verre (40 cm x 20 cm x 25 cm) scindée en deux par une plaque de plexiglas transparente recouverte d'un morceau de carton et dont les côtés ont été rendus artificiellement opaques pour que l'animal ne soit pas perturbé par

l'environnement extérieur. Enfin, un miroir placé en dessous de l'aquarium permet à l'observateur de voir aisément la glande cloacale. Le test de RCSM s'effectue en deux temps : le sujet est d'abord placé dans un compartiment de l'arène sans pouvoir voir la femelle stimulus qui se trouve de l'autre côté. Le nombre de contractions de la glande cloacale est alors relevé pendant 2 minutes 30. Passé ce délai, le carton est retiré, permettant ainsi au mâle testé de voir la femelle stimulus. Les contractions de la glande sont alors à nouveau comptabilisées pendant 2 minutes 30 et traduisent cette fois l'intérêt sexuel de l'animal pour la femelle.

III.1.7) Sacrifice et fixation des cerveaux

Les animaux ont été sacrifiés à l'âge de dix semaines, quatre jours après la fin des tests comportementaux. Les animaux ont d'abord été pesés une dernière fois et la taille de la glande cloacale a été mesurée. Ils ont ensuite été sacrifiés, dans un ordre aléatoire, par décapitation rapide et une autopsie a été pratiquée afin de vérifier l'absence de gonades et la présence des deux implants de testostérone. Les cerveaux ont ensuite été disséqués hors du crâne et la pointe de la partie rostrale a été coupée avec une lame de rasoir afin de dégager les ventricules. Le tissu a été fixé avec de l'acroléine (FLUKA BioChemika) diluée à 5%. Pour ce faire, les cerveaux ont d'abord été plongés pendant 2h30 dans des fioles contenant une solution d'acroléine diluée à 5% dans du tampon phosphate salin (**PBS**) 0,01 M, afin de permettre une fixation optimale. Ils ont rapidement été rincés une première fois dans du PBS 0,01 M, puis plongés dans la même quantité de tampon pendant 30 minutes. Cette étape a ensuite été répétée une seconde fois pour retirer l'excès d'acroléine. Enfin, le tissu a été placé dans 20 ml d'une solution de sucrose à 30% en PBS 0,01 M fraîchement préparée afin de le cryoprotéger. Les cerveaux ont été conservés dans la solution et placés à 4°C jusqu'à ce que ces derniers coulent, signe qu'ils ont absorbés suffisamment de sucrose. Le tissu a ensuite été épongé afin de retirer l'excès de sucrose et empêcher la formation d'une couche de sucre autour de celui-ci lors de la congélation. Après quoi, les cerveaux ont été congelés sur de la carboglace puis stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

III.1.8) Marquage des fibres vasotocinergiques

Les cerveaux ont été découpés en sections de 30µm d'épaisseur avec un cryostat (Leica, CM3050S) selon un plan coronal le plus proche possible de celui défini par l'atlas stéréotaxique du poussin de poulet de Kuenzel et Masson (1988). Les sections ont ensuite été récoltées dans douze puits à partir du tractus septomésencéphalique (TSM) jusqu'au nerf III, repères marquant respectivement le début du POM et la fin de l'hypothalamus, et réparties en quatre séries de trois puits chacune. Les puits adjacents d'une même série sont séparés de 90µm tandis qu'au sein d'un même puits, deux coupes successives sont distantes de 330 µm. Les sections ont été conservées à -20°C après un transfert dans 1,5ml d'une solution cryoprotectrice (tampon tris salin 0,05M ; 1% polyvinyl pyrrolidone ; 30% saccharose ; 30% éthylène glycol) afin d'éviter tout dommage mécanique dû à la congélation. Sur les septante animaux sacrifiés, quarante-deux cerveaux ont été coupés de manière aléatoire, à raison de sept individus par sexe dans chaque groupe, et les régions d'intérêt pour le marquage des fibres vasotocinergiques ont été isolées afin de réduire le nombre de puits à manipuler lors des

marquages immunohistochimiques. Ces régions (POM, BNST et noyau septal latéral) sont comprises entre le TSM et la décussation supra-optique dorsale (DSD).

Le marquage des fibres vasotocinergiques a été effectué par immunohistochimie, procédure par laquelle un antigène d'intérêt est mis en évidence *in situ* par un, ou plusieurs, anticorps spécifique(s). Cette technique se décline en de nombreuses alternatives, dont celle employée ici qui comprend trois étapes : un anticorps primaire anti-vasotocine dirigé contre la vasotocine, un anticorps secondaire reconnaissant spécifiquement l'anticorps primaire et, enfin, un système tertiaire portant une peroxidase. Ce dernier système est basé sur l'affinité élevée de l'avidine pour la biotine et permet, après précipitation d'un chromogène grâce à l'activité de la peroxydase, la visualisation des sites où l'antigène est présent.

L'immunohistochimie a été réalisée sur coupes flottantes. Dans un premier temps, les sections ont été rincées trois fois pendant cinq minutes dans du tampon Tris salin (**TBS**) afin de les laver de toute trace de la solution cryoprotectrice. Elles ont ensuite été démasquées quinze minutes dans un bain de TBS contenant 0,1% de NaBH_4 pour casser les liens protéiques, dû à la fixation en acroléine, cachant les épitopes d'intérêt, puis à nouveau rincées à trois reprises pendant cinq minutes dans du TBS. Par la suite, les sections ont été incubées dans du TBS contenant 0,6% d' H_2O_2 durant trente minutes, afin de neutraliser les peroxidases endogènes et de limiter le marquage aspécifique. Après un autre rinçage de trois fois cinq minutes dans du TBS, les coupes ont été placées dans un mélange de TBST (soit du TBS et 0,1% de Triton X-100) et de sérum de chèvre 5% pendant une heure. Le sérum de chèvre sature le tissu et diminue à nouveau le risque d'un marquage aspécifique, tandis que le triton perméabilise la membrane cellulaire et optimise ainsi la pénétration des réactifs et des anticorps. Les sections ont ensuite été incubées à 4°C pendant deux nuits dans une solution contenant du TBST, du sérum de chèvre 5%, et enfin l'anticorps anti-vasotocine dilué à 1/2000 provenant d'un lapin. Cet anticorps a été produit par le Dr. D. G.Gray (Max Planck Institute, Bad Nauheim, Allemagne) et a été généreusement fourni par le Dr. G.C. Panzica (Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, Turin, Italie). Après deux jours, les coupes ont été rincées trois fois dans du TBS pendant cinq minutes, puis incubées à température ambiante pendant deux heures avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin biotinylé (Vector Laboratories) dilué à 1/400 en TBST. Passé cette étape, les sections ont été à nouveau rincées trois fois durant cinq minutes dans du TBS avant d'être incubées à température ambiante pendant 1h30 dans le vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) préparé du TBST (solution A diluée à 1/800 ; solution B diluée à 1/800). Ce réactif contient de l'avidine, une molécule présentant une forte affinité pour la biotine et permettant ainsi d'amplifier le signal, couplée à une peroxydase. Après un rinçage de trois fois cinq minutes dans du TBS, les coupes ont été incubées dans un mélange de TBS, H_2O_2 (0,012 %) et de diaminobenzidine (DAB ; 0,04%) pendant dix minutes. En présence d' H_2O_2 , la peroxydase catalyse la réaction de précipitation de la DAB en un composé de couleur brune qui permet d'observer les sites marqués au microscope optique. Un ultime rinçage de trois fois cinq minutes conclut l'immunohistochimie et les sections ont alors été montées sur des lames microscopiques dans l'ordre dans lequel elles avaient été coupées. Après avoir séché une nuit sous hotte, les lames

ont été plongées pendant dix minutes dans un bain de xylène avant d'être recouvertes de milieu de montage (Eukitt), préservant le tissu de la dégradation, et d'une lame couvre-objet.

III.1.9) Comptage des fibres vasotocinergiques

Les sections ont été analysées sous un microscope optique (Olympus BH-2) et les zones d'intérêt ont été photographiées avec une caméra (Modèle CFW-1612C, Scion Corporation, MD, USA) reliée à un ordinateur Macintosh (iMac, MacOS 10.4.11). Les photos ont été prises au grossissement 20x sur la coupe où la commissure antérieure atteint son extension maximale, afin d'y photographier la partie du POM la plus caudale. En cas de problème du plan de coupe, les clichés ont été pris une section avant ou après afin de corriger l'orientation de ce dernier et de standardiser la quantification. Au total, quatre photographies ont été prises par animal, soit deux par hémisphère. Afin d'assurer l'homogénéité de ces photos, un protocole a été mis en place : tout d'abord, le système magnocellulaire séparant le POM gauche et droit a été positionné parallèlement à l'écran. Le premier champ (370 x 280 μm) de la caméra a ensuite été placé ventralement par rapport à la commissure, de sorte que seules les fibres du POM soient visibles, et une première photo a alors été prise. Un repère quelconque a été choisi et le champ a été déplacé ventralement jusqu'à ce que ce repère disparaisse de l'écran, après quoi le deuxième cliché a été effectué, permettant *in fine* d'englober l'entièreté de la zone contenant les fibres vasotocinergiques (370 x 560 μm , soit 207200 μm^2). La manipulation a ensuite été répétée à l'autre hémisphère pour autant qu'aucun dommage mécanique n'ait détruit une partie de l'autre POM.

Une fois les sections photographiées, la quantification a été effectuée avec le logiciel ImageJ. Pour chaque image, une méthode semi-quantitative a été appliquée où le pourcentage de surface marquée par les fibres vasotocinergiques, ou aire fractionnée, a été arbitrairement définie au moyen d'un seuil. Les 2 valeurs obtenues pour le POM d'un hémisphère ont été sommées et une moyenne a été calculée pour les valeurs globales obtenues pour chaque hémisphère.

III.1.10) Analyse statistique

Pour l'analyse des tests comportementaux, des ANOVAs à deux critères avec le test comme facteur répété et le traitement comme facteur indépendant ont été effectuées sur le nombre de RCSM, les fréquences et les latences des MA et des CCM avec le logiciel R. Le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p est inférieure ou égale à 5% ($p \leq 0,05$). Lorsque le résultat était significatif, une analyse post-hoc (test HSD de Tukey) a été effectuée afin de mettre en évidence le groupe dont la moyenne diffère statistiquement de celle des autres. En ce qui concerne le comptage des fibres, une ANOVA à deux critères (sexe et traitement, mesures indépendantes) a été réalisée selon les mêmes modalités et avec le même logiciel. Enfin, la validation du traitement à l'indométhacine a été vérifiée par une ANOVA à trois critères (traitement, âge et sexe, mesures indépendantes), toujours avec le même logiciel et dans les mêmes conditions.

III.2) Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles

III.2.1) Embryons et conditions d'incubation

Pour cette expérience, 240 œufs ont été incubés dans un incubateur (MG 140/200 rural, FIEM) à 37,8 °C et à 47 % d'humidité. Les embryons ont été collectés aux 9^{ième}, 12^{ième} et 14^{ième} jours embryonnaires ainsi qu'un jour après la naissance (PN1). Dans ce dernier cas, les œufs ont été placés dans des paniers d'incubation deux jours avant leur éclosion, et l'humidité a alors été augmentée à 60%. Pour chaque condition, vingt individus ont été sacrifiés (approximativement dix femelles et dix mâles). Ces stades de développement ont été sélectionnés afin de suivre au mieux la colonisation du cerveau par la microglie ainsi qu'en fonction de l'action organisatrice clé que jouent les œstrogènes.

III.2.2) Récolte des cerveaux et fixation

Afin de récolter le tissu nerveux embryonnaire, les œufs ont été ouverts avec une paire de ciseaux au niveau du côté arrondi de l'œuf afin de ne pas blesser l'embryon. Ce dernier a été rapidement décapité et sexé par observation de ses gonades. Chez la caille, il est en effet possible de différencier à l'œil nu mâles et femelles à partir du 7^{ième} jour d'incubation (Intarapat & Satayalai, 2014). Les gonades se présentent sous la forme de masses blanchâtres en forme de grain de riz situées au dessus des reins et présentent, durant les premiers jours du développement, la même taille chez les deux sexes. A partir du 7^{ième} jour d'incubation, les mâles conservent ces deux amas qui deviendront les testicules tandis que, chez les femelles, seul l'ovaire gauche se développera: l'ovaire droit, lui, régresse (Intarapat & Satayalai, 2014). Au niveau de la dissection du cerveau, la peau et les os du crâne ont d'abord été retirés et le cerveau mis à nu. Ensuite, une spatule a été placée au niveau des pointes rostrales puis glissée sous le plancher du parenchyme nerveux. Le cerveau a ainsi été extrait de la boîte crânienne, fixé avec de l'acroléine 5%, puis cryoprotégé dans du sucrose 30% suivant la procédure détaillée précédemment.

III.2.3) Marquage immunohistochimique de la microglie

Sur base du papier de Aste et *al.*, 2010, les cerveaux embryonnaires ont été coupés, selon un plan coronal, avec un cryostat (Leica, CM3050S) en sections de 20µm d'épaisseur entre le TSM et les lobes optiques, puis directement montés sur lame. Au total, quatre séries d'une lame chacune ont été récoltées et stockées à -20°C jusqu'à utilisation. Un marquage immunohistochimique de la microglie a ensuite été réalisé sur les lames avec un marqueur des cellules microgliales (QH1, provient d'une souris, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa) tel que vu dans Cuadros et *al.*, 2006. Le protocole du marquage est, quant à lui, identique à celui présenté dans la section III.1.8. Les lames ont donc été rincées avec du TBS entre chaque étape, incubées dans du NABH₄, de l'H₂O₂, et du sérum de chèvre dans les mêmes concentrations et dans les mêmes tampons que décrit précédemment. En ce qui concerne l'anticorps primaire, QH1, ce dernier a été dilué 1/4 et les lames ont été incubées durant une nuit à température ambiante. Comme le marquage s'effectuait directement sur lame, un couvre-objet a été placé afin d'optimiser le recouvrement des sections par

l'anticorps. Pour les mêmes raisons, un couvre-objet a également été placé sur les lames lors de l'étape d'incubation à température ambiante avec l'anticorps secondaire (chèvre anti-souris 1/400, Dako). Enfin, la révélation a été à nouveau effectuée de la même façon, aux mêmes concentrations et avec les mêmes tampons que dans la section III.1.8. (vectastain Elite ABC, DAB et H₂O₂). Les coupes ont ensuite été recouvertes d'un milieu de montage (Eukitt) et d'une lame couvre-objet. Au total, quarante-huit lames ont été marquées soit douze lames pour chaque âge étudié (six mâles et six femelles).

III.2.4) Comptage de la microglie et caractérisation de sa morphologie

Les sections ont été analysées sous un microscope optique (Leica DMRB E2.100, Leica microsystems, Belgium) et les zones d'intérêt ont été photographiées avec une caméra (Modèle DFC 480 R2) reliée à un ordinateur (Windows). Les photos ont été prises au grossissement 40x, sur la coupe où la commissure antérieure atteint son extension maximale, afin de se trouver au niveau de la partie la plus caudale du POM. En cas de problème du plan de coupe ou de dommage sur la section considérée, les clichés ont été pris une section avant ou après afin de corriger l'orientation du plan de coupe et de standardiser la quantification. Pour chaque lame, deux photographies ont été prises, soit une par hémisphère. Pour ce faire, le champ (350 x 260 µm, soit 91 000 µm²) a été placé ventralement à la commissure, là où le POM se trouve, et le cliché a été pris en essayant d'englober une quantité de microglie la plus homogène possible. Le protocole a ensuite été répété à l'autre hémisphère. Dans le cas où une section ne contenant pas la commissure a été choisie, le champ a été placé de manière la plus équivalente possible.

Une fois les sections photographiées, la quantification a été effectuée avec le logiciel ImageJ. Pour chaque image, une méthode de comptage arbitraire a été définie où les différents types de cellules microgliales ont été recensés avec un pointeur de couleur différente, exception faite des cellules ne se trouvant pas entièrement dans le champ et qui n'ont dès lors pas été comptabilisées. Quatre morphologies distinctes ont été quantifiées comme vu dans la **figure 3** : la microglie amœboïde, la microglie à processus courts, la microglie à prolongements longs et épais et, enfin, celle à ramifications longues et fines ou quiescente. Le nombre total de cellules microgliales *nonobstant* leur morphologie a également été déterminé. Une moyenne a ensuite été calculée pour les valeurs globales obtenues pour chaque hémisphère des cellules microgliales de chaque type ainsi que de la quantité totale de microglie.

III.2.5) Analyse statistique

Des ANOVAs à deux critères (âge et sexe, mesures indépendantes) ont été effectuées, avec le logiciel R, sur le nombre total de cellules microgliales et la quantité de microglie pour chaque morphologie. Le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p est inférieure ou égale à 5% ($p \leq 0,05$). Lorsque le résultat était significatif, une analyse post-hoc (test LSD de Fisher) a été effectuée afin de mettre en évidence le groupe dont la moyenne diffère statistiquement de celle des autres.

III.3) Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE₂ dans l'HPOA mâles et femelles à différents stades de développement

III.3.1) Embryons et conditions d'incubation

Pour cette expérience, 150 œufs ont été incubés dans un incubateur (MG 140/200 rural, FIEM) à 37,8 °C et à 47 % d'humidité. Les embryons ont été collectés aux 7^{ième}, 9^{ième}, 12^{ième} et 14^{ième} jours embryonnaires ainsi qu'un jour après la naissance (PN1). Dans ce dernier cas, les œufs ont été placés dans des paniers d'incubation deux jours avant leur éclosion, et l'humidité a alors été augmentée à 60%. Pour chaque condition, une vingtaine d'individus ont été sacrifiés. Ces stades de développement ont été sélectionnés car ils offrent un large intervalle pour étudier l'évolution de la concentration en PGE₂ entre mâles et femelles. Le choix de commencer au 7^{ième} jour d'incubation est quant à lui motivé par le fait que la période sensible et, donc l'action organisatrice des œstrogènes, vient tout juste de commencer.

III.3.2) Récolte des HPOA et dosage de PGE₂

Les étapes de sexage ainsi que de mise à nu du cerveau ont été effectuées comme décrit dans la section III.2.2. L'HPOA a ensuite été disséquée en prenant comme repères dorso-ventraux le TSM et l'éminence médiane, après quoi le carré compris entre ces deux zones a été incisé et retiré réalisant des incisions latérales avec une paire de ciseaux ophtalmiques (**Fig.6**). Les HPOA ont ensuite été congelés sur carboglace et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Le dosage de la PGE₂ a été réalisé par Marianne Fillet et Gwenaël Nys (Laboratoire d'analyse des médicaments, département de pharmacie, CIRM, ULg) en utilisant la chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à une détection par spectromètre de masse en tandem. Les échantillons ont tout d'abord été préparés suivant un protocole s'inspirant de l'article de Brose et *al.* (2013) : les HPOA ont été mélangés avec du méthanol contenant le standard interne à une concentration de 500 pg/ml (PGE₂-d9) selon un ratio 9:1 (9µl de méthanol pour 1 mg de tissu) dans des tubes Precellys (Lysing kit, Bertin technologies) contenant des billes de lysing. Ces tubes ont ensuite été placés dans l'homogénéiseur Precellys (Bertin technologies) pendant 15 secondes à 5000 RPM afin de broyer le tissu. Les échantillons ont alors été centrifugés pendant 15 minutes à 10000g afin d'isoler la PGE₂ des débris cellulaires puis le surnageant a été récupéré et placé à -80°C. Si un précipité se forme, l'étape de centrifugation et de récupération du surnageant est répétée. Lorsque plus aucun précipité n'était observé, 50 µl d'échantillon ont été transférés dans un vial d'analyse. Les résultats ont été normalisés par rapport à la masse de l'HPOA initial. 2µl de chaque échantillon ont été injectés dans une colonne Kinetex F5 de 100x2.1 (longueur et diamètre interne, respectivement), constituée de particules de 2,6 µm de diamètre (phase stationnaire ; Phenomenex, Torrance, CA) et poussés au travers de celle-ci par deux liquides appelés les phases mobiles (phase mobile A : eau ULC-MS contenant 0,1 mM de fluorure d'ammonium ; phase mobile B : un mélange 50:50 d'acétonitrile et de méthanol ULC-MS) à un débit de 0,54ml/min. Au total, chaque échantillon a séjourné quatre minutes dans la colonne, la phase stationnaire présente dans cette dernière permettant de séparer et d'isoler la PGE₂ d'autres prostaglandines, avant d'être vaporisé sous forme de micro gouttelettes par une source électrospray. Ces gouttes libèrent des molécules ionisées en phase gazeuse qui sont ensuite

analysées par un triple quadripôle (triple Quad LC/MS 6495, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en mesurant le rapport de la masse et de la charge de l'ion. Les données de mesure de la PGE₂ ont ensuite été acquises en utilisant le logiciel MassHunter Workstation (version B.07.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

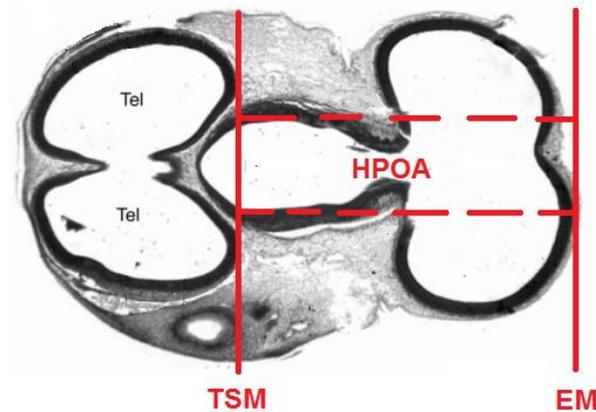


Figure 6. Schéma délimitant l'HPOA dans un cerveau en coupe frontale de caille au 6ème jour d'incubation. Légende : Tel = Télencéphales ; TSM = Tractus septomésencéphalique ; EM = Eminence médiane. Adapté de *Striedter & Charvet, 2008*.

III.3.3) Analyse statistique

Une ANOVA à deux critères (âge et sexe, mesures indépendantes) a été effectuée, grâce au logiciel R, sur la concentration en PGE₂ dans l'HPOA au cours du développement chez des embryons mâles et femelles. Le résultat est considéré comme significatif lorsque la valeur p est inférieure ou égale à 5% ($p \leq 0,05$).

IV. Résultats :

IV.1) Expérience 1 : inhibition de la production de PGE₂ par l'indométhacine

L'analyse de la concentration de PGE₂ mesurée dans les HPOA d'animaux traités avec l'indométhacine, quatre heures avant le sacrifice, montre une diminution significative de la production de la prostaglandine E₂ aux deux âges étudiés sans que cette dernière ne soit entièrement inhibée pour autant (**Fig.7**). L'ANOVA à trois critères (sexe, âge et traitement) confirme ces observations et met en évidence un effet du traitement ($F_{1,19} = 12,253$; $p = 0,002$) mais pas un effet de l'âge ($F_{1,19} = 0,744$; $p = 0,399$), du sexe ($F_{1,19} = 1,270$; $p = 0,274$) ou de l'interaction entre les trois facteurs testés (âge*sexe : $F_{1,19} = 1,967$; $p = 0,177$; âge*traitement : $F_{1,19} = 0,041$; $p = 0,841$; âge*sexe : $F_{1,19} = 1,058$; $p = 0,317$; âge*traitement*sexe : $F_{1,19} = 2,108$; $p = 0,163$)

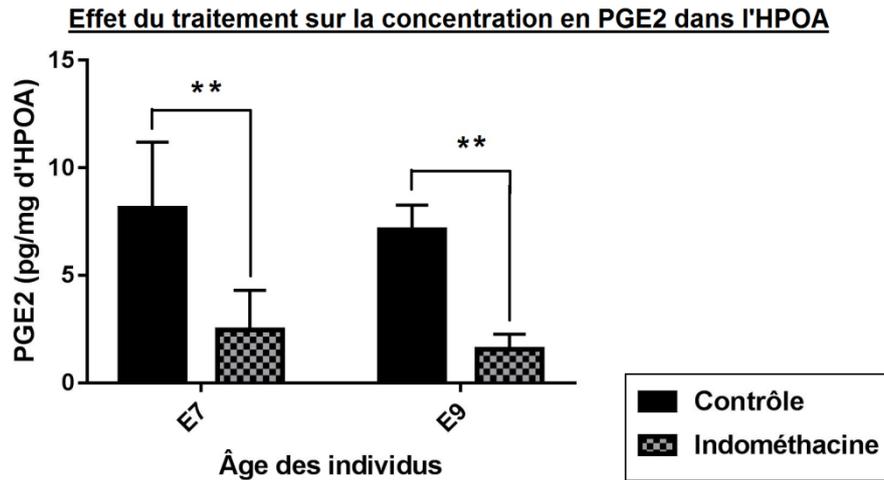


Figure 7. Effet de l'indométhacine sur la concentration pré-optique/hypothalamique de PGE₂. L'analyse met en évidence la différence significative entre animaux traités et contrôles aux 7^{ième} et 9^{ième} jours d'incubation, respectivement. Nombre d'individus par groupe : E7 contrôle (n = 6 ; 4 mâles et 2 femelles) ; E7 indo (n = 5 ; 1 femelle et 4 mâles) ; E9 contrôle (n = 8 ; 4 femelles et 4 mâles) ; E9 indo (n = 8 ; 4 femelles et 4 mâles). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Données brutes fournies par Gwenaël Nys. ** p < 0,01.

IV.2) Expérience 1 : Résultats des tests comportementaux

IV.2.1) Comportement consommatoire

Les résultats comportementaux montrent une dichotomie claire entre mâles et femelles. En effet, toutes les femelles ont ignoré la femelle stimulus tandis que tous les mâles ont montré la séquence comportementale complète. Deux de ces composantes nous intéressent principalement ici : la tentative de monte (MA), signe que l'individu est intéressé sexuellement par la femelle, et la copulation proprement dite, à savoir les mouvements de contacts cloacaux (CCM). Nous avons donc comparé la fréquence et la latence de ces comportements entre les différents groupes (**Fig.8** et **Fig.9**). Les mâles traités présentent une fréquence moyenne de CCM moins élevée que celle des contrôles avec un effet visuellement plus marqué chez les sujets traités au 7^{ième} jour embryonnaire (**E7**). On remarque également que les animaux injectés au 9^{ième} jour (**E9**) finissent par atteindre un niveau de copulation semblable aux contrôles à la fin de l'expérience. *A contrario*, la fréquence des MA ne permet pas de discerner une différence entre les groupes. L'analyse des latences suggère des résultats analogues où les mâles traités prennent plus de temps pour copuler par rapport aux contrôles, avec à nouveau les individus traités au 7^{ième} jour embryonnaire montrant un effet plus marqué que ceux traités au jour 9, et ceux injectés à E9 finissant par copuler, lors des derniers tests, avec une latence similaire à celle des contrôles. La latence des MA ne montre, quant à elle, pas de différence entre groupes.

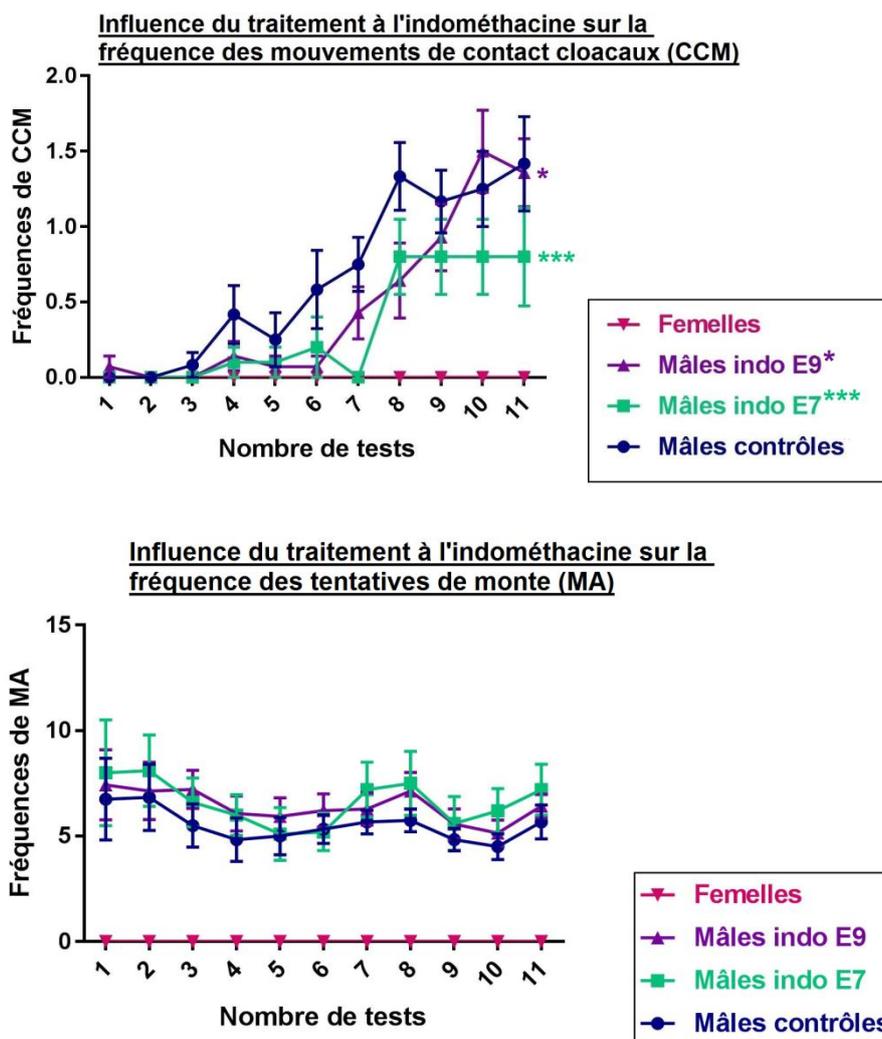


Figure 8. Fréquences moyennes de MA et de CCM suite au traitement d'indométhacine (Indo) reçu le jour E7 ou E9. Puisque l'ensemble des femelles n'a pas montré de comportement mâle, les différents groupes ont été rassemblés en un seul pour plus de clarté. Nombre d'individus par groupe : mâles indo E7 (n=10), femelles indo E7 (n=11), mâles indo E9 (n=14), femelles indo E9 (n=15), mâles contrôles (n=12), femelles contrôles (n=8). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). *, *** $p < 0,05$ et $0,001$, respectivement, par rapport aux mâles contrôles (Tukey HSD sur l'effet traitement de l'ANOVA).

Ces observations sont confirmées par les analyses ANOVAs comparant l'effet du traitement au cours de la répétition des tests comportementaux réalisés sur les mâles. En effet, puisque les femelles n'ont pas manifesté le moindre comportement mâle durant l'expérience, elles ont été exclues des analyses statistiques étant donné le manque évident de variabilité de ces données et la violation subséquente du principe de l'ANOVA. De la même façon, les données des fréquences de CCM des mâles durant les deux premiers tests n'ont pas pu être prises en compte dans les analyses statistiques car aucun des sujets n'a montré ce comportement, résultant à nouveau en un manque de variabilité entraînant la violation du principe de l'ANOVA. Les ANOVAs révèlent un effet de la répétition des tests pour toutes les variables étudiées ($F_{8,264} < 28,319$; $p > 0,001$; **Tabl.2**, Annexe). L'analyse des fréquences des CCM durant les tests 3 à 11 met en évidence un effet du traitement ($F_{2,33} = 3,314$; $p = 0,049$). Il en est de même pour la latence de CCM mesurée sur l'ensemble des tests ($F_{2,33} = 4,526$; $p =$

0,018). Le test HSD de Tukey montre que les fréquences et latences de CCM des deux groupes traités avec l'indométhacine sont significativement différentes du groupe contrôle. Par contre, aucun effet du traitement n'a été observé pour les fréquences et latences de MA (Fréquences : $F_{2,33} = 0,589$ et $p = 0,561$; Latences : $F_{2,33} = 0,464$ et $p = 0,633$). Enfin, une interaction entre les deux facteurs a été révélée uniquement pour les latences de CCM ($F_{20,330} = 1,715$; $p = 0,03$). Le test HSD de Tukey analysant cette interaction met en évidence une différence significative entre le groupe de mâles injectés à E7 et ceux du groupe contrôle lors du 7^{ème} test. Cette même analyse montre également une différence significative entre les premiers et les derniers tests (Table 3, Annexe) au sein des 3 groupes de mâles.

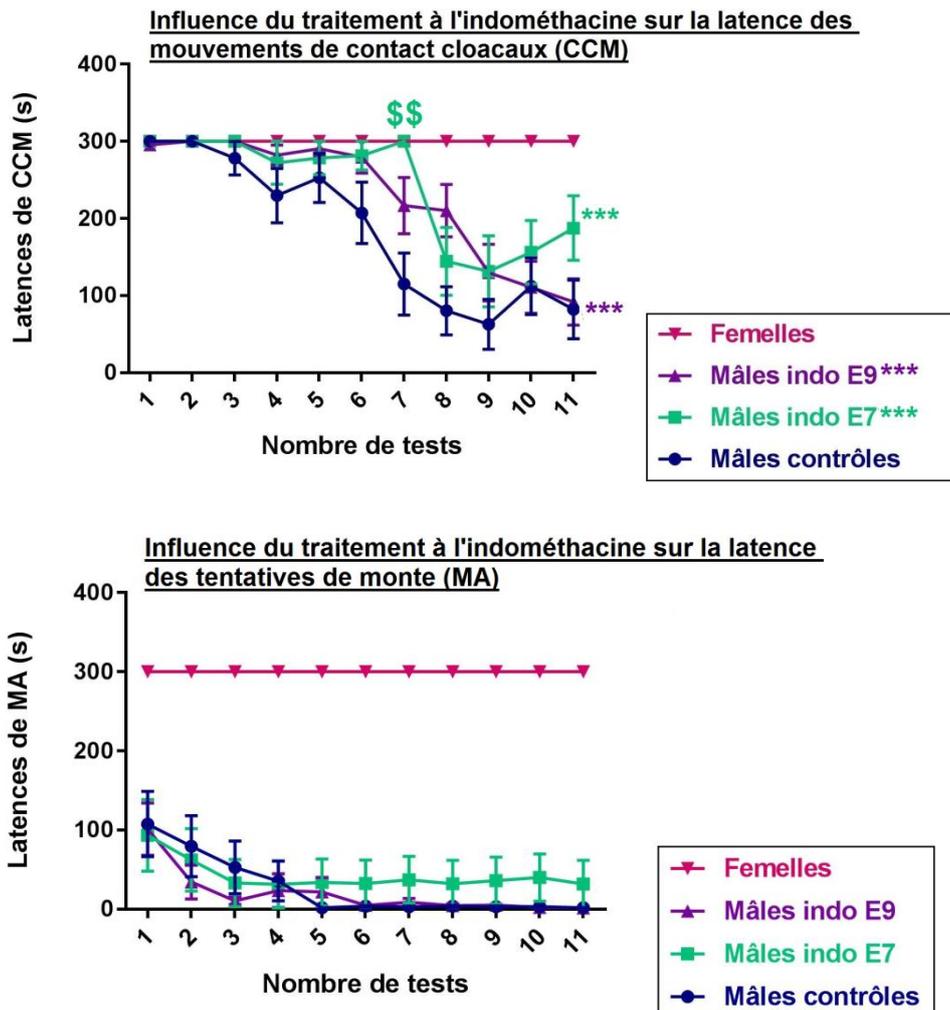


Figure 9. Latences moyennes de MA et de CCM suite au traitement d'indométhacine (Indo) reçu le jour E7 ou E9. Puisque l'ensemble des femelles n'a pas montré de comportement mâle, les différents groupes ont été rassemblés en un seul pour plus de clarté. Nombre d'individus par groupe : mâles indo E7 (n=10), femelles indo E7 (n=11), mâles indo E9 (n=14), femelles indo E9 (n=15), mâles contrôles (n=12), femelles contrôles (n=8). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). *** $p < 0,001$ par rapport aux mâles contrôles (Tukey HSD sur l'effet traitement de l'ANOVA). \$\$ $p < 0,01$ par rapport au mâles contrôles (Tukey HSD sur l'interaction des facteurs de l'ANOVA). Afin de ne pas alourdir le graphique, les interactions significatives séparant les premiers et les derniers tests au sein des groupes de mâles n'ont pas été représentées mais ces résultats sont consultables dans le tableau 3.

IV.2.2) Comportement appétitif

L'observation de la **figure 10** montre que le nombre de contractions de la glande cloacale de tous les animaux en l'absence de femelle stimulus est plus faible que celui observé lorsque la femelle est visible. Mâles et femelles présentent une fréquence de RSCM similaire lorsque la femelle stimulus est absente. Par contre, en sa présence, les mâles contractent leur glande plus fréquemment que les femelles. Enfin, en l'absence de femelle, les mâles et femelle ayant reçu l'indométhacine au 7^{ième} jour embryonnaire montrent en moyenne un plus grand nombre de contractions que les sujets contrôles.

L'ANOVA avec comme critères le sexe et le traitement a révélé un effet significatif du traitement sur la fréquence de RSCM produits en l'absence visuelle de la femelle ($F_{2,64} = 3,63$; $p = 0,032$). L'analyse post-hoc (HSD Tukey) a révélé une différence significative entre le groupe traité à E7 et les contrôles. Lorsque la femelle est visible, par contre, aucun effet du traitement n'a été observé mais bien un effet sexe ($F_{1,64} = 0,038$; $p = 0,008$). Il n'existe également pas d'interaction entre l'effet sexe et l'effet traitement dans les deux cas (Femelle absente : $F_{2,64} = 0,965$ et $p = 0,386$; Femelle présente : $F_{2,64} = 0,417$ et $p = 0,661$).

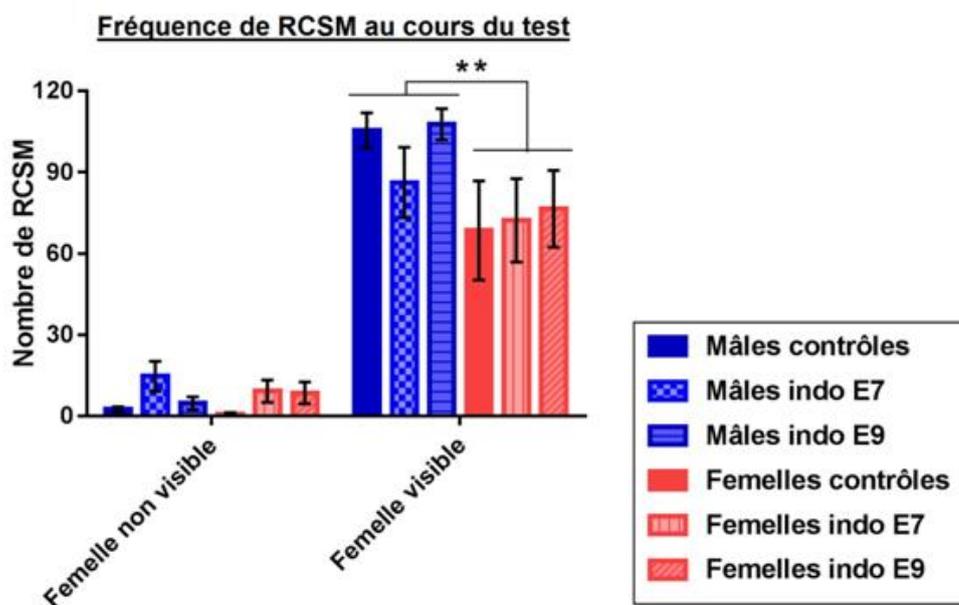


Figure 10. Fréquence de RSCM mesurés après un test. Nombre d'individus par groupe : mâles indo E7 (n=10), femelles indo E7 (n=11), mâles indo E9 (n=14), femelles indo E9 (n=15), mâles contrôles (n=12), femelles contrôles (n=8). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). ** $p < 0,01$ (Tukey HSD après un effet principal du sexe).

IV.3) Expérience 1 : Résultats du comptage des fibres vasotocinergiques

Sur les quarante-deux cerveaux colorés pour la vasotocine dans cette expérience, certains ont été exclus des analyses statistiques en raison d'un plan de coupe inadéquat ou de débris présents sur la zone d'intérêt. Un sujet contrôle a également été supprimé en raison de la densité aberrante (plus de trois écarts-types) qu'il présentait comparé à la moyenne du groupe (7% contre 22% de moyenne globale). Cet individu n'avait par ailleurs jamais copulé lors des

tests comportementaux. Une analyse descriptive montre à première vue une dichotomie marquée entre mâles et femelles (**Fig.11**). En effet, les mâles présentent en moyenne un pourcentage plus élevé de fibres immunoréactives pour la vasotocine comparé aux femelles. Une observation plus fine révèle un nombre de fibres légèrement plus élevé chez les mâles contrôles par rapport aux mâles traités avec l'indométacine, la différence la plus importante concernant les animaux ayant reçu le traitement à E9. Une telle différence n'est cependant pas visible chez les femelles.

L'ANOVA à deux critères (sexe et traitement) confirme l'effet sexe ($F_{1,30} = 144,111$; $p < 0,001$) mais l'absence d'effet du traitement ($F_{2,30} = 1,578$; $p = 0,223$), et d'interaction entre les deux facteurs ($F_{2,30} = 1,158$; $p = 0,328$) ne supporte pas l'effet du traitement chez les mâles suggéré par l'observation de la figure 11.

Pourcentage de fibres vasotocinergiques dans le POM selon les groupes

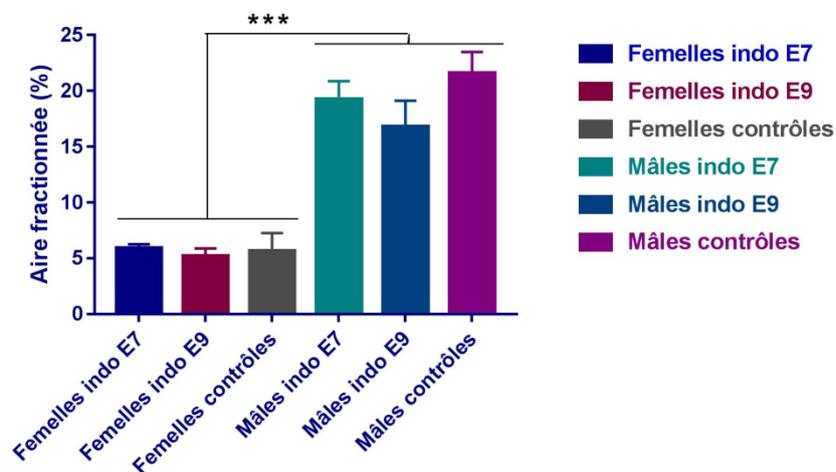


Figure 11. Représentation de la densité en fibres vasotocinergiques dans le POM. Nombre d'individus par groupe : mâles indo E7 (n=7), femelles indo E7 (n=6), mâles indo E9 (n=5), femelles indo E9 (n=6), mâles contrôles (n=6), femelles contrôles (n=6). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). *** $p < 0,001$.

IV.4) Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles

Cette expérience prenait en compte quatre morphologies distinctes de la microglie : deux morphotypes activés (amœboïde et courts processus), un intermédiaire (processus épais) et un morphotype non activé ou quiescent (longs et fins processus). Toutefois, seules les morphologies activées et intermédiaire ont été recensées au cours des comptages (**Fig. 12**). De manière générale, le morphotype à courts processus est en moyenne celui le plus fréquent *nonobstant* le sexe et l'âge. Mâles et femelles présentent des courbes similaires pour toutes les morphologies, exception faite du 12^{ème} jour d'incubation où les femelles possèdent en moyenne plus de microglie que les mâles (**Fig.13**). Cette différence est particulièrement marquée pour les cellules à courts processus (**Fig.14**).

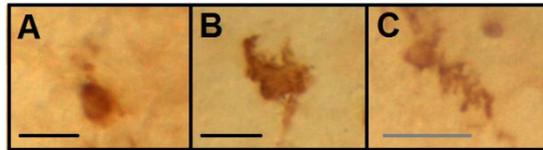


Figure 12. Photographies illustrant les trois morphologies recensées au grossissement 40x (A = amœboïde ; B = courts processus ; C = processus épais). Echelle : ligne noire = 10 μ m ; ligne grise : 30 μ m.

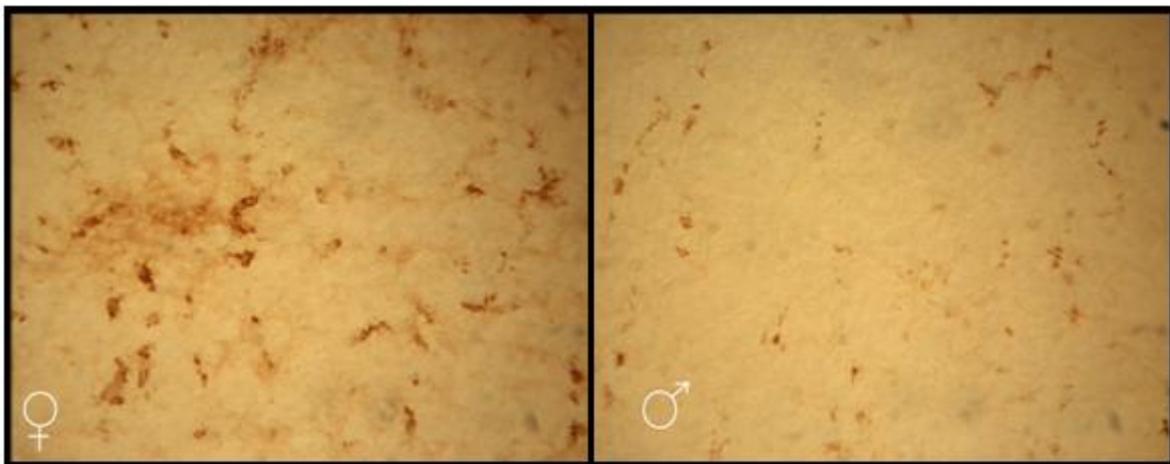
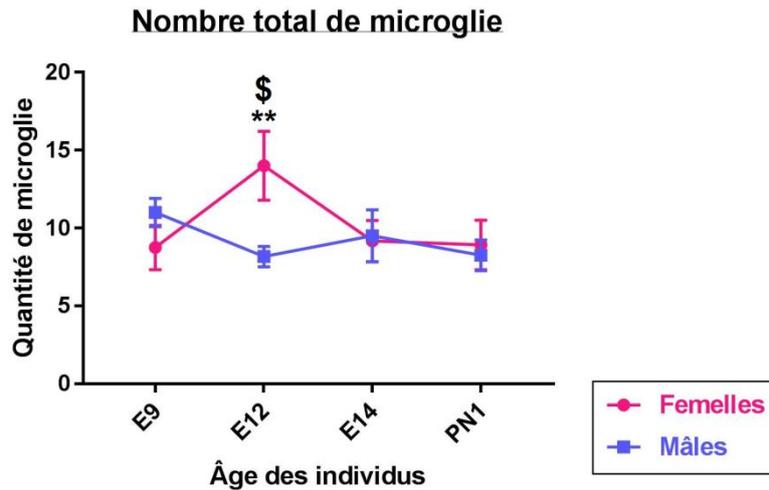


Figure 13. En haut : nombre total de cellules microgliales au cours du développement embryonnaire chez les mâles et les femelles. Nombre d'individus par âge : mâles (n=6), femelles (n=6). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). **p < 0,01 par rapport aux mâles du même âge ; §p < 0,05 par rapport aux sujets du même sexe à E9, E14, et PN1 (Fisher LSD sur l'interaction des facteurs de l'ANOVA). En bas : illustration prise à un grossissement 40x de la différence de nombre de cellules microgliales chez une femelle (à gauche) et un mâle (à droite) E12.

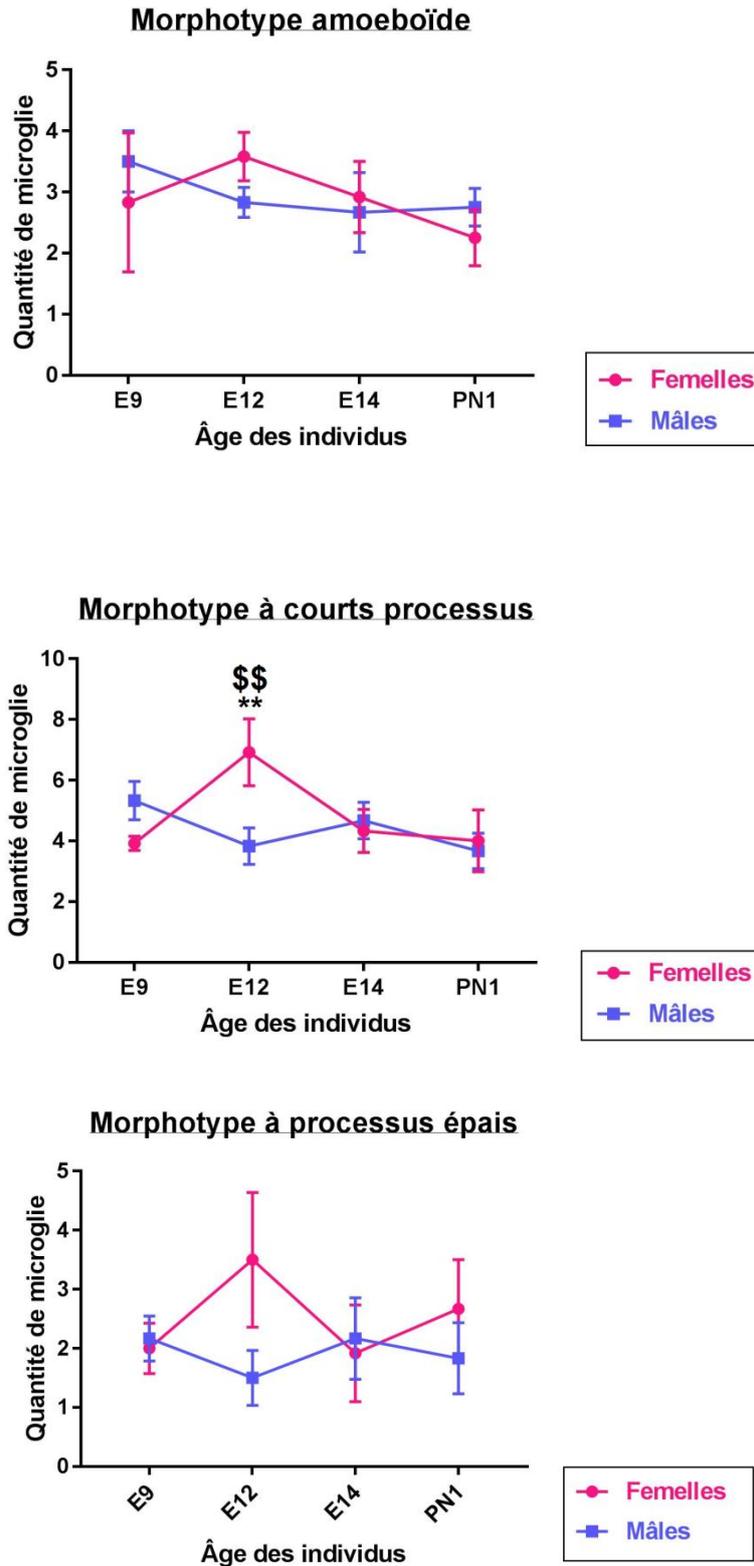


Figure 14. Nombre de cellules microgliales au cours du développement embryonnaire chez les mâles et les femelles. Nombre d'individus par âge : mâles (n=6), femelles (n=6). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). **p < 0,01 par rapport aux mâles du même âge ; \$\$p < 0,01 par rapport aux sujets du même sexe à E9, E14, et PN1 (Fisher LSD sur l'effet de l'interaction des facteurs de l'ANOVA).

Aucun effet du sexe ($F_{1,40} < 1,441$; $p > 0,237$), ni de l'âge ($F_{3,40} < 1,479$; $p > 0,235$) n'a été révélé par les ANOVAs à deux critères (âge et sexe) sur les différentes variables analysées, mais l'analyse montre une interaction statistiquement significative entre les deux facteurs pour le morphotype à courts processus et la quantité totale de microglie (Morphotype amœboïde : $F_{3,40} = 0,616$; $p = 0,608$; Morphotype courts processus : $F_{3,40} = 3,408$; $p = 0,026$; Morphotype processus épais : $F_{3,40} = 1,094$; $p = 0,363$; Quantité totale de microglie : $F_{3,40} = 2,940$; $p = 0,045$). L'analyse post-hoc révèle une différence entre les mâles et les femelles à E12 ainsi qu'une différence entre les femelles à E12 par rapport aux femelles des trois autres âges et ce, pour les deux variables considérées.

IV.5) Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE₂ dans l'HPOA mâles et femelles à différents stades de développement

L'analyse de l'évolution de la concentration de PGE₂ au cours de la seconde moitié du développement embryonnaire montre que la PGE₂ est détectable à tous les âges testés et que la concentration de PGE₂ augmente au fur et à mesure du développement de l'embryon avant d'atteindre son maximum au dernier âge étudié, soit PN1 (**Fig.15**). Mâles et femelles présentent une courbe d'évolution quasiment identique où les seules différences mineures se situent au 12^{ième} jour d'incubation et au premier jour de vie. L'ANOVA à deux critères (âge et sexe) confirme l'analyse descriptive et met en évidence un effet de l'âge ($F_{4,29} = 26,81$; $p < 0,001$) mais pas du sexe ($F_{1,29} = 0,363$; $p = 0,551$), ni d'interaction entre les deux facteurs ($F_{4,29} = 0,226$; $p = 0,921$).

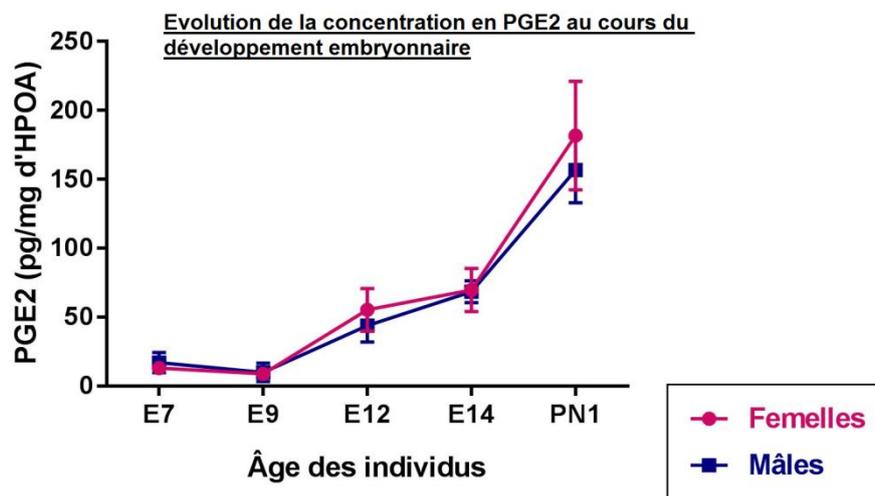


Figure 15. Concentration en PGE₂ dans l'HPOA de E7 à la naissance. Nombre d'individus par groupe : E7, E12, E14, PN1 (4 mâles, 4 femelles) ; E9 (4 mâles, 3 femelles). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Données brutes fournies par Gwenaël Nys.

V. Discussion :

L'objectif de ce travail était triple : premièrement, déterminer l'implication de la prostaglandine E_2 dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille japonaise. L'implication de la PGE_2 pourrait expliquer la dichotomie observée entre mammifères et oiseaux par rapport aux effets précoces de l'œstradiol.

Deuxièmement, qualifier et quantifier la microglie dans l'aire pré-optique d'embryons mâles et femelles sélectionnés à différents stades de développement afin de déterminer l'existence d'une différence sexuelle permettant d'apporter des éléments de réponse à l'idée de McCarthy selon laquelle la différence observée chez les rats résulterait d'une réponse immunitaire de la mère dirigée contre ses fœtus mâles.

Enfin, effectuer un suivi de la concentration en PGE_2 dans le cerveau en développement pour tester, chez l'embryon de caille, la présence de la prostaglandine E_2 et l'existence d'une différence sexuelle.

Globalement, nos résultats montrent que l'injection d'indométhacine durant la période sensible n'a aucun effet sur les femelles, aucune d'entre elles n'ayant montré le comportement typiquement masculin. Par contre, l'indométhacine interfère avec la copulation *sensu stricto* des mâles, avec un effet plus marqué sur le groupe injecté au début de la période de différenciation sexuelle, mais pas sur leur motivation à copuler, ni sur l'innervation vasotocinergique de leur POM. Ces résultats révèlent également l'existence d'une différence sexuelle au niveau de la quantité et de la morphologie de la microglie au douzième jour d'incubation (E12) : en effet, les femelles possèdent plus de cellules microgliales que les mâles et environ deux fois plus de cellules activées (morphotype à courts processus). Enfin, nos résultats démontrent que la PGE_2 est effectivement présente chez l'embryon et que sa concentration augmente graduellement au cours du développement embryonnaire de manière similaire chez les mâles et les femelles. Ces résultats seront d'abord interprétés expérience par expérience avant d'être discutés ensemble.

V.1) Expérience 1 : inhibition de la synthèse de la prostaglandine E_2 et influence sur la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement reproducteur mâle

Les mesures de PGE_2 dans les HPOA récoltés quatre heures après injection d'indométhacine suggèrent que la dose administrée (50 μ g) réduit de façon statistiquement significative mais n'inhibe pas complètement la synthèse de PGE_2 à E7 et E9. Aucun effet du traitement n'a été observé au niveau de l'innervation vasotocinergique du POM, qui montre par ailleurs la différence sexuelle attendue. Les analyses comportementales ont, quant à elles, révélé une claire différence entre sexes dans l'expression du comportement copulatoire (qui n'a pu être confirmée statistiquement en raison de l'absence de variabilité chez les femelles, même si celles-ci fournissent un résultat non-équivoque puisqu'elles n'ont montré aucun comportement mâle). Les analyses démontrent également une réduction significative, bien qu'incomplète, du comportement copulatoire mâle, mise en évidence par une diminution de la fréquence de CCM et une augmentation parallèle de leur latence d'apparition, suite à l'inhibition des COX durant la période critique pour la différenciation du cerveau. Par contre,

aucun effet du traitement n'a été observé sur le comportement appétitif. Enfin, comme attendu, nous constatons un effet de la répétition des tests chez tous les mâles, quel que soit leur traitement, pour les fréquences et latences de CCM ainsi qu'une interaction entre le traitement et le test au niveau des latences de CCM.

L'effet de la répétition du test est facilement expliqué par l'expérience gagnée au cours de l'étude et, de la même façon, l'interaction significative entre le test et le traitement pour les latences de CCM met en évidence une courbe d'apprentissage différente pour chaque groupe de mâles.

Nous pouvons envisager trois hypothèses quant au rôle de la prostaglandine E_2 , des enzymes COX et de leur régulation par les œstrogènes embryonnaires dans le processus de différenciation sexuelle du cerveau et du comportement chez la caille japonaise :

1) Si les œstrogènes augmentent, comme chez le rat nouveau-né, la synthèse des COX, la présence d'œstradiol chez la femelle pendant le développement entraînerait l'augmentation de l'activité de COX et, par conséquent, de la production de PGE_2 . Dans cette hypothèse, un rôle de la prostaglandine E_2 dans la différenciation sexuelle conduirait à la démasculinisation du cerveau et du comportement. *A contrario*, les cailles mâles, dépourvues d' E_2 durant l'embryogenèse, possèderaient une activité réduite de COX ce qui entraînerait, par défaut, la masculinisation. Dès lors, l'indométhacine devrait entraver la démasculinisation des femelles et ne pas affecter les mâles.

2) A l'instar de ce qui est observé chez le rat, la PGE_2 pourrait masculiniser le cerveau de la caille mâle. Selon cette hypothèse, les COX seraient constitutivement actives chez les cailles mâles mais seraient inhibées par l' E_2 produit durant le développement des femelles, avec pour résultat leur démasculinisation. Si tel est le cas, l'injection d'indométhacine durant la période sensible démasculiniserait les mâles mais resterait sans effet sur les femelles.

3) L'effet de la PGE_2 et/ou des enzymes COX ne serait applicable qu'aux mammifères ou, tout du moins, aux rats et n'interviendrait donc pas dans la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille japonaise.

Au vu des résultats du comportement consommatoire, la deuxième hypothèse semble la plus appropriée. En effet, les mâles traités sont significativement moins performants que les contrôles tandis qu'aucune expression du comportement reproducteur mâle n'est observée chez les femelles. Cela dit, la troisième hypothèse ne peut être totalement rejetée puisque ces mâles copulent tout de même alors que l'injection d'œstradiol avant le douzième jour d'incubation résulte en une démasculinisation complète de tous les individus masculins (Adkins, 1975). Néanmoins, cet effet partiel du traitement pourrait être expliqué par le fait que la dose d'indométhacine injectée (50 μ g) ne soit pas suffisante pour bloquer entièrement les COXs et démasculiniser les mâles. Cette possibilité est appuyée par les concentrations résiduelles de PGE_2 mesurées quatre heures après le traitement, suggérant que cette dose d'indométhacine ne suffit pas à inhiber complètement la synthèse de la PGE_2 . Dès lors, la faible quantité de prostaglandine E_2 produite pourrait être suffisante pour agir sur la circuiterie nerveuse. Il est également possible que la synthèse de la prostaglandine E_2 soit entièrement

bloquée par l'indométhacine mais que la PGE₂ prenne du temps à être métabolisée, ce qui expliquerait les niveaux résiduels retrouvés lors du dosage. Toutefois, des tests préliminaires dosant la PGE₂ dans des HPOA issu d'œufs injectés avec 500µg d'indométhacine ont fourni des niveaux résiduels en PGE₂ bien moindres, ce qui laisse penser que le métabolisme de cette hormone n'est pas à mettre en cause.

L'analyse du pourcentage de fibres vasotocinergiques dans le POM, à l'instar de celle du comportement consommatoire, rend peu probable la première hypothèse du rôle de la PGE₂ puisque les femelles possèdent une innervation moins dense que celle des mâles comme vu dans la littérature (Viglietti-Panzica et al., 1998) et semblent donc être correctement démasculinisées. Néanmoins, l'hypothèse de démasculinisation des mâles privilégiée plus haut ne s'accorde pas pour autant avec les résultats du comptage des fibres, mais rien ne dit que la prostaglandine E₂ jouerait un rôle dans l'établissement de l'innervation vasotocinergique : en effet, si la vasotocine semble participer au contrôle du comportement reproducteur, la façon dont elle interviendrait pour contrôler ce comportement est peu claire (Castagna et al., 1998 ; Balthazart et al., 2009 ; Ball & Balthazart, 2010) et on peut donc imaginer que cette circuiterie ne serait pas influencée par la PGE₂. De plus, seul le POM a été analysé alors que le septum latéral et le BST présentent également une différence sexuelle de l'innervation vasotocinergique. Il n'est donc pas exclu qu'une de ces deux régions présente une différence significative suivant le traitement. Ces analyses doivent encore être réalisées et nous éclairerons sur cette question.

Nous avons également envisagé la possibilité que l'indométhacine agisse sur le contrôle de la motivation et non sur les circuits contrôlant la réalisation du comportement, ce qui expliquerait la réduction partielle du comportement copulatoire des mâles. Il s'agit d'ailleurs de la raison pour laquelle un test de RCSM, mesurant le comportement appétitif, a été réalisé durant cette expérience. Néanmoins, ce test n'a pas mis en évidence d'effet du traitement et cette hypothèse n'est donc pas supportée.

Enfin, il est intéressant de constater que l'effet de l'indométhacine est plus marqué lorsqu'elle est injectée à E7 plutôt qu'à E9. En effet, même si aucune différence statistique n'a été révélée entre les mâles traités à E7 et E9, l'observation des fréquences comportementales indique que les mâles traités à E9 ont atteint, au fur et à mesure des tests, une fréquence de CCM similaire à celle des mâles contrôles alors que les mâles traités à E7 montrent des fréquences copulatoires inférieures à celles des contrôles, et ce de manière stable depuis le 8^{ème} test. S'il n'est pas illogique de voir un effet plus prononcé à E7 étant donné qu'il s'agit du début de la période de différenciation sexuelle du cerveau, nous aurions pu nous attendre à ce que cet effet soit en faveur des mâles traités à E9, puisque c'est à ce moment que la microglie colonise le tissu nerveux en masse. En effet, outre les neurones et les astrocytes, les cellules microgliales synthétisent également de la PGE₂ (Lenz & McCarthy, 2014) et il est donc surprenant que l'inhibition des COXs lors de l'envahissement de ce producteur non négligeable de prostaglandine E₂ influe de manière moindre, par rapport à un blocage réalisé à E7, l'établissement du comportement mâle. Cette observation pourrait dès lors suggérer que la PGE₂ produite, de manière précoce, par les astrocytes et les neurones jouerait un rôle plus

important que celle issue des cellules microgliales dans la mise en place du comportement reproducteur mâle.

In fine, cette première expérience supporte l'hypothèse d'un rôle de la PGE₂ dans la différenciation sexuelle du cerveau de la caille et, plus particulièrement, d'un rôle dans le processus de masculinisation. Cependant, les effets de la prostaglandine E₂ semblent rester partiels et des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

V.2) Expérience 2 : quantification de la microglie et caractérisation de sa morphologie à différents stades de développement chez des embryons mâles et femelles

Tous les morphotypes définis précédemment ont été observés, exception faite de la morphologie à longs et fins processus dite quiescente. Les résultats mettent en évidence une différence statistiquement significative entre sexes au 12^{ième} jour d'incubation (E12) : en effet, les femelles possèdent environ deux fois plus de microglie que les mâles, la différence sexuelle étant nettement prononcée pour le morphotype à courts processus, une des deux morphologies activées. Cette différence disparaît complètement dès le 14^{ième} jour.

L'absence du morphotype dit quiescent n'est ici pas illogique puisqu'il s'agit d'une morphologie que l'on retrouve généralement chez l'adulte, alors que notre étude s'intéresse principalement au développement embryonnaire. Cette absence du morphotype quiescent aux âges étudiés ou équivalents a été soulignée précédemment (Schwarz et *al.*, 2012 ; Cuadros et *al.*, 1994 ; Cuadros & Navascues, 1998). De manière intéressante, les femelles possèdent plus de cellules microgliales et quasiment deux fois plus de microglie à courts processus, une des formes activées, que les mâles, ce qui correspond aux proportions et à la morphologie qui prédominaient chez les rats mâles nouvellement nés (Lenz et *al.*, 2013). Bien que les auteurs qualifient ce morphotype d'amœboïde, la comparaison d'une photo typique de cette morphologie issue de l'étude de Lenz, citée ci-dessus, avec ce qui a été considéré comme de la microglie à courts processus dans notre expérience suggère qu'il s'agit vraisemblablement du même type de cellules microgliales. La présence d'une plus grande quantité de microglie, et en particulier de sa forme activée, chez la caille femelle peut être associée au fait qu'il s'agisse du sexe dont le parenchyme nerveux est façonné et démasculinisé par l'E₂. En effet, si la présence d'œstradiol entraîne probablement l'élimination de la circuiterie typiquement masculine, on peut facilement imaginer que les cellules microgliales constitueraient un type cellulaire de choix pour ce travail de par leur(s) récepteur(s) à l'E₂ qui les rendent aisément contrôlables par cette hormone et leurs différentes fonctions énoncées précédemment, soit la phagocytose spécifique des cellules apoptotiques (Sierra et *al.*, 2010), l'élagage de complexes synaptiques (Schafer et *al.*, 2012), la destruction des projections axonales temporaires (Mallat et *al.*, 2005) ainsi que l'induction de l'apoptose (Marín-Teva et *al.*, 2004 ; Sato, 2015). De la même façon, le plus grand nombre de cellules microgliales total, et de cellules activées en particulier, chez les rats mâles pourrait contribuer à déféminiser le cerveau. Cependant, les données de Lenz et *al.* montrent que la microglie participe à la masculinisation du cerveau et du comportement chez le rongeur et aucune étude n'a, jusqu'à présent, mis en évidence le rôle de la microglie dans le processus de déféminisation.

Par ailleurs, un autre point important est le moment où la différence sexuelle s'exprime : chez la caille, notre étude ne l'a détectée qu'au dernier jour de la période sensible, soit au 12^{ième} jour d'incubation. En comparaison, les données de Lenz ont mis en évidence une différence au deuxième jour de vie des rats, ce qui correspond plus ou moins au milieu de la période sensible. La différence sexuelle observée chez la caille pourrait s'exprimer uniquement au douzième jour pour plusieurs raisons : d'une part, l'œstradiol entraînerait progressivement la variation du nombre de cellules microgliales au fur et à mesure de leur migration dans le cerveau, variation qui culminerait au 12^{ième} jour d'incubation. D'autre part, une étape importante de la différenciation sexuelle pourrait se produire précisément à E12, conduisant ainsi à une différence sexuelle. Enfin, il n'est pas impossible que cette différence apparaisse en réalité entre le neuvième et le douzième jour et persiste jusqu'à ce dernier. L'hypothèse d'un effet cumulatif de l'œstradiol sur la quantité de microglie ne s'accorde pas avec les données puisque la différence sexuelle disparaît après le 12^{ième} jour. De plus, la différence sexuelle est tout de même observée à la limite de la période de différenciation sexuelle, ce qui laisse penser qu'un remodelage capital ou significatif de la circuiterie nerveuse a peu de chance de se produire. L'apparition de la différence entre le 9^{ième} et le 12^{ième} jour d'incubation semble donc être plus probable pour l'instant.

Ainsi, la situation suivante pourrait être envisagée chez la caille : la démasculinisation prendrait place à partir du premier jour de la période sensible (6^{ième} jour d'incubation) ce qui impliquerait la modification massive, peut-être avec l'aide des précurseurs d'ores et déjà présents, du parenchyme nerveux et l'accumulation de déchets comme des cellules apoptotiques, des synapses aberrantes ou des projections temporaires d'axones. La microglie colonisant le cerveau permettrait la destruction spécifique de ces détritiques, voire même participerait activement à la démasculinisation en induisant l'apoptose (Marín-Teva *et al.*, 2004) ou en élaguant des complexes synaptiques (Schafer *et al.*, 2012). Par ailleurs, la présence d'E₂, si elle a un effet, entraînerait la survie d'une plus grande quantité de microglie chez la femelle en activant, par exemple, les récepteurs œstrogéniques ER α inhibant l'apoptose (Nielsen *et al.*, 2000).

Enfin, ces données apportent des éléments de réponse quant à l'idée que la quantité différente de microglie entre mâles et femelles chez les rats nouveau-nés traduise une réponse immunitaire de la mère contre les fœtus mâles qu'elle porte. En effet, si la différence sexuelle de la microglie activée est effectivement due à l'interaction prolongée avec l'environnement maternel, il serait logique de penser qu'une telle différence ne serait pas présente chez la caille qui se développe dans un œuf. Or, il existe bel et bien une différence et ce sont ici les cerveaux femelles qui comptent le plus de microglie et non ceux des mâles, laissant donc penser qu'une réaction inflammatoire due à la mère est peu probable puisque l'embryon est du même sexe et est constitué des mêmes chromosomes que cette dernière.

Il ressort de cette expérience que la différence sexuelle du nombre de cellules microgliales n'est vraisemblablement pas causée par l'environnement dans lequel l'embryon se trouve. Cela signifie donc qu'une plus grande quantité de microglie, et plus particulièrement d'un morphotype activé, chez un sexe plutôt que l'autre durant la période sensible serait nécessaire au déroulement de la différenciation sexuelle du cerveau. Chez la caille, il serait donc possible

que la microglie participe à la démasculinisation des femelles en éliminant, par exemple, les cellules apoptotiques ou les synapses aberrantes.

V.3) Expérience 3 : suivi de la concentration en PGE₂ dans l'HPOA mâles et femelles à différents stades de développement

Le dosage en PGE₂ réalisé chez des mâles et femelles au cours du développement embryonnaire et après un jour de vie met en évidence la présence et l'augmentation progressive de l'hormone pendant le développement mais ne montre à aucun moment de différence entre mâles et femelles.

Ces résultats démontrent donc la présence de PGE₂ dans le cerveau de l'embryon de caille mais ne supportent pas l'hypothèse d'un rôle potentiel de la prostaglandine E₂ lors de la différenciation sexuelle. Pourtant, l'injection d'indométhacine (expérience 1) exerce un effet sur la faculté des mâles à copuler. Ces données semblent *a priori* contradictoires mais il convient de se rappeler que l'indométhacine bloque les enzymes COX qui, outre, la PGE₂, produisent également d'autres prostaglandines (PGF_{2α} et PGD₂), une prostacycline (PGI₂) et des thromboxanes (TXA₂). Or, si les COX sont inhibées, toutes ces molécules cessent d'être produites et il est donc possible qu'une autre prostaglandine, voire même la prostacycline ou les thromboxanes, soit responsable de l'effet observé dans l'expérience 1. Si tel est le cas, il pourrait s'agir d'un composé agissant indépendamment d'une régulation par l'E₂. Une autre explication serait que la PGE₂ soit effectivement l'hormone à l'origine de l'effet observé, mais qu'une différence sexuelle se situe au niveau de ses récepteurs. Néanmoins, il est à noter que la PGE₂ ne semble pas intervenir dans le phénomène de fièvre chez les oiseaux (Fraifeld et al., 1995 ; Gray et al., 2013 ; Nomoto, 2003) alors que c'est le cas chez les mammifères (Simmons et al., 2004). Dès lors, si la prostaglandine E₂, hormone pro-inflammatoire, ne joue pas un rôle dans une des réponses inflammatoires les plus connues chez les oiseaux, il serait logique de penser qu'elle ne soit également pas impliquée lors de la différenciation sexuelle du cerveau de ces derniers.

V.4) Discussion générale

Les résultats présentés répondent aux objectifs de travail de la manière suivante:

Un produit issu des COX exerce vraisemblablement un effet organisateur lors de la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille, mais il est probable qu'il ne s'agisse pas de la PGE₂. De plus, la façon dont les données présentées pourraient expliquer la dichotomie entre mammifères et oiseaux vis-à-vis des effets précoces de l'œstradiol est encore peu claire. En effet, chez les rongeurs, il existe une différence sexuelle de la concentration en PGE₂ qui conduit à la masculinisation des mâles tandis que, chez la caille, un composé synthétisé par les mêmes enzymes, mais ne dépendant pas forcément de l'E₂, semble conduire également à la masculinisation. Dès lors, si ce travail semble apporter un début de piste, il serait nécessaire de déterminer ultérieurement quel prostanoloïde est responsable de l'effet observé chez l'oiseau, de démontrer l'effet masculinisateur de ce composé ainsi qu'estimer sa dépendance aux œstrogènes afin de répondre à la problématique.

Une différence sexuelle est bel et bien présente au niveau de la quantité de microglie et concerne en particulier la morphologie à courts processus, un morphotype activé. Ces données ne supportent donc pas la possibilité d'une potentielle réaction inflammatoire causée par l'environnement maternel, d'autant plus que la différence observée est en faveur des femelles, possédant le même bagage chromosomique que la mère.

Enfin, la PGE₂ est décelable chez la caille en développement mais il n'existe cependant pas de différence sexuelle au niveau de sa concentration.

Globalement, les résultats des trois expériences réalisées au cours de ce travail semblent mettre en évidence un rôle masculinisateur d'un produit des enzymes COX ainsi qu'un rôle démasculinisateur au niveau de la microglie. Toutefois, il est à l'heure actuelle impossible de lier les cellules microgliales avec la démasculinisation partielle des mâles suite à l'injection d'indométhacine puisque seule la PGE₂ a été quantifiée sans qu'une différence sexuelle n'apparaisse. Cela dit, il n'est pas certain qu'un lien puisse être établi entre la différence sexuelle en cellules microgliales et l'effet démasculinisateur partiel puisque, outre le fait qu'il s'agisse de processus bien distincts, l'indométhacine exerce une action plus marquée lorsque ces macrophages n'ont pas encore colonisé le cerveau, laissant donc penser que l'effet observé chez les mâles serait principalement causé par un composé issu des enzymes COX des neurones et des astrocytes de manière précoce. Le même composé, synthétisé par les COX de la microglie, ne jouerait vraisemblablement qu'un rôle mineur dans cet effet, voire même n'interviendrait pas du tout. Les cellules microgliales participeraient en revanche à la démasculinisation, ce qui requerrait principalement leurs fonctions de phagocytose professionnels plutôt que la synthèse de prostaglandines, de la prostacycline et de thromboxanes.

VI. Conclusion :

Nous avons étudié, au cours de ce travail, l'interaction entre des processus immunologiques (microglie et PGE₂) et la différenciation sexuelle du cerveau et du comportement de la caille japonaise. De manière intéressante, les résultats montrent un effet de l'inhibition des enzymes responsables, entre autres, de la production de la PGE₂ sur la capacité à copuler de mâles traités durant la période sensible. En outre, une différence sexuelle est présente à la fin de cette même période au niveau de la quantité de microglie : les femelles possèdent en effet plus de cellules microgliales que les mâles et environ deux fois plus de cellules présentant un morphotype activé que ces derniers. Enfin, le dosage de la PGE₂ met en évidence la présence de cette hormone lipidique durant le développement embryonnaire sans qu'une différence des concentrations entre les sexes n'apparaisse. Nous interprétons l'ensemble de ces résultats comme une indication d'un rôle possible de la microglie et d'un prostanoïde, probablement autre que PGE₂, durant la démasculinisation et la masculinisation, respectivement. D'un point de vue mécanistique, nous proposons que le composé impliqué, produit essentiellement par les neurones et les astrocytes, participerait à la masculinisation de manière précoce dans le développement, tandis que les cellules microgliales interviendraient dans la démasculinisation de manière plus tardive en phagocytant de manière sélective des éléments de la circuiterie mâle. D'autre part, la différence sexuelle au niveau de la microglie semble infirmer la

possibilité d'une réaction inflammatoire liée à la mère pour expliquer la plus grande proportion de cellules avec une morphologie activée chez le rongeur. Enfin, ce mémoire apporte de nouvelles pistes pour l'élucidation de la dichotomie existante entre mammifères et oiseaux en ce qui concerne les effets précoces de l'œstradiol, mais nous ignorons toujours si la PGE₂, ou vraisemblablement un autre prostanoloïde, pourrait constituer le chaînon manquant permettant d'expliquer cette dichotomie. Ce travail ouvre donc de nouvelles perspectives et il serait intéressant de doser d'autres composés produits par COX durant le développement de la caille afin de mettre en évidence une potentielle différence sexuelle et, en parallèle, d'injecter de l'indométhacine durant la période sensible à une plus forte concentration, ou pendant plusieurs jours successifs, afin de déterminer si cela suffirait pour inhiber totalement la copulation des mâles. Enfin, il serait aussi important de déterminer le rôle de l'E₂ dans la différence sexuelle de la quantité de microglie et de mettre également en évidence son implication dans la régulation de la production du composé vraisemblablement impliqué dans la masculinisation des mâles, ainsi que d'estimer l'importance de cette microglie dans l'établissement des différences sexuelles.

VII. Annexe :

Tableau 1. Récapitulatif des différences relatives à la différenciation sexuelle entre le rat et la caille.
Légende : E₂ = œstradiol ; SDN-POA = noyau sexuellement dimorphique de l'aire pré-optique ; POM = noyau pré-optique médian.

| Rat | Caille |
|---|---|
| Entre le 18 ^{ième} jour de gestation et le 10 ^{ième} jour post-natal | Entre le 6 ^{ième} et le 12 ^{ième} jour d'incubation (mais une sensibilisation partielle est encore possible jusqu'à la 4 ^{ième} semaine de vie pour les femelles) |
| L'E ₂ provient de l'aromatisation neuronale de la testostérone | L'E ₂ provient des ovaires |
| E ₂ est responsable de la masculinisation et la déféminisation des mâles | E ₂ est responsable de la démasculinisation des femelles |
| La différence sexuelle au niveau du volume du SDN-POA est organisée par l'E ₂ et dépend de l'apoptose des neurones | La différence sexuelle du volume du POM est principalement activée par l'E ₂ mais dépend en partie d'une organisation par l'absence de stéroïdes sur la taille des neurones dorso-latéraux |
| La femelle est le sexe « neutre » | Le mâle est le sexe « neutre » |

Tableau 2. Résultats des ANOVA des fréquences et latences du MA et du CCM.

| Anova deux prédicteurs (tests et traitement) sur mesures répétées mâles (fréquences CCM 3-11) : | DI | Valeur F | Valeur p |
|--|-----------|-----------------|-----------------|
| Traitement | 2 | 3,314 | 0,049 |
| Résidus | 33 | | |
| Tests | 8 | 21,943 | <2e-16 |
| Interaction traitement*tests | 16 | 1,158 | 0,302 |
| Résidus | 264 | | |
| | | | |
| Anova deux prédicteurs (tests et traitement) sur mesures répétées mâles (fréquences MA 1-11) : | | | |
| Traitement | 2 | 0,589 | 0,561 |
| Résidus | 33 | | |
| Tests | 10 | 2,492 | 0,007 |
| Interaction traitement*tests | 20 | 0,242 | 0,999 |
| Résidus | 330 | | |
| | | | |
| Anova deux prédicteurs (tests et traitement) sur mesures répétées mâles (latences MA 1-11) : | | | |
| Traitement | 2 | 0,464 | 0,633 |
| Résidus | 33 | | |
| Tests | 10 | 9,485 | 6,99e-14 |
| Interaction traitement*tests | 20 | 0,738 | 0,786 |
| Résidus | | | |
| | | | |
| Anova deux prédicteurs (tests et traitement) sur mesures répétées mâles (latences CCM 1-11) : | | | |
| Traitement | 2 | 4,526 | 0,018 |
| Résidus | 33 | | |
| Tests | 10 | 28,319 | <2e-16 |
| Interaction traitement*tests | 20 | 1,715 | 0,03 |
| Résidus | 330 | | |
| | | | |

Tableau 3. Résultats du post-hoc (HSD de Tukey) sur l'interaction des facteurs (traitement et test) pour les latences de CCM.

| Interaction traitement - test | Valeur p |
|--------------------------------------|-----------------|
| Contrôle:T10-Contrôle:T1 | 0,0014406 |
| Contrôle:T11-Contrôle:T1 | 0,0000379 |
| Contrôle:T7-Contrôle:T1 | 0,0019551 |
| Contrôle:T8-Contrôle:T1 | 0,0000295 |
| Contrôle:T9-Contrôle:T1 | 0,0000027 |
| Indo E7:T9-Indo E7:T1 | 0,0420583 |
| Indo E9:T10-Indo E9:T1 | 0,0003759 |
| Indo E9:T11-Indo E9:T1 | 0,0000287 |
| Indo E9:T9-Indo E9:T1 | 0,0038032 |
| Contrôle:T2-Contrôle:T10 | 0,0014406 |
| Contrôle:T3-Contrôle:T10 | 0,0137976 |
| Indo E9:T2-Indo E9:T10 | 0,0002070 |
| Indo E9:T3-Indo E9:T10 | 0,0002070 |
| Indo E9:T4-Indo E9:T10 | 0,0019365 |
| Indo E9:T5-Indo E9:T10 | 0,0006910 |
| Indo E9:T6-Indo E9:T10 | 0,0026892 |
| Contrôle:T2-Contrôle:T11 | 0,0000379 |
| Contrôle:T3-Contrôle:T11 | 0,0005540 |
| Contrôle:T5-Contrôle:T11 | 0,0089564 |
| Indo E9:T2-Indo E9:T11 | 0,0000149 |
| Indo E9:T3-Indo E9:T11 | 0,0000149 |
| Indo E9:T4-Indo E9:T11 | 0,0001762 |
| Indo E9:T5-Indo E9:T11 | 0,0000561 |
| Indo E9:T6-Indo E9:T11 | 0,0002545 |
| Contrôle:T7-Contrôle:T2 | 0,0019551 |
| Contrôle:T8-Contrôle:T2 | 0,0000295 |
| Contrôle:T9-Contrôle:T2 | 0,0000027 |
| Indo E7:T9-Indo E7:T2 | 0,0420583 |
| Indo E9:T9-Indo E9:T2 | 0,0022362 |
| Contrôle:T7-Contrôle:T3 | 0,0179144 |
| Contrôle:T8-Contrôle:T3 | 0,0004419 |
| Contrôle:T9-Contrôle:T3 | 0,0000502 |
| Indo E7:T9-Indo E7:T3 | 0,0420583 |
| Indo E9:T9-Indo E9:T3 | 0,0022362 |
| Contrôle:T9-Contrôle:T4 | 0,0127324 |
| Indo E9:T9-Indo E9:T4 | 0,0159503 |
| Contrôle:T9-Contrôle:T5 | 0,0011179 |
| Indo E9:T9-Indo E9:T6 | 0,0211375 |
| Indo E7:T7-Contrôle:T7 | 0,0049164 |
| Indo E7:T9-Indo E7:T7 | 0,0420583 |

VIII. Références :

- Absil, P. et al., 2002. The medial preoptic nucleus receives vasotocinergic inputs in male quail: A tract-tracing and immunocytochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 24(1), pp.27–39.
- Adkins, E.K. & Adler, N.T., 1972. Hormonal control of behavior in the Japanese quail. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81(1), pp.27–36.
- Adkins, E.K., 1975. Hormonal basis of sexual differentiation in the Japanese quail. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 89(1), pp.61–71.
- Adkins-regan, 2002. Sexual differentiation of brain and behavior. *Handbook of Neuroendocrinology*, pp.393–413.
- Ahmed, E.I. et al., 2008. Pubertal hormones modulate the addition of new cells to sexually dimorphic brain regions. *Nature Neuroscience*, 11(9), pp.995–997.
- Amateau, S.K. & McCarthy, M.M., 2002. A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(19), pp.8586–8596.
- Amateau, S.K. et al., 2004. Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*, 145(6), pp.2906–2917.
- Andreasson, K., 2010. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 91(3-4), pp.104–112.
- Arnold, T. & Betsholtz, C., 2013. Correction: The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vascular cell*, 5(1), p.12.
- Aste, N. et al., 2010. Distribution and sex differences in aromatase-producing neurons in the brain of Japanese quail embryos. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 39(4), pp.272–288.
- Bakker, J., 2006. L'a-fœtoprotéine protège le cerveau femelle en développement des effets masculinisants des œstrogènes. *Médecine/Sciences*, 22(5), pp.1–3.
- Bakker, J. & Brock, O., 2010. Early oestrogens in shaping reproductive networks: Evidence for a potential organisational role of oestradiol in female brain development. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(7), pp.728–735.
- Ball, G.F. & Balthazart, J., 2004. Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds. *Physiology and Behavior*, 83(2), pp.329–346.
- Ball, G.F. & Balthazart, J., 2010. Japanese quail as a model system for studying the neuroendocrine control of reproductive and social behaviors. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 51(4), pp.310–325.
- Balthazart, J. 1983. 4 - Hormonal correlates of behavior. *Avian Biol vol VII*, pp.221–362.

- Balthazart, J. & Schumacher, M., 1984. Estradiol contributes to the postnatal demasculinization of female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Hormones and Behaviour*, 18, pp.287–297.
- Balthazart, J., Foidart, A. & Harada, N., 1990. Immunocytochemical localization of aromatase in the brain. *Brain Research*, 514(2), pp.327–333.
- Balthazart, J., De Clerck A., and Foidart A., 1992. Behavioral demasculinization of female quail is induced by estrogens: Studies with the new aromatase inhibitor, R76713. *Hormones and Behavior*, 26, pp.179–203.
- Balthazart, J. & Foidart, A., 1993. Brain aromatase and the control of male sexual behavior. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 44(4-6), pp.521–540.
- Balthazart, J. & Ball, G.F., 1995. Sexual differentiation of brain and behavior in birds. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 6(1), pp.21–9.
- Balthazart, J., Tlemçani, O. & Harada, N., 1996. Localization of testosterone-sensitive and sexually dimorphic aromatase-immunoreactive cells in the quail preoptic area. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 11(3), pp.147–171.
- Balthazart, J., 1997. Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61(3-6), pp.323–339.
- Balthazart, J., Castagna, C. & Ball, G.F., 1997. Differential effects of D1 and D2 dopamine-receptor agonists and antagonists on appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior in Japanese quail. *Physiology and Behavior*, 62(3), pp.571–580.
- Balthazart, J. et al., 1998. Appetitive and consummatory male sexual behavior in Japanese quail are differentially regulated by subregions of the preoptic medial nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(16), pp.6512–6527.
- Balthazart, J. & Ball, G.F., 2007. Topography in the preoptic region: Differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(4), pp.161–178.
- Balthazart, J., Arnold, A P. & Adkins-Regan, E., 2009. 55 - Sexual Differentiation of Brain and Behavior in Birds. *Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)*, 3, pp.1745–1789.
- Bauer, H.C. & Bauer, H., 2000. Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma. *Cellular and molecular neurobiology*, 20(1), pp.13–28.
- Bilbo, S.D. & Schwarz, J.M., 2012. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3), pp.267–286.
- Bilbo, S.D., Smith, S.H. & Schwarz, J.M., 2012. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: A critical role for glia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 7(1), pp.24–41.

- Bonthuis, P. J., Cox, K. H., Searcy, B. T., Kumar, P., Tobet, S., & Rissman, E. F., 2010. Of mice and rats: key species variations in the sexual differentiation of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), pp.341–358.
- Breedlove, S.M. & Arnold, A. P., 1983. Hormonal control of a developing neuromuscular system. I. Complete demasculinization of the male rat spinal nucleus of the bulbocavernosus using the anti-androgen flutamide. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 3(2), pp.417–23.
- Breedlove, S.M., 1994. Sexual Differentiation of the Human Nervous System. *Annual review of Psychology*, 45(1), pp.389–418.
- Brock, O., Baum, M.J. & Bakker, J., 2011. The Development of Female Sexual Behavior Requires Prepubertal Estradiol. *Journal of Neuroscience*, 31(15), pp.5574–5578.
- Brose, S.A., Thuen, B.T. & Golovko, M.Y., 2013. LC/MS/MS method for analysis of E₂ series prostaglandins and isoprostanes. *Lipids*, 48(4), pp.411–419.
- Bruce-Keller, A.J. et al., 2000. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*, 141(10), pp. 3646-3656.
- Candelario-jalil, E., Fiebich, B.L., 2008. Cyclooxygenase inhibition in Ischemic brain injury. *Current Pharmaceutical Design*, 14(14), pp.1401–1418.
- Carere, C. & Balthazart, J., 2007. Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18(2), pp.73–80.
- Castagna, C. et al., 1998. Systemic and intracerebroventricular injections of vasotocin inhibit appetitive and consummatory components of male sexual behavior in Japanese quail. *Behavioral neuroscience*, 112(1), pp.233–250.
- Chen, C., Magee, J.C. & Bazan, N.G., 2002. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E₂ signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Journal of neurophysiology*, 87(6), pp.2851–2857.
- Cornil, C.A. et al., 2011. Organizing effects of sex steroids on brain aromatase activity in quail. *PLoS ONE*, 6(4).
- Cornil, C.A. et al., 2013. Rapid control of reproductive behaviour by locally synthesised oestrogens: Focus on aromatase. *Journal of Neuroendocrinology*, 25(11), pp.1070–1078.
- Cuadros, M.A. et al., 1992a. Microglia in the mature and developing quail brain as revealed by a monoclonal antibody recognizing hemopoietic cells. *Neuroscience letters*, 148(1-2), pp.11–14.
- Cuadros, M.A. et al., 1992b. Demonstration of a phagocytic cell system belonging to the hemopoietic lineage and originating from the yolk sac in the early avian embryo. *Development (Cambridge, England)*, 115(1), pp.157–168.

- Cuadros, M.A. et al., 1993. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *The Journal of comparative neurology*, 330(1), pp.113–129.
- Cuadros, M.A. et al., 1994. Development of microglia in the quail optic tectum. *The Journal of comparative neurology*, 348(2), pp.207–224.
- Cuadros, M.A. et al., 1997. Microglia development in the quail cerebellum. *Journal of Comparative Neurology*, 389(3), pp.390–401.
- Cuadros, M.A. & Navascues, J., 1998. The Origin and Differentiation of Microglial Cells During Development. *Progress in Neurobiology*, 56(98), pp.173–189.
- Cuadros, M.A. et al., 2006. Specific immunolabeling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 54(6), pp.727–738.
- Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V. & Noctor, S.C., 2013. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(10), pp.4216–4233.
- Delville, Y. & Balthazart, J., 1987. Hormonal control of female sexual behavior in the Japanese quail. *Hormones and behavior*, 21(1), pp.288–309.
- Do Rego, J.L. et al., 2009. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(3), pp.259–301.
- Döhler, K.D. et al., 1984a. Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence. *Progress in brain research*, 61, pp.99–117. **Cité dans l'article de Bakker & Brock, 2010.**
- Döhler, K.D. et al., 1984b. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain research*, 302(2), pp.291–295. **Cité dans l'article de Maekawa et al., 2014.**
- Döhler, K.D., 1986. The special case of hormonal imprinting, the neonatal influence of sex. *Experientia*, 42, pp.759–769.
- Forger, N.G., 2006. Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience*, 138(3), pp.929–938.
- Forger, N.G., de Vries, G.J. & Breedlove, S.M., 2015. *Sexual Differentiation of Brain and Behavior* Fourth Edition., Elsevier.
- Forger, N.G., Alex Strahan, J. & Castillo-Ruiz, A., 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of Sexual Differentiation in the Mammalian Nervous System. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 40(1), pp.67-86

- Fraifeld, V. et al., 1995. Is hypothalamic prostaglandin E2 involved in avian fever? *Life Sciences*, 56(16), pp.1343–1346.
- Fu, Y. et al., 2015. EP2 receptor signaling regulates microglia death. *Molecular pharmacology*, 88(1), pp. 161-170.
- Gerall, A.A. et al. 1992. Handbook of Behavioral Neurobiology: Sexual Differentiation (Vol.11), Plenum Press. **Cité dans l'article de Carere & Balthazart, 2007**
- Ginhoux, F. et al., 2010. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330 (November), pp.841–846.
- Ginhoux, F. et al., 2013. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(April), pp.45.
- Gray, D.A., Marais, M. & Maloney, S.K., 2013. A review of the physiology of fever in birds. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 183(3), pp.297–312.
- Gutiérrez, G., & Domjan, M., 2011. Conditioning of sexual proceptivity in female quail: Measures of conditioned place preference. *Behavioural Processes*, 87(3), pp.268–273.
- Hölscher, C., 1995. Prostaglandins play a role in memory consolidation in the chick. *European Journal of Pharmacology*, 294 (March), pp.253–259.
- Hutchison, R.E., 1978. Hormonal differentiation of sexual behavior in Japanese quail. *Hormones and behavior*, 11(3), pp.363–387.
- Intarapat, S. & Satayalai, O., 2014. Microanatomical Study of Embryonic Gonadal Development in Japanese Quail (*Coturnix japonica*). *Anatomy Research International*, 2014, pp.26–29.
- Jeon, G.S. et al., 2004. Microglial responses in the avascular quail retina following transection of the optic nerve. *Brain Research*, 1023(1), pp.15–23.
- Johansson, J.U. et al., 2013. Suppression of inflammation with conditional deletion of the prostaglandin E2 EP2 receptor in macrophages and brain microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(40), pp.16016–32.
- Jordan, C.L., 1999. Glia as mediators of steroid hormone action on the nervous system: An overview. *Journal of neurobiology*, 40(4), pp.434–45.
- Kaur, C. et al., 1990. Response of intraventricular macrophages to crotoxin-coated microcarrier beads injected into the lateral ventricle of postnatal rats. *Journal of anatomy*, 168, pp.63–72.
- Kettenmann, H. et al., 2011. Physiology of Microglia. *Physiological reviews*, 91(2), pp.461-553.

- Konkle, A.T.M. & McCarthy, M.M., 2011. Developmental time course of estradiol, testosterone, and dihydrotestosterone levels in discrete regions of male and female rat brain. *Endocrinology*, 152(1), pp.223–235.
- Kordon, C., Gaillard, R-C. Christen, Y., 2005. *Hormones and the Brain*. 1st ed, Online: Springer Berlin Heidelberg.
- Kovács, Z. et al., 2014. Lipopolysaccharide induced increase in seizure activity in two animal models of absence epilepsy WAG/Rij and GAERS rats and Long Evans rats. *Brain Research Bulletin*, 104, pp.7–18.
- KUENZEL, Wayne J. et MASSON, Manju. 1988. *A stereotaxic atlas of the brain of the chick (Gallus domesticus)*, Johns Hopkins University Press.
- Legendre, P & Le Corrnc, H., 2014. Cellules microgliales et développement du système nerveux central chez l'embryon. *Medecine/sciences*, 30(2), pp.147-152.
- Lenz, K.M. et al., 2011. Prostaglandin E2 regulates AMPA receptor phosphorylation and promotes membrane insertion in preoptic area neurons and glia during sexual differentiation. *PLoS ONE*, 6(4).
- Lenz, K.M., Nugent, B.M. & McCarthy, M.M., 2012. Sexual differentiation of the rodent brain: dogma and beyond. *Frontiers in neuroscience*, 6, p.26.
- Lenz, K.M. et al., 2013. Microglia are essential to masculinization of brain and behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(7), pp.2761–72.
- Lenz, K.M. & McCarthy, M.M., 2014. A Starring Role for Microglia in Brain Sex Differences. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 21(3), pp. 306-321.
- Long-Smith, C.M., Sullivan, A.M. & Nolan, Y.M., 2009. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 89(3), pp.277–287.
- Maekawa, F. et al., 2014. The mechanisms underlying sexual differentiation of behavior and physiology in mammals and birds: Relative contributions of sex steroids and sex chromosomes. *Frontiers in Neuroscience*, 8(8 JUL), pp.1–9.
- Mallat, M., Marín-Teva, J.L. & Chéret, C., 2005. Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(1), pp.101–107.
- Marin-Teva, J.L. et al., 1998. Tangential Migration of Ameboid Microglia in the Developing Quail Retina : Mechanism of Migration and Migratory Behavior. *Glia*, 52(1), pp.31–52.
- Marín-Teva, J.L. et al., 2004. Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron*, 41(4), pp.535–547.
- McCarthy, M.M. & Konkle, A.T.M., 2005. When is a sex difference not a sex difference? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(2), pp.85–102.

- McCarthy, M.M., 2008. Estradiol and the Developing Brain., 88(1), pp.91–134.
- McCarthy, M.M., 2009. The two faces of estradiol: effects on the developing brain. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 15(6), pp.599–610.
- McCarthy, M.M., Wright, C.L. & Schwarz, J.M., 2009. New tricks by an old dogma: mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior. *Hormones and behavior*, 55(5), pp.655–665.
- McCarthy, M.M., 2010. How it's made: organisational effects of hormones on the developing brain. *Journal of neuroendocrinology*, 22(7), pp.736–742.
- McCarthy, M.M., 2011. A lumpers versus splitters approach to sexual differentiation of the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), pp.114–123.
- McCarthy, M.M., 2012. *Sexual differentiation of brain and behavior*, Elsevier Inc.
- McCarthy, M.M. et al., 2015. Surprising Origins of Sex Differences in the Brain. *Hormones and Behavior*.
- McCarthy, M.M., 2016. Multifaceted origins of sex differences in the brain. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1688), pp.20150106.
- McEwen, B.S. et al., 1977. Aromatization: Important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Hormones and Behavior*, 9(3), pp.249–263. **Cité dans les articles de Breedlove & Arnold, 1983 ; Schwarz & McCarthy, 2008 et McCarthy, 2012.**
- McGrath, K.E. et al., 2003. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*, 101(5), pp.1669–1676.
- Michell-Robinson, M.A. et al., 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*, 138(5), pp.1138–1159.
- Mohr, M.A. et al., 2016. Neurons and Glial Cells are Added to the Female Rat Anteroventral Periventricular Nucleus During Puberty. *Endocrinology*, (May), pp.en.2015–2012.
- Naftolin, F. et al., 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent progress in hormone research*, 31, pp.295–319.
- Naftolin, F. & Maclusky, N.J., 1982. Aromatase in the Central Nervous System1. *Cancer Research*, 42(August), pp.3274–3276.
- Nagano, T., Kimura, S.H. & Takemura, M., 2014. Prostaglandin E2 induces apoptosis in cultured rat microglia. *Brain research*, 1568, pp.1–9.
- Naito, M., Takahashi, K. & Nishikawa, S., 1990. Development, differentiation, and maturation of macrophages in the fetal mouse liver. *Journal of leukocyte biology*, 48(1), pp.27–37.

- Navascues, J. et al., 1995. Origin of microglia in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *The Journal of comparative neurology*, 354(2), pp.209–228.
- Navascués, J. et al., 2000. Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 72(1), pp.91–102.
- Negri-Cesi, P. et al., 2008. Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: Hormonal and environmental influences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3-5), pp.294–299.
- Nilsen, J., Mor, G. & Naftolin, F., 2000. Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *Journal of Neurobiology*, 43(1), pp.64–78.
- Nomoto, S., 2003. Role of prostaglandin E2 and indomethacin in the febrile response of pigeons. *The Japanese journal of physiology*, 53(4), pp.253–8.
- Nugent, B.M. et al., 2009. Masculinization induced by neonatal exposure to PGE2 or estradiol alters c-fos induction by estrous odors in adult rats. *Physiology and Behavior*, 96(2), pp.383–388.
- Panzica, G.C. et al., 1987. Sexual differentiation and hormonal control of the sexually dimorphic preoptic medial nucleus in quail. *Brain Research*, 416(1), pp.59–68.
- Panzica, G. C. et al., 1991. Effects of Testosterone on a selected Neuronal population within the preoptic sexually dimorphic nucleus of the Japanese quail. *The journal of comparative neurology*, 303(3), pp.443–456.
- Panzica, G.C., Castagna, C., et al., 1996. Testosterone effects on the neuronal ultrastructure in the medial preoptic nucleus of male Japanese quail. *Brain research bulletin*, 39(5), pp.281–92.
- Panzica, G.C., Viglietti-Panzica, C. & Balthazart, J., 1996. The sexually dimorphic medial preoptic nucleus of quail: a key brain area mediating steroid action on male sexual behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, 17(1), pp.51–125.
- Panzica, G.C. et al., 1999. Effects of testosterone on sexually dimorphic parvocellular neurons expressing vasotocin mRNA in the male quail brain. *Brain Research*, 850(1-2), pp.55–62.
- Perez-Pouchoulen, M., VanRyzin, J.W. & McCarthy, M.M., 2015. Morphological and phagocytic profile of microglia in the developing rat cerebellum. *eNeuro*, (AUGUST).
- Perry, V.H., 1998. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of neuroimmunology*, 90(2), pp.113–21.
- Phoenix, C. et al., 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65(3),

pp.369–382. **Cité dans les articles de McCarthy, 2012 ; McCarthy & Konkle, 2005 ; Schwarz & McCarthy, 2008.**

Prinz, M. & Mildner, A., 2011. Microglia in the CNS: Immigrants from another world. *Glia*, 59(2), pp.177–187.

Raisman, G. & Field, P.M., 1973. Sexual dimorphism in the neurophil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Research*, 54, pp.1–29. **Cité dans les articles de Nielsen et al., 2000 ; Jordan, 1999.**

Robel, P. & Baulieu, E.E., 1995. Neurosteroids: biosynthesis and function. *Critical reviews in neurobiology*, 9(4), pp.383–394. **Cité dans l'article de Forger et al., 2016.**

Rohde, J. et al., 2015. Effects of dexamethasone and cox inhibitors on intracranial pressure and cerebral perfusion in the lipopolysaccharide treated rats with hyperammonemia. *PLoS ONE*, 10(2), pp.1–13.

Sachs, B.D., 1967. Photoperiodic control of the cloacal gland of the Japanese quail. *Science (New York, N.Y.)*, 157(3785), pp.201–203.

Santen, R.J. et al., 2009. History of Aromatase: Saga of an Important Biological Mediator and Therapeutic Target. *Endocrine Reviews*, 30(4), pp.343–375.

Sasaki, T., Shimada, K. & Saito, N., 1998. Changes of AVT levels in plasma, neurohypophysis and hypothalamus in relation to oviposition in the laying hen. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 121(2), pp.149–153.

Sathyasesan, M. et al., 2015. Indomethacin induced gene regulation in the rat hippocampus. *Molecular Brain*, 8(1), p.59.

Sato, K., 2015. Effects of Microglia on Neurogenesis. *Glia*, 63(8), pp.1394–1405.

Schafer, D.P. et al., 2012. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), pp.691–705.

Schulz, K.M. & Sisk, C.L., 2006. Pubertal hormones, the adolescent brain, and the maturation of social behaviors: Lessons from the Syrian hamster. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254-255, pp.120–126.

Schumacher, M. & Balthazart, J., 1983. The effects of testosterone and its metabolites on sexual behavior and morphology in male and female Japanese quail. *Physiology & Behavior*, 30(3), pp.335–339.

Schumacher, M. & Balthazart, J., 1984. The postnatal demasculinization of sexual behavior in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Hormones and behavior*, 18(3), pp.298–312.

Schumacher, M. & Balthazart, J., 1986. Testosterone-induced brain aromatase is sexually dimorphic. *Brain research*, 370(2), pp.285–93.

- Schumacher, M., Hendrick, J.C. & Balthazart, J., 1989. Sexual differentiation in quail: Critical period and hormonal specificity. *Hormones and Behavior*, 23(1), pp.130–149.
- Schwarz, J.M. & McCarthy, M.M., 2008a. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), pp.1561–1572.
- Schwarz, J.M. & McCarthy, M.M., 2008b. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), pp.300–306.
- Schwarz, J.M. & Bilbo, S.D., 2011. LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neuroscience Letters*, 497(2), pp.110–115.
- Schwarz, J.M., Sholar, P.W. & Bilbo, S.D., 2012. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), pp.948–963.
- Sierra, A. et al., 2008. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia*, 56(6), pp.659–674.
- Sierra, A. et al., 2010. Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7(4), pp.483–495.
- Sijben, J.W. et al., 2000. Immunomodulatory effects of indomethacin and prostaglandin E2 on primary and secondary antibody response in growing layer hens. *Poultry science*, 79(7), pp.949–55.
- Simerly, R.B., 2002. Wired for reproduction : Organization and Development of Sexually Dimorphic Circuits in the Mammalian Forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, 25(1), pp.507–536.
- Simmons, D.L., Botting, R.M. & Hla, T., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacological reviews*, 56(3), pp.387–437.
- Slawik, H. et al., 2004. Microglial expression of prostaglandin EP3 receptor in excitotoxic lesions in the rat striatum. *Neurochemistry international*, 45(5), pp.653–660.
- Soh, T. & Koga, O., 1999. Effects of phosphate, prostaglandins, arachidonic acid and arginine vasotocin on oviposition and pigment secretion from the shell gland in Japanese quail. *British poultry science*, 40(1), pp.131–134.
- Solito, E. & Sastre, M., 2012. Microglia Function in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 3(February), pp.1–10.
- Striedter, G.F. & Charvet, C.J., 2008. Developmental origins of species differences in telencephalon and tectum size: Morphometric comparisons between a parakeet (*Melopsittacus undulatus*) and a quail (*Colinus virgianus*). *Journal of Comparative Neurology*, 507(5), pp.1663–1675.

- Sugimoto, Y. & Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), pp.11613–11617.
- Thompson R.R. & Adkins-Regan E., 1992. Ontogeny of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Developmental Brain Research* 70: 231–237. **Cité dans l'article de Balthazart et al., 2009.**
- Todd, B.J., Schwarz, J.M. & McCarthy, M.M., 2005. Prostaglandin-E2: a point of divergence in estradiol-mediated sexual differentiation. *Hormones and behavior*, 48(5), pp.512–521.
- Tomanek, R.J., Hansen, H.K. & Dedkov, E.I., 2006. Vascular patterning of the quail coronary system during development. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 288(9), pp.989–999.
- Tremblay, M.-È., Lowery, R.L. & Majewska, A.K., 2010. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biology*, 8(11).
- Tsukahara, S. et al., 2008. Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. *Neuroscience letters*, 432(1), pp.58–63.
- Vargas, D.L. et al., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57(1), pp.67–81.
- Viglietti-Panzica, C. et al., 1992. Vasotocinergic innervation of the septal region in the Japanese quail: sexual differences and the influence of testosterone. *Cell and Tissue Research*, 267(2), pp.261–265.
- Viglietti-Panzica, C. et al., 1994. Vasotocinergic innervation of sexually dimorphic medial preoptic nucleus of the male Japanese quail: influence of testosterone. *Brain Research*, 657(1-2), pp.171–184.
- Viglietti-Panzica, C. et al., 1998. Organizational Effects of Estrogens on Brain Vasotocin and Sexual Behavior in Quail. *Brain Res Bull*, 65(3), pp.225–233.
- Viglietti-Panzica, C. et al., 2001. Estradiol mediates effects of testosterone on vasotocin immunoreactivity in the adult quail brain. *Hormones and Behavior*, 40(4), pp.445–461.
- Wallen, K., 2005. Hormonal influences on sexually differentiated behavior in nonhuman primates. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(1), pp.7–26.
- Warren, D.W., Haltmeyer, G.C. & Eik-Nes, K.B., 1973. Testosterone in the fetal rat testis. *Biology of Reproduction*, 8(5), pp.560–565.
- Waters, E.M. & Simerly, R.B., 2009. Estrogen Induces Caspase-Dependent Cell Death during Hypothalamic Development. *Journal of Neuroscience*, 29(31), pp.9714–9718.
- Wingfield, J.C., 2005. Historical contributions of research on birds to behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*, 48(4), pp.395–402.

- Wright, C.L., Burks, S.R. & McCarthy, M.M., 2008. Identification of prostaglandin E2 receptors mediating perinatal masculinization of adult sex behavior and neuroanatomical correlates. *Developmental neurobiology*, 68(12), pp.1406–1419.
- Wright, C.L. & McCarthy, M.M., 2009. Prostaglandin E2-induced masculinization of brain and behavior requires protein kinase A, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(42), pp.13274–82.
- Wright, C.L. et al., 2010. Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(9), pp.553–561.
- Yamagata, K. et al., 1993. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11(2), pp.371–386. **Cité dans l'article d'Andreasson, 2010.**
- Yang, H. & Chen, C., 2008. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current pharmaceutical design*, 14(14), pp.1443–1451.