

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : *ED 419 BioSigne*
Laboratoire Centre de Neurosciences Paris-Sud (CNPS)
DISCIPLINE Neurosciences

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le

par

Jonathan Chabout

**Rôle(s) des motivations naturelles dans la prise
de décision: bases neurobiologiques et
comportementales**

Directeur de thèse : Sylvie Granon Professeur (CNRS, UMR 8195, Univ. Paris Sud XI)

Composition du jury :

Président du jury : Jean Champagnat DR1 (CNRS, Inaf, Gif-sur-yvette)
Rapporteurs : Anne-Marie Mouly CR1 (CNRS, UMR 5292 - INSERM, U1028, Univ. Lyon1)
Etienne Coutureau CR1 (CNRS, UMR 5287, Univ. Bordeaux 1 & 2)
Examineurs : Valérie Daugé DR (INRA, UMR 1319, Jouy-en-Josas)

*« On a toujours le choix. On est même la somme de ses
choix. »*

Joseph O'Connor

Remerciements

En effectuant cette thèse je me suis rendu compte de qui j'étais vraiment...

Merci à tous ceux qui ont participé à cet éveil. Je souhaite particulièrement exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, **Sylvie Granon**, pour m'avoir accueilli, encadré, supporté et pour tout le soutien qu'elle m'a apporté. Toutes nos discussions, transportées par les volutes de café fraîchement préparé, m'ont fait grandir et ont permis d'arranger ma pensée. Mais je n'aime toujours pas le café...

Merci aux Dr. Mouly Anne-Marie, et Dr. Coutureau Etienne, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Leurs conseils avisés et leurs remarques pertinentes ont contribué à la construction de ce manuscrit. Merci également à tous les membres du jury d'avoir accepté d'en faire partie.

Merci également au Dr. Serge Laroche de m'avoir accueilli, à la fois durant mon M2 et durant cette thèse, dans son laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement **Anne Nosjean**, pour nos prises de tête concernant la salle d'histologie, pour nos franches discussions autour de sujets épineux, pour le temps qu'elle a consacré à corriger mon manuscrit... Merci à **Alexis Faure** pour tous ses bons conseils (scientifiques ou pas), ses remarques toujours pertinentes sur mes travaux et sa bonne humeur communicative.

Muito Obrigado Renata pra todos esse conselhos, seu sorriso e sua boa humor comunicativa. Voce foi o raio de luz do laboratório. Bom coragem pra todas coisas que vão seguir !

Un grand merci à **Arnaud Cressant** pour ces nombreuses heures passées à parler d'autres choses que de science et qui m'ont permis de prendre du recul, merci pour les sessions HADOPI, courage pour la suite, ça va le faire !

Je remercie particulièrement mon compagnon de fortune, **Pierre Serreau**. Nos discussions sérieuses et celles qui l'étaient un peu moins, m'ont beaucoup éclairées. Merci pour tous les bons moments distillés tout au long de ces 3 années.

Merci au personnel animalier, Calette, Nathalie, Noémie et Joël qui fournissent un travail de l'ombre indispensable au bon fonctionnement de tous nos travaux de recherche. Merci à vous pour votre courage et votre dévouement.

Je remercie vivement tous les étudiants, et post doc du CNPS, présents ou partis, avec qui j'ai passé de très bons moments, Alexandra (la petite), Alexandra (la grande), Florence, Fabien, Sophie, Rémi, Quentin, Grégoire, Glenn.

Merci également à tous les étudiants de passage qui ont marqué le laboratoire, Ludo, Aurélia, Zoubéida, Mandy, Jessica, Thiebault, Fabien, Elsa, Elodie, Sébastien et ceux que j'oublie.

Merci à **Marie & Adrien, Manu & Alex**, qui n'ont jamais rien compris à ce que je faisais dans la vie, mais qui m'ont soutenu à leur manière.

Merci à mes « BRO » : **Antoine** et **Jrej** toujours partants pour me faire décrocher de mes articles, et de mes manips. Sans vous je ne serais pas le même, soyez en sûrs !

Je remercie évidemment ma **famille**, grands parents, parents, frères et sœur qui ont toujours cru en moi et ont accepté les sacrifices que j'ai fait pour continuer ma voie et mes études....je vous aime. J'ai également une pensée particulière pour mes grands parents, les seuls que j'ai, et le mal qui les ronge... Merci, tout simplement.

Merci également à ma **belle-famille**, les Gauthier, de m'avoir toujours soutenu et encouragé dans tout ce que j'ai entrepris.....y compris cette thèse. Mais surtout merci de m'avoir confié votre fille.

Enfin, merci à ma moitié, **Myriam**, sans qui j'aurais sûrement eu beaucoup plus de mal à tenir le cap de ces trois années de travail intense. La page de la thèse se tourne, une page de post-doc commence, d'autres viendront, mais malgré tout : elle reste mon marque-page.

Pour moi, ma thèse c'est un ensemble de choses qui m'ont permis de me construire en tant que scientifique mais aussi en tant qu'homme. Merci à ceux que j'oublie et qui ont pris part à ce chapitre de ma vie.

Table des matières

Liste des abréviations	9
Liste des publications & communications	11
Avant – propos	13
Introduction générale	19
1. Les motivations naturelles chez les animaux : cas particulier de la motivation sociale.	19
1.1. Définition(s) de la motivation	19
1.1.1. Pyramide des besoins	19
1.1.2. Motivations primaires/Secondaires	21
1.1.3. L'interaction entre apprentissage, motivation & émotion.	23
1.1.4. L'interaction sociale : une vraie motivation ?	25
1.2. Evaluation des motivations et choix : bases neurales	28
1.2.1. La découverte du système limbique	29
1.2.2. Classement des motivations : rôle de la dopamine.	32
1.2.2.1. La dopamine	32
1.2.2.2. Les récepteurs à la dopamine	33
1.2.2.3. Les voies dopaminergiques	36
1.2.3. Système Dopaminergique et prise de décision	37
1.3. Interface motivation, système cholinergique et cortex préfrontal.	41
1.3.1. Système cholinergique	41
1.3.2. Les récepteurs cholinergiques	43
1.3.3. Rôle modulateur des récepteurs nicotiniques, nAChRs.	44
2. Prise de décision, flexibilité comportementale et choix de motivation	46
2.1. Les concepts de prise de décision et flexibilité comportementale	46
2.1.1. Définitions	46
2.1.2. Les différentes étapes du processus	48
2.1.3. Evolution des études sur la prise de décision	52
2.1.4. Mesures expérimentales	53
2.1.4.1. Mesures expérimentales chez l'Homme	54
a. L'Iowa Gambling Task	54
b. Le Wisconsin Card Sorting Test.	55
2.1.4.2. Mesures expérimentales chez l'animal	57
a. Rodent Gambling Task (RGT) adapté de l'IGT.	57
b. WSCT, Reversal, autres tâches de flexibilité (changement de stratégie, habituation...etc.)	59
c. Tâche d'interaction sociale (SIT, « Social interaction task »)	63
2.2. Substrats neurobiologiques impliqués dans la prise de décision	65
2.2.1. Le cortex préfrontal	65
2.2.1.1. Organisation corticale	65
2.2.1.2. Caractéristiques cytoarchitectoniques	66
2.2.1.3. Fonctions des sous-parties du CPF	69
2.2.1.4. Connexions cortico-corticales	74
2.2.1.5. Circuit fronto-sous corticaux	74
2.3. Flexibilité comportementale, prise de décision et pathologies	78

3. Modèle animal de déficit de flexibilité pendant l'interaction sociale	79
3.1. L'utilisation de modèles animaux	79
3.1.1. Avantage de l'utilisation de modèles animaux	79
3.1.2. Validité expérimentale du modèle souris	79
3.1.3. Modèle de flexibilité comportementale : l'interaction sociale des β 2KO	81
3.2. Les vocalisations chez les animaux	82
3.2.1. Historique	82
3.2.2. Types de vocalisations ultrasonores	84
3.3. Utilisation du modèle USVs chez le rongeur	86
3.3.1. Les USVs chez le rat	87
3.3.2. Les USVs chez la souris	89
Objectifs de thèse	93
Matériels & méthodes	97
1. Souris utilisées	97
2. Tâche d'interaction sociale (SIT pour « social interaction task »)	98
3. Interaction avec un nouvel objet	99
4. Exploration libre d'environnement	99
5. Le labyrinthe 3 chambres (« Three chambers task » ou 3Ch)	100
6. Le stress de contention	101
7. Enregistrement et analyse des vocalisations ultrasonores (USVs)	101
8. Modulation de motivations naturelles	104
10. Histologie & marquages cellulaires	106
11. Analyses statistiques	111
Résultats & Articles	115
Chapitre 1: <i>Substrats neurobiologiques impliqués dans la flexibilité comportementale.</i>	115
Chapitre 2: <i>Indices comportementaux associés aux processus de prise de décision.</i>	144
Chapitre 3: <i>L'effet de la modulation de motivation sur la flexibilité comportementale et la hiérarchie des motivations naturelles.</i>	180
Conclusions générales & perspectives	223
Bibliographie	231
Annexes	258

Index des figures & tableaux

≈ Figures ≈

Figure 1: La pyramide de Maslow proposant l'organisation hiérarchique des besoins chez l'Humain

Figure 2: Principales fonctions de la récompense : l'apprentissage (Learning), la motivation (Wanting) et le plaisir (Liking)

Figure 3: « Brain stimulation reward » ou BSR

Figure 4: Représentation schématique de la voie dopaminergique et de ces modulateurs cholinergiques

Figure 5: Voie de biosynthèse et structure chimique de la dopamine

Figure 6: Représentation schématique d'une synapse dopaminergique

Figure 7: Le système Dopaminergique

Figure 8: Interaction système dopaminergique et prise de décision

Figure 9: Principales voies cholinergiques chez le rongeur et répartition des récepteurs nicotiniques (nAChRs)

Figure 10: Représentation des processus fondamentaux autour de la notion de flexibilité comportementale

Figure 11: Différentes étapes des processus de prise de décision

Figure 12: Evolution du nombre de publications et disciplines consacrées à la prise de décision

Figure 13: Principe de l'Iowa Gambling Task (IGT) et du Wisconsin Card Sorting Task (WCST) utilisé chez l'homme

Figure 14: Adaptation de l'IGT aux modèles rongeurs (RGT) et nombreuses variations

Figure 15: Mesures expérimentales de flexibilité comportementale chez le rat

Figure 16: Le cortex préfrontal chez le rongeur et chez l'Homme

Figure 17: Reconstruction 3D du trajet de la barre à mine à partir du crâne de Phinéas Gage

Figure 18: Modèle original des mécanismes neuronaux à l'origine de la prise de décision dans le CPF

Figure 19: Principales efférences des cortex prélimbique PrL et infralimbique

Figure 20: Organisation des circuits fronto-striataux connectant les sous-régions du CPF au striatum.

Figure 21: Exemples de sonagrammes de vocalisations émises par différentes espèces

Figure 22: Séquence d'USVs et classification chez la souris

Figure 23: Spectrogramme des vocalisations 22-kHz et 50-kHz de rats

Figure 24: Photos de la cage d'interaction sociale (SIT)

Figure 25: Représentation schématique du labyrinthe 3 chambres et organisation

Figure 26: Principe d'enregistrement des réponses auditives du tronc cérébral

Figure 27: Plan expérimental précédant l'obtention des coupes pour l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence

Figure 28: Principe de détection de la protéine c-Fos par immunohistochimie basée sur la réaction d'oxydation de la DAB

Figure 29: Diagramme chronologique des différentes étapes d'immunohistochimie utilisée pour marquer la protéine c-Fos

Figure 30: Section coronales schématiques du cerveau de souris représentant les zones d'intérêts

Figure 31: Effet de l'isolement et de l'habituation sur le temps de contact social et sur l'exploration

Figure 32: Comportement social des souris $\beta 2\text{KO}$ et C57BL6/J (WT) en SIT-isolé

Figure 33: Comportement social des souris $\beta 2\text{KO}$ et C57BL6/J (WT) en condition non isolés

Figure 34: Niveau d'activation c-Fos après interaction sociale chez les animaux WT

Figure 35: Niveau d'activation c-Fos après interaction sociale chez les animaux $\beta 2\text{KO}$

Figure 36: Les lésions du cortex prélimbique affectent le comportement flexible lors de l'interaction sociale

Figure 37: Impact des lésions du cortex orbitofrontal sur le comportement social.

Figure 38: Réexpression lentivirale de la sous-unité $\beta 2^*n\text{AChRs}$ au niveau prélimbique chez des animaux $\beta 2^{-/-}$

Figure 39: Données comportementales des animaux réexprimés comparées aux WT et aux $\beta 2\text{KO}$

Figure 40: USVs émises lors de trois tâches à caractère social différent

Figure 41: Composition du répertoire vocalisant et fréquences d'émission des USVs lors de la tâche SIT et de 3 chambres chez les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 42: Seuil d'audition à différentes fréquences pour des souris WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 43: Emissions de vocalisations et motivation sociale

Figure 44: Répertoire vocal et durée des USVs durant l'interaction sociale

Figure 45: Corrélation entre production de vocalisations et comportement social

Figure 46: Emissions de vocalisations lors de l'exploration et de la contention

Figure 47: Répertoire vocal et durée des USVs durant les tâches non sociales d'exploration et de contention

Figure 48: interprétation de la relation entre USVs et état motivationnel

Figure 49: Représentation schématique des régions connectées à PAG chez l'homme

Figure 50: Comparaison entre l'analyse manuelle et l'analyse automatisée par MiceProfiler

Figure 51: Analyse de la séquence de contact social par MiceProfiler chez des animaux WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 52: Analyse des séquences « isolé approche, visiteur échappe, isolé poursuit » ou poursuite (IA-VE-IP) et « isolé approche, et part » (IA-IE) par MiceProfiler chez des animaux WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 53: Analyse des événements « dos à dos » lors de l'interaction sociale chez des animaux WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 54: Analyse des séquences de « Stop » chez les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$

Figure 55: Comportement social par MiceProfiler chez des animaux WT en SIT-isolé et SIT-groupé

Figure 56: Analyse des séquences « isolé approche, visiteur échappe, isolé poursuit » ou poursuite (IA-VE-IP), « isolé approche» (IA), et « visiteur approche » (VA) par MiceProfiler chez des animaux WT en SIT-isolé et SIT-groupé

Figure 57: Analyse des événements « dos à dos » lors de l'interaction sociale chez des animaux WT en SIT-isolé et SIT-groupé

Figure 58: Analyse des séquences de « Stop » chez des animaux WT en SIT-isolé et SIT-groupé

Figure 59: Hiérarchie des motivations naturelles (nourriture, exploration d'un nouvel objet, et d'un congénère) lors de la tâche de 3 chambres

Figure 60: Hiérarchie des motivations naturelles lors de la tâche de 3 chambres et production d'USVs

≈ Tableaux ≈

Tableau 1: Composition du répertoire vocal chez les animaux WT et β 2KO lors des tâches de SIT (*haut*) et de 3Ch (*bas*)

Tableau 2: Récapitulatif des résultats principaux concernant les émissions d'USVs au sein des différentes conditions expérimentales

Tableau 3: Tableau récapitulatif de la hiérarchie de motivation lors des conditions de trois chambres normale ou privée

Liste des abréviations

ACC : Cortex cingulaire antérieur

ACh : Acétylcholine

AchE : Acétylcholinestérase

ATV : Aire tegmentale ventrale

β2KO : Souris knock-out (KO) pour la sous-unité β2 des récepteurs nicotiques

BLA : Amygdale basolaterale

BSR : Brain stimulation reward

CAT : Choline acétyltransferase

Cg1 : Cortex cingulaire 1

COF : Cortex orbitofrontal

COMT : Catéchol-O-méthyl-transferase

CPF : Cortex préfrontal/ **CPFm** : cortex préfrontal médian/ **CPFdl** : CPF dorsolatéral

DAT : Dopamine transporteur

DMS : Striatum dorso-médian / **VS** : Striatum ventral

DOPAC : Acide 3,4-dihydroxyphenylacétique

GDP : Guanosine di-phosphate

GTP : Guanosine tri-phosphate

IGT : Iowa gambling task / **RGT**: Rodent gambling task

IL : Cortex infralimbique

KHz : Kilohertz / **Hz** : Hertz

LOVO : Cortex orbitofrontal latéro-ventral

MAO : Monoamine oxydase

M1 : Cortex moteur primaire

NAcc : Noyau accumbens

nAChRs : Récepteurs nicotinique à l'ACh

NTPP : Noyau tegmental pédonculo pontin

NTDL : Noyau tegmental dorsolatéral

PAG : Substance grise périaqueducale

PFA : Paraformaldéhyde

PrL : Cortex prélimbique

SNC : Système nerveux central

SN_{pc} : Substance noire *pars compacta*

SN_r : Substance noire réticulée

SIT: Social interaction task, ou tâche d'interaction sociale

USVs : Vocalisations ultrasonores

WCST: Wisconsin card sorting task

WT : « Wild type », ou souris C57BL6/J

3Ch : Tâche de trois chambres

Liste des publications & communications

ARTICLE 1: Avale ME., **Chabout J.**, Pons S., Serreau P., De Chaumont F., Olivo-Marin J-C., Bourgeois J-P., Maskos U., Changeux J-P., and Granon S. (2011) **Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice.** *FASEB J* 25, 2145- 55

ARTICLE 2: **Chabout J.**, Serreau P., Ey E., Bellier L., Aubin T., Bourgeron T., Granon S. (2012) **Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment.** *PLoS ONE* 7(1): e29401. doi:10.1371/journal.pone.0029401

ARTICLE 3: Serreau, P., **Chabout, J.** , Suarez, S.V., Naudé, J., and Granon, S. (2011) **Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations.** *Behav. Br. Res* 225, 151-159

ARTICLE 4: **Chabout J.**, Cressant A., Hu X., Edeline J-M., Granon S. (*en preparation*) **Motivational ranking in safe environment and importance of social reward: role of nicotinic receptors of acetylcholine.**

ARTICLE 5: De Chaumont F., Dos-Santos Coura R., Serreau P., Cressant A., **Chabout J.**, Granon S., and Olivo-Marin J-C. (2012) Computerized video analysis of social interactions in mice. *Nature Methods* doi:10.1038/nmeth.1924

Communications affichées

Chabout J., Serreau P, Bellier L, Ey E, Bourgeron T, Aubin T, Granon S, Role of ultrasonic vocalizations in adult male mice during social interaction: a first insight. **FENS 2010**, Amsterdam, Netherlands (**Poster**).

Chabout J., Serreau P, Bellier L, Ey E, Bourgeron T, Aubin T, Granon S, Motivation for social interaction induced production of rich and wide ultrasonic vocalizations repertoire in adult male mice. **IBRO congress 2011**, Firenze, Italy (**Poster**).

Avant-propos

Avant – propos

Qu'est ce qui nous motive ?

La connaissance ? L'argent ? Le travail ? La reconnaissance ? L'amour ? Le sexe ? Qu'est ce qui me motive à écrire ce manuscrit de thèse ? Et vous..... qu'est ce qui vous motive à me lire ? Qu'est ce que la motivation ? La définition la plus simpliste est celle du Dictionnaire LAROUSSE : « Ce qui motive, explique, justifie une action quelconque ». L'encyclopédie UNIVERSALIS aborde la notion de but, aussi appelé renforcement : « Action motivée par le plaisir ou l'absence de douleur ». La plupart des psychologues parlent de « Facteur amenant l'organisme à agir et à tendre vers certains buts. »

Le terme de motivation renvoie à un domaine très large incluant des concepts différents étudiés dans des contextes méthodologiques très variés. Ainsi, selon M. Reuchlin (Reuchlin 1981): « l'emploi du même terme [Motivation, ndlr] par des psychologues différents ne signifie nullement qu'ils parlent tous des mêmes faits, ou qu'ils utilisent tous les mêmes principes explicatifs. ». Il en résulte une certaine incompréhension face à ce terme qui peut vouloir dire beaucoup de choses. Seulement, il semblerait que la notion de but soit toujours présente, qu'en est-il ?

Le principe de motivation repose sur 2 hypothèses majeures : **l'homéostasie** et **l'hédonisme**.

La notion d'homéostasie a vu le jour entre 1850 et 1870. Claude Bernard fût le premier à proposer que la « fixité du milieu intérieur soit la condition de la vie libre et indépendante ». Cette notion sera reprise en 1932 par le physiologiste W.B. Cannon, lequel accordera plus d'importance à « l'équilibre physiologique » et sera le premier à proposer le terme d'**homéostasie** dans son ouvrage « la sagesse du corps, 1932 ». Alors quelle relation entre motivation et homéostasie ? La motivation résulterait d'un déséquilibre de l'état interne de l'individu créé par certaines conditions de privation entraînant un état de **besoin** (en anglais: *need*), auquel il faudrait remédier. De ce fait l'individu s'attache à réduire cet état de besoin en s'orientant vers **l'objet-but** responsable de son état. M. Reuchlin (comme

beaucoup de psychologues) parle de **pulsions** (en anglais : *drive*) pour caractériser cette conduite (*i.e.* : un animal privé de nourriture sera affamé et aura comme motivation de trouver de la nourriture pour sortir de cet état de faim, et se diriger vers un état de satiété). Cette façon de voir les choses fonctionne bien pour les « motivations primaires » (tel que la faim, la soif, le sexe, la douleur...etc.), mais les pulsions peuvent être déclenchées par d'autres choses que les besoins. En effet dans un état physiologique normal, l'individu peut déstabiliser cet état d'équilibre et accroître les « tensions » pour accéder au plaisir, à l'**hédonisme**. Le même **objet-but** que tout à l'heure peut alors prendre un tout autre sens, et se voir catégorisé non plus comme un **besoin**, mais comme un **incitateur** (en anglais : *incentive*). Ainsi la vue d'une part de tarte, alors que nous ne sommes pas affamés, peut entraîner une sensation de faim et l'envie de se délecter de ce met. Pour la plupart des physiologistes et neurobiologistes d'aujourd'hui, l'expression de cette motivation requiert une série de processus affectifs qui sous-tendent la récompense (l'incitateur ou objet-but est ce qu'on appelle une récompense, en anglais : *reward*). En effet la notion de motivation est difficilement dissociable de la notion de récompense et, selon Berridge (Berridge 2004), apprécier pleinement une récompense nécessite d'avoir mis en place les deux processus que sont le « **wanting** » (comportements motivés dirigés vers le but) et le « **liking** » (processus explicites d'hédonisme et émotions associées).

Mais avant d'apprécier n'importe quelle récompense, encore faut-il la choisir. Et c'est là tout le point de départ de cette thèse : comment un individu qui a le choix entre plusieurs types de récompenses motivantes fait-il pour prendre la décision la plus adaptée ? La prise de décision est un processus vital pour beaucoup d'espèces (Gibson & Langen 1996; Mulder 1990), ainsi prendre les bonnes décisions au bon moment est crucial pour l'individu. C'est également un processus qui nécessite l'intégration et l'analyse de paramètres motivationnels, émotionnels, environnementaux, sensoriels, et de mémoire (Fuster 2001; Ridderinkhof et al. 2004; Chudasama & T W Robbins 2006). Pour prendre une décision, il faut avant toute chose être conscient des conséquences qu'elle engendre, c'est-à-dire des renforcements qu'on obtient ou des conséquences négatives qu'on évite. Pour cela l'individu peut se remémorer les décisions prises auparavant et avoir une idée des conséquences d'une décision, proche ou similaire, à prendre à l'instant « t ». Dans les autres cas, il devra faire reposer son choix sur son **état motivationnel**, sa capacité à évaluer la récompense, son adaptabilité à l'environnement extérieur, etc.

Avant-propos

On voit donc ici qu'il existe un lien intime entre processus de prise de décision et motivation, et c'est ce lien que je vais aborder durant ce travail de thèse. J'ai étudié comment la modulation de certaines motivations naturelles (contact social, nourriture, exploration de l'environnement) influait sur les processus de prise de décision chez la souris et quels sont les régions cérébrales et processus comportementaux permettant l'émergence de ces choix.

Partie I : introduction générale

Introduction générale

1. Les motivations naturelles chez les animaux : cas particulier de la motivation sociale.

1.1. Définition(s) de la motivation

1.1.1. Pyramide des besoins

Il existe de nos jours de nombreuses théories sur la motivation et l'organisation de ces motivations (Lorenz & Leyhausen 1973; Bindra 1974; Bolles 1980; Toates 1986; Berridge 2004). Un des premiers scientifiques à proposer une théorie sur l'organisation pyramidale des besoins et son évolution chez l'Homme fût Abraham Maslow (Maslow 1943). Cette théorie repose sur 2 principaux points :

- Il existe des systèmes fondamentaux de besoins multiples et indépendants.
- Ces motivations sont hiérarchisées de telle sorte que certaines motivations sont dites prioritaires, ainsi certaines motivations doivent avoir été satisfaites avant d'envisager le passage à une motivation dites d'ordre supérieur.

Pour bien saisir le concept soulevé par Maslow dans les années 50, il faut avant tout savoir que Maslow avait développé cette théorie pour deux raisons : il souhaitait prendre la suite des travaux de son mentor et professeur Harry Harlow et il n'était pas d'accord avec la théorie développée par Skinner & Watson. Ces derniers avançaient qu'il existait très tôt chez l'individu des motivations primaires (telle que la soif ou la faim) qui servaient de bases à l'apparition de motivations secondaires plus complexes qui étaient ainsi apprises par un simple principe de conditionnement (Kenrick et al. 2010).

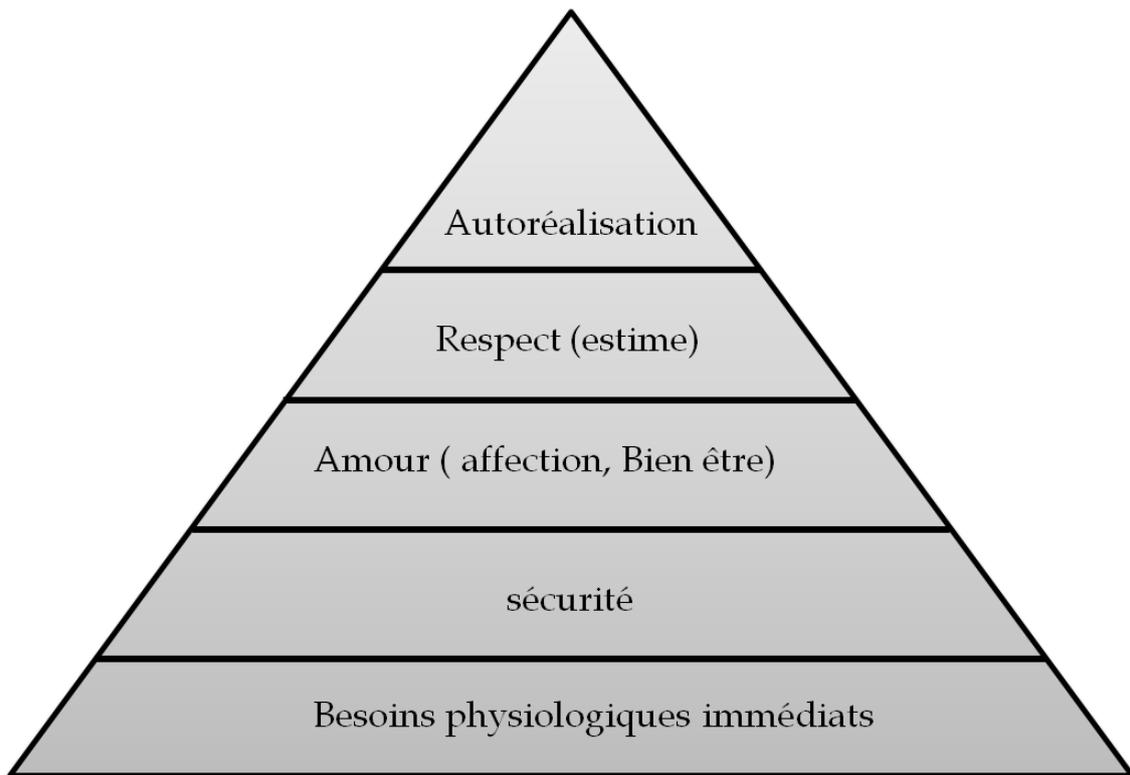


Figure 1: La pyramide de Maslow proposant l'organisation hiérarchique des besoins chez l'Humain (Maslow 1943).

Ainsi, en 1953, Harlow et collègues ont montré que des macaques rhésus isolés en venaient à préférer le contact social avec une « poupée en fils de fer » (faisant office de mère de substitution) mais habillée de chiffon même si celui-ci avait été nourrit en présence de la même « poupée » mais mise à nue (Harlow & R. . Zimmermann 1959). Harlow a ainsi montré que la motivation pour obtenir un contact social réconfortant et confortable était indépendante de l'expérience conditionnée de satisfaction de la faim. Pour lui, il y a donc une nette séparation entre ce que Skinner et ses collègues appelaient les motivations primaires et les motivations secondaires.

Seulement sur certains points les concepts de Skinner et de Maslow se rejoignent plus qu'il n'y paraît : ils avancent tous deux le fait que les motivations de bases sont le support des motivations supérieures. Maslow pense et établit qu'il faut que l'individu réponde en priorité aux besoins les plus bas de son échelle (**Figure 1**) avant de pouvoir envisager les étages supérieurs. Un individu qui n'aurait pas ses besoins physiologiques immédiats (nourriture, soif, santé...) assouvis serait dans l'impossibilité de répondre correctement aux besoins de sécurité, d'amour et autres. Ce modèle comporte bien évidemment ses limites, car

il peut exister des individus pour lesquels ce classement n'est pas vrai, des individus qui pour obtenir un besoin de reconnaissance vont, au détriment du « besoin » de sécurité, faire des actions risquées pour une action socialement valorisée (prise de risque).

1.1.2. *Motivations primaires/Secondaires*

Skinner et Pavlov ont basé leurs définitions de motivation primaire et secondaire sur l'association entre renforcement primaire et motivation. En effet le chien de Pavlov apprend à saliver lorsqu'il entend la cloche seulement si le son de la cloche a été associé à une distribution de nourriture. De la même façon le rat de Skinner apprend à appuyer sur le levier qui est dans la cage de conditionnement uniquement si cet appui est renforcé par la distribution de nourriture, de boisson sucrée ou autres récompenses. On parle de « **stimulus inconditionnel** » (la nourriture) associé à un « **stimulus conditionnel** » (la cloche ou le levier), et ce stimulus inconditionnel entraîne alors un besoin générant ce que l'on pourrait appeler une motivation primaire. Alors que sont les motivations secondaires ? Il a été montré dans le laboratoire de Pavlov (Pavlov 1927) que si on présente un stimulus visuel à la suite du son de cloche mais sans nourriture à un chien qui a été entraîné à saliver au son de la cloche, l'image entraîne une salivation de l'animal au bout d'un certain nombre d'essais alors qu'elle n'a jamais été associée à la nourriture. L'image est donc un attribut du renforcement dont la valeur attractive est devenu une motivation d'ordre supérieur pour le chien, et cette motivation est intimement liée au stimulus conditionnel primaire (son de cloche) associé quant à lui à la nourriture.

On rejoint donc ici le concept soutenu par Maslow & Skinner et par conséquent Pavlov qui montrent ainsi la mise en place d'une hiérarchie entre les motivations naturelles. Il existe des clivages de même nature au sein de la communauté de psychologues expérimentaux, par exemple pour H. Sagara (Sagara et al. 2010) il existe deux types de motivations : les motivations physiologiques (soif, faim, thermorégulation, sexe, ...) et les « autres » motivations plus intrinsèques (curiosité, intérêt personnel, comportement plus intra personnel). Peu importe les appellations, vous remarquerez que ces motivations, qui ont été classées dans des sections différentes, remplissent les mêmes critères. Ainsi, il semblerait que nous soyons à même de pouvoir proposer que les motivations primaires soient associées à des comportements nécessaires à la survie de l'individu ou de l'espèce (pour le cas particulier de la motivation sexuelle à but reproductif). Les motivations

secondaires, non liées à la survie immédiate, nécessitent un apprentissage par association avec des motivations de plus bas niveau.

Bien que nous parlions de « pyramide », il est à noter que Maslow n'a jamais mentionné dans ses écrits que son modèle constituait une pyramide, mais plutôt une « hiérarchie des besoins ». Personnellement j'aurais eu beaucoup de mal à trouver la motivation nécessaire pour écrire ce manuscrit si je n'avais pas été rassasié, hydraté. De la même façon vous auriez énormément de mal à me lire en ce moment même si vous aviez faim ou soif. L'idée de Maslow de proposer cette hiérarchie des besoins humains était pour le moins avant-gardiste, et aujourd'hui un bon nombre de scientifiques continuent d'utiliser son travail (Kenrick et al. 2010). Cependant, le fondement de la mise en place de cette hiérarchie des besoins n'est pas partagé par l'ensemble de la communauté scientifique et les raisons de ce rejet sont multiples. En effet, Maslow ayant basé ses observations sur la population occidentale, l'organisation de ces besoins n'est sûrement pas applicable de la même façon à d'autres populations (ex. asiatiques ou orientales). Par ailleurs, dans son idée de hiérarchie, le passage à des couches supérieures remet en question la stabilité des couches de base. Par exemple, comme nous l'avons vu précédemment, le besoin d'estime peut amener à négliger le besoin de sécurité au cours d'activités *risquées*, mais plus valorisantes. De plus, expérimentalement, les travaux visant à tester cette théorie l'ont plutôt infirmée. En effet, de nombreux constats (grèves de la faim, personnes se sacrifiant pour une autre) ont fait douter du postulat de départ selon lequel le besoin de survie est le premier mobile humain. Aujourd'hui, la plus grande majorité des psychologues et chercheurs du domaine se divisent en deux catégories, chacune soutenant une théorie différente. D'un côté les partisans de la « théorie comportementaliste », qui accorde surtout de l'importance aux influences extérieures sur le comportement plutôt qu'aux facteurs internes à l'individu. D'autre part des théories plus « cognitivistes », qui réintroduisent des mécanismes mentaux internes à l'individu au centre des processus de motivation, distinguent les motivations extrinsèques (basées sur la détermination de récompenses), et les motivations intrinsèques (intérêt de l'activité elle-même), et mettent ainsi l'accent sur ce qui pousse l'individu à agir (pulsions, besoins, etc.) ou ce qui le tire (buts, attentes).

1.1.3. *L'interaction entre apprentissage, motivation & émotion.*

Pour justifier les choix que nous prenons, nous parlons couramment des motivations qui nous ont poussées à choisir une solution plutôt qu'une autre. Seulement cette récompense que l'individu convoite n'est pas seulement issue de la simple motivation. Qu'est ce qui fait que l'individu considère une récompense comme « récompensante » ? Beaucoup considèrent que la récompense est « l'objet » ou l'action qu'ils reçoivent pour avoir fait quelque chose de bien. Comme un employé qui reçoit une prime pour avoir augmenté son rendement. Cette fonction de la récompense cadre parfaitement avec le conditionnement instrumental : la récompense sert de renforcement positif à un comportement. Une autre perception de la récompense peut être considérée ainsi : nous faisons quelque chose car cela va entraîner une (des) conséquence(s) plaisante(s). Nous touchons là à la notion de plaisir, au caractère hédonique de cette récompense. Mais a-t-on véritablement besoin de plaisir pour que quelque chose soit récompensant ?

Ainsi, le renforcement est associé à plusieurs principes psychologiques de base. En effet, Pavlov (Pavlov 1927) fût l'un des premiers à définir la récompense comme un objet produisant un changement comportemental assimilé à l'apprentissage. Comme nous l'avons décrit précédemment la répétition de l'association entre le son de cloche et la nourriture provoque chez son chien une salivation. Ce comportement salivaire est donc modifié au cours du temps par l'apprentissage répété de l'association entre ces deux stimuli (la nourriture ou stimulus inconditionnel, et le son de cloche ou stimulus conditionnel), c'est le « **conditionnement Pavlovien** » ou « **conditionnement classique** ». La récompense peut également jouer un rôle de « renforçateur », mais au lieu de renforcer une association entre deux stimuli (comme c'est le cas lors de conditionnement pavlovien), elle va renforcer un comportement particulier lors de réponse instrumentale. Ainsi, lorsqu'un stimulus peut entraîner une série de plusieurs réponses toutes différentes, l'association du renforcement à l'une d'entre elles va renforcer le lien entre ce stimulus et cette réponse comportementale précise.

La récompense peut également avoir une fonction de gratification, et ainsi avoir une valeur motivationnelle donnée. Elle « motive » l'individu à réaliser un comportement (approches, appuis sur un levier, etc.) pour recevoir de nouveau cette récompense : « *Reward make you come back for more* » « la récompense vous fait revenir pour plus encore » (Schultz 2006). La récompense possède donc une valeur motivationnelle espérée, c'est-à-dire ce que

nous nous représentons, la valeur que l'on donne aux choses et qui va peser dans la balance du choix entre plusieurs récompenses. Lorsque l'on parle de renforcement, il y a également un aspect émotionnel ou affectif sous-jacent à ne pas négliger. En effet, le renforcement est considéré comme tel aussi parce qu'il induit une réaction affective souvent associée au plaisir du renforcement. Cette réaction peut être mesurée, par exemple, par l'observation de l'expression faciale. La fonction hédonique associée à la récompense représente le plaisir ressenti lors de la consommation de la récompense qui nous permet d'évaluer la valeur réelle (ou ressentie) de ce renforcement. Cette même valeur réelle servira par la suite à l'individu lorsqu'il sera confronté aux mêmes types de choix et lui permettra d'ajuster la valeur qu'il associe aux différentes récompenses et ainsi de choisir celle qui sera la plus appropriée selon son état du moment.

Berridge K. et d'autres physiologistes et neurobiologistes, ont découpé de façon artificielle cette récompense en trois grandes fonctions comportementales (**Figure 2**) : l'**apprentissage** (en anglais : *Learning*), la **motivation** (en anglais : *Wanting*) et le **plaisir** (en anglais : *Liking*) (Berridge 2003; Schultz 2006). Ce découpage repose en partie sur des données pharmacologiques montrant que certaines récompenses peuvent être renforçantes en l'absence de « wanting », ou de « liking ». En effet, lors de conditionnement pavlovien chez des pigeons ou des rats, lors de la présentation du stimulus conditionné, certains animaux essaient de manger le levier si ce stimulus est associé à la nourriture (Berridge 2009). Concrètement ces trois fonctions comportementales sont intimement liées et agissent les unes sur les autres de façon permanente, pour Berridge un renforcement n'est pas complet si il n'y a pas à la fois le « liking » et le « wanting ». Ce découpage est donc artificiel, mais permet notamment de faciliter la tâche des neurobiologistes lors de l'étude des mécanismes neuronaux impliqués dans le traitement des récompenses.

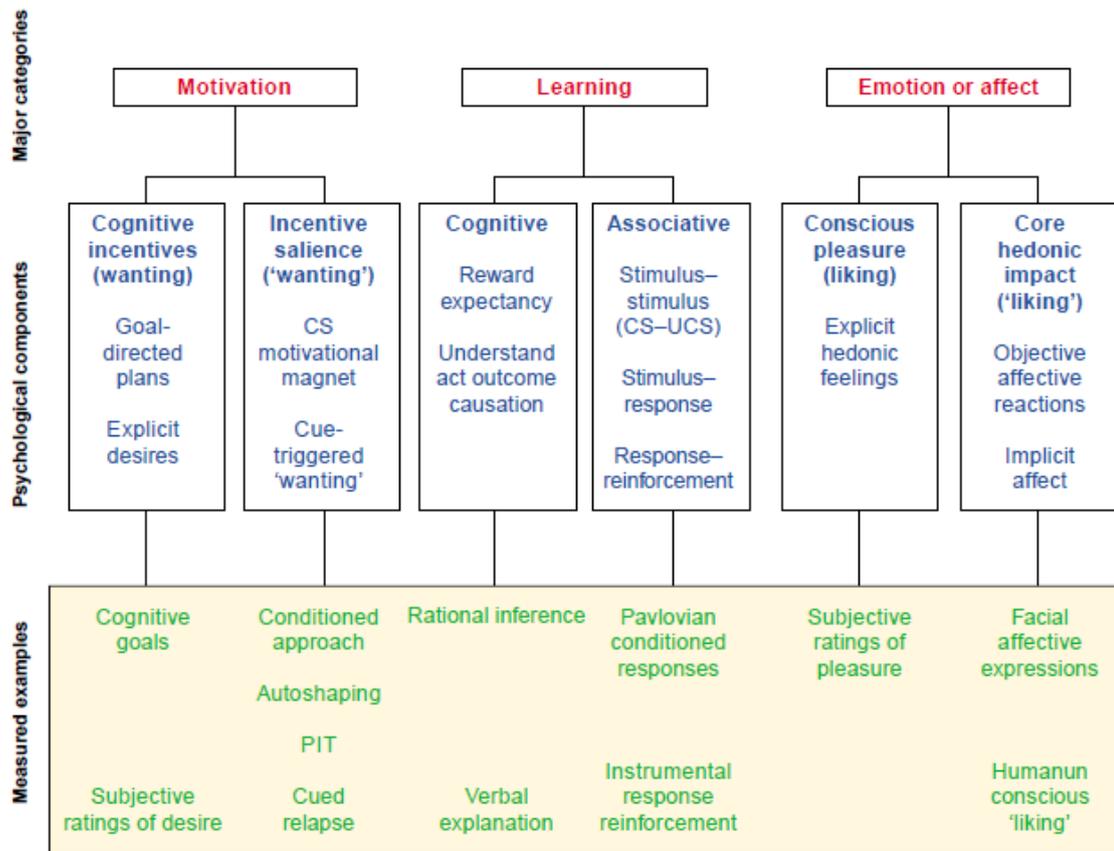


Figure 2: Principales fonctions de la récompense : l'apprentissage (Learning), la motivation (Wanting) et le plaisir (Liking). Ces processus agissent à la fois à un niveau implicite (ou inconscient) et explicite (ou conscient). En vert : divers exemples de mesures comportementales de ces processus (Berridge 2003).

1.1.4. L'interaction sociale : une vraie motivation ?

L'approche sociale est l'une des composantes les plus basiques de toute interaction sociale. Quel est le rôle de l'interaction sociale ? Pourquoi humains, rats, souris et autres mammifères effectuent des interactions sociales ? L'interaction sociale est-elle une vraie motivation ? Une motivation primaire ? Secondaire ?

Vivre en société implique des contraintes, mais apporte des avantages par rapport à la vie solitaire. Objectivement le rassemblement des individus représente surtout une façon de se protéger des prédateurs, et de pouvoir procréer pour le maintien de l'espèce sans avoir à parcourir de grandes distances pour trouver un(e) partenaire sexuel(le). L'établissement de nouvelles interactions sociales est dépendant de processus multiples. En effet des études d'imagerie cérébrale ont pu montrer que des réseaux de mémoires, d'émotions et d'actions

étaient activés chez l'Humain (Grigsby & Stevens 2002; Martin & Weisberg 2006) et chez le primate non-humain (Gil-da-Costa et al. 2004) lors de tâches sociales. Ces tâches sociales chez l'animal représentent souvent la propension à établir ou répondre à un contact avec un congénère (Moy et al. 2004; Nadler et al. 2004), ou à des stimuli d'ordre sociaux, tels que les stimuli visuels, olfactifs (Rudebeck et al. 2006).

L'utilisation de rongeurs de laboratoire a permis d'étudier plus facilement les processus et réseaux neuronaux impliqués dans l'établissement de contacts sociaux car les scientifiques peuvent aisément les manipuler et disséquer les comportements. Cependant l'utilisation de modèles animaux pour l'étude du comportement social repose sur une connaissance approfondie de leurs comportements à l'état naturel et de la façon dont ils établissent les interactions sociales avec d'autres congénères.

La souris et le rat sont des rongeurs sociaux, dont l'organisation des colonies diffère légèrement : en effet la souris fonde une colonie à partir d'un couple d'individus (d'un mâle et une ou deux femelles) et, s'ajoutent ensuite les petits (Arakawa et al. 2007; Laviola & Terranova 1998; Whishaw et al. 2001). Chez le rat une colonie peut être constituée de plusieurs individus mâles et de plusieurs individus femelles partageant le même nid et les mêmes galeries (Crawley 2000). Dans les deux cas cette organisation permet notamment de sécuriser le groupe et ce de plusieurs façons. Les colonies de rats et de souris sont toutes deux défendues par le mâle dominant qui protège les individus de son groupe et le territoire occupé par celui-ci en attaquant les prédateurs (R J Blanchard & D C Blanchard 1977). Ce besoin d'interaction sociale répond donc à l'appel de motivations primaires, telles que les motivations sexuelles, de protection, de nourriture. Par exemple, la vie en société permet aux animaux de la colonie de ne consommer que ce qui a déjà été consommé sans risque par d'autres individus, et donc saines. C'est ce que nous appelons la transmission sociale de préférence alimentaire (Bunsey & Eichenbaum 1995; Galef et al. 1983; Crawley 2000). Ces critères sont-ils suffisants pour définir l'interaction sociale comme une motivation ? Ou est ce simplement un besoin ? Si on s'en tient aux définitions des motivations de Skinner et Pavlov, alors l'interaction sociale est une motivation secondaire car associée à des motivations plus primaires. H. Sagara et al., (Sagara et al. 2010) classent l'interaction sociale dans la catégorie des motivations intrinsèques, à caractères plus personnels donc beaucoup plus proche des motivations primaires selon les concepts de Maslow, que des motivations secondaires.

La littérature est extrêmement détaillée et dense en ce qui concerne les différents apprentissages et/ou conditionnements que l'on peut réaliser chez l'animal avec comme

renforcement positif l'interaction sociale. Cette dernière peut être divisée en plusieurs types tels que le comportement maternel, sexuel ou encore le comportement de jeux chez les jeunes (Trezza, Campolongo, et al. 2011b). En effet chez le rat adolescent le jeu est le comportement social le plus caractéristique et étudié (Panksepp et al. 1984; Normansell & Panksepp 1990; van den Berg et al. 1999; Trezza, Campolongo, et al. 2011b). Il a été décrit qu'il est utile au développement de capacités cognitives, sociales et physiques indispensables pour la vie d'adulte (Panksepp et al. 1984; Spinka et al. 2001; Von Frijtag et al. 2002). De plus, la privation de comportement de jeu entraîne une baisse de certaines habilités à gérer les situations sociales à l'âge adulte (Von Frijtag et al. 2002; van den Berg et al. 1999). Ainsi le jeu avec d'autres rats de la cage est considéré comme un renforcement très positif, comme il a pu être montré dans des tâches de conditionnement de préférence de place (Crowder & Hutto 1992; Calcagnetti & Schechter 1992), et d'apprentissage de labyrinthes (Normansell & Panksepp 1990). Chez le primate le comportement de toilettage mutuel est également une source positive de motivation (Falk 1958), permettant notamment de conditionner les animaux à appuyer sur un levier pour accéder à ce type de récompense (Mason et al. 1962; Mason et al. 1963). Chez la souris, et ce malgré que ce soit un animal social, il est relativement difficile de discerner des comportements typiques de jeux des autres types de comportements, tant le répertoire comportemental de la souris est vaste et différent de celui du rat adolescent. Cependant il a été montré récemment que l'approche d'un nouveau congénère de même sexe est quelque chose de motivant pour l'animal. Ceci a été mis en évidence chez la souris jeune (Panksepp & Lahvis 2007), mais également chez la souris adulte lorsqu'elles se trouvent dans un environnement nouveau (Granon et al. 2003).

Depuis les années 80, les chercheurs ont dévoilés que les systèmes de neurotransmissions qui jouent un rôle dans les motivations et propriétés hédoniques de la nourriture et des drogues (dopamine, opioïdes, endocannabinoïdes), jouent également un rôle dans les comportements sociaux (Marco et al. 2011). Plusieurs auteurs ont montré l'implication de la neurotransmission dopaminergique mesocorticolimbique dans les comportements sociaux (Panksepp et al. 1984; Vanderschuren et al. 1997; Young et al. 2011; Siviy & Panksepp 2011). En effet, le comportement social entraîne une augmentation du niveau de dopamine au niveau du pro encéphale de rats juvéniles tandis que l'application d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques dans cette région cérébrale, comme l'halopéridol, entraîne une diminution des comportements sociaux (Beatty et al. 1982; Holloway & Thor 1985; Niesink & Van Ree 1989). De plus, une injection d'une forte quantité

d'apomorphine (qui active à la fois les récepteurs pré et post-synaptiques à la dopamine) stimule l'apparition de comportement sociaux (Niesink & Van Ree 1989).

En ce qui concerne le système opioïde, l'injection d'agonistes des récepteurs aux opioïdes (tel que la morphine ou la méthadone) entraîne une augmentation du comportement social de jeu chez le rat. A l'inverse lorsqu'on injecte un antagoniste de ces mêmes récepteurs (la naloxone par exemple) la fréquence de ce même comportement se trouve diminué (Trezza et al. 2010; Trezza, Damsteegt, et al. 2011). Ces résultats apportent une indication supplémentaire que des systèmes impliqués dans les motivations de type drogues, modulent ce comportement social de jeu et sont donc impliqués dans les comportements sociaux au sens large du terme. Ces exemples montrent que le comportement social au sens large du terme (regroupant le contact social, le comportement maternel et sexuel) est source de motivation pour les individus et ainsi, qu'il peut être utilisé comme renforcement dans des tâches de conditionnement, donnant ainsi un argument comportemental solide à la classification de l'interaction sociale dans le rang des motivations. Ainsi à la question posée au début de ce paragraphe - la motivation sociale est-elle une vraie motivation ? - l'ensemble des études tendent à montrer qu'effectivement, elle en a tous les attributs neurobiologiques, neurochimiques et comportementaux.

1.2. Evaluation des motivations et choix : bases neurales

L'interaction sociale ainsi que d'autres motivations (sexuelle, alimentaire, consommation de drogues) partagent certains systèmes et circuits neuronaux. Contrairement à ce qui a longtemps été admis, la gestion de l'évaluation et de l'attrait pour telle ou telle motivation ne résulte pas d'un « centre des plaisirs » unique, mais plutôt d'un « circuit de la récompense ». Celui-ci impliquant plusieurs structures et étant régulé par plusieurs systèmes.

Il est toutefois intéressant de comprendre, en exposant certains résultats clés, comment l'émergence de ce concept a amené les scientifiques à considérer l'existence d'un « complexe multi-systémique » permettant de coder la multitude de motivations auxquelles l'individu peut être confronté tout au long de sa vie.

1.2.1. *La découverte du système limbique*

La notion de « système de récompense » telle que nous la définissons aujourd'hui est assurément née d'une erreur scientifique.

Dans les années 50 deux scientifiques Canadiens, James Olds et Peter Milner, tentent d'implanter une électrode dans le cerveau d'un rat dans l'espoir de pouvoir stimuler électriquement une région donnée et ainsi obtenir une réponse physiologique. Malheureusement l'expérience échoue, et ils se retrouvent avec des rats qui retournent systématiquement à l'endroit précis de la cage où ils ont reçu la stimulation, comme s'ils en redemandaient encore. Ce n'est qu'après vérification anatomique que Olds & Milner se sont aperçus qu'ils n'avaient pas implanté l'électrode au bon endroit. Initialement prévue dans la région du mésencéphale, elle était en réalité située dans l'hypothalamus latéral, à proximité de l'aire septale (**Figure 3A**). Par la suite James Olds (Olds & Milner 1954) a imaginé et construit un dispositif permettant à l'animal de s'administrer des stimulations électriques par simples appuis sur une pédale (**Figure 3B**). Dans *L'ultime secret* (aux éditions Albin Michel) B. Werber a extrapolé cette technique scientifique en l'appliquant, de façon fictive, chez l'Humain. Dans le livre, cette stimulation intracrânienne rend possible l'apprentissage de choses complexes et le surpassement de soi dans le seul but d'obtenir une stimulation électrique. La fiction n'est pourtant pas si éloignée de la réalité, chez l'animal de laboratoire cette stimulation électrique a pour effet d'agir comme une récompense réelle alors qu'elle n'est issue d'aucune activation sensorielle et ne comble aucun besoin : c'est en quelque sorte la « récompense ultime ». La notion de « centre de plaisir » ainsi que le concept « **Brain stimulation reward** », ou BSR étaient alors nés.

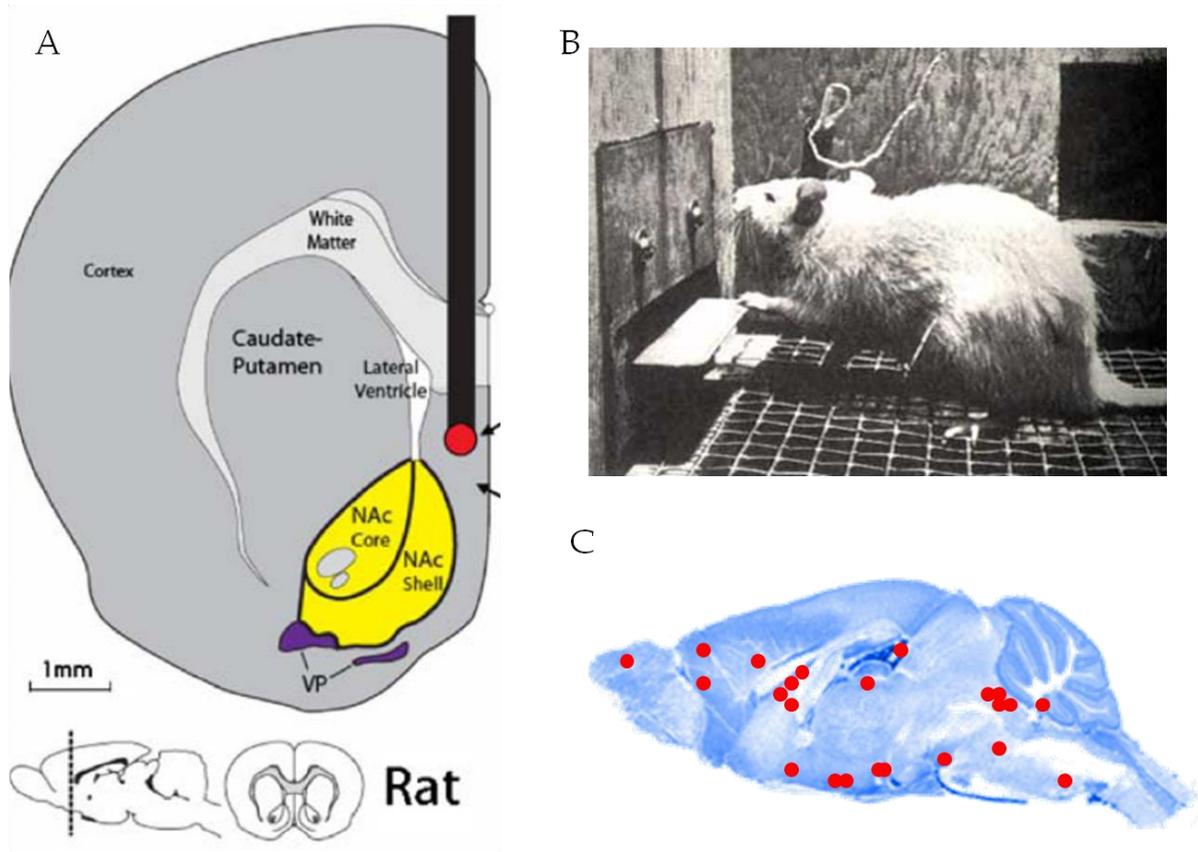


Figure 3: « Brain stimulation reward » ou BSR. (A) Représentation du site de stimulation proche de l'aire septale chez le rat (adaptée de (Kringelbach & Berridge 2008)). (B) Système d'autostimulation d'un rat implanté d'une électrode. (C) Liste non exhaustive des régions dans lesquelles l'effet renforçant de la BSR a été observé (adapté Wise 1996).

L'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence qu'il existait des zones spécifiques dans le traitement des informations hédoniques et motivationnelles ; et il a été possible d'étendre ce réseau à de nombreux autres sites, tels que le pallidum ventral, le faisceau médian du télencéphale, le thalamus ventral, le noyau accumbens (NAcc), et le cortex préfrontal médian (**Figure 3C**). Toutes ces régions ont pour point commun de se trouver sur l'axe d'un faisceau de fibres dopaminergiques partant du mésencéphale et innervant de nombreuses structures sous-corticales et corticales (Olds & Fobes 1981).

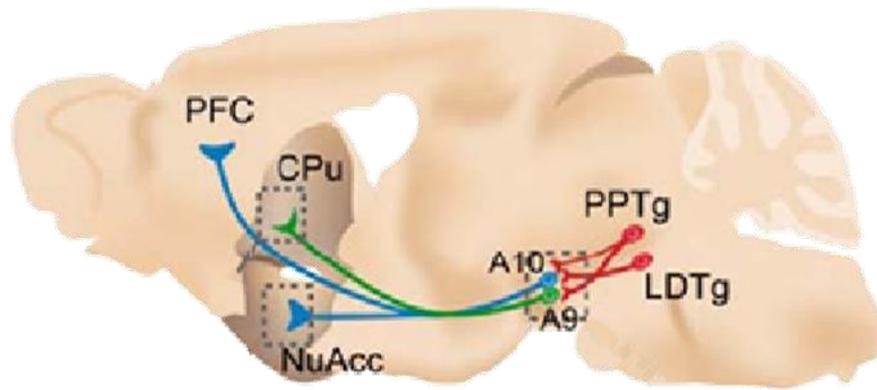


Figure 4: Représentation schématique de la voie dopaminergique et de ces modulateurs cholinergiques (adaptée de Avale et al. 2008).

Ce même circuit a pu être mis en évidence au sein de différentes espèces comme le chien, le chat, le lapin, le singe et l'Homme (Olds & Fobes 1981). Depuis la découverte de la BSR, de nombreuses expériences comportementales de conditionnement ont pu être mises en place et confirmer la valeur renforçante de la BSR. En effet les animaux sont capables de fournir un travail important, d'endurer des chocs électriques, ou encore de courir de plus en plus vite pour obtenir cette stimulation électrique (Wise 1996; Sagara et al. 2010; Burgess et al. 1991; Wise 2002).

Comme nous avons pu le décrire plus haut dans ce paragraphe, la majorité des régions répondant à la BSR sont situées sur un « axe dopaminergique ». Le dosage de la quantité de dopamine présente dans les structures après BSR a pu montrer que la stimulation électrique engendre une libération importante de dopamine, notamment dans le striatum et dans le cortex (Wise 1996; Wise 2002). De plus chez le rat l'auto-administration d'agonistes dopaminergiques au sein des sites activés par la BSR, entraîne une réponse comportementale (nombre d'appuis sur le levier) aussi importante que la BSR (Shizgal 1997). L'ensemble de ces données suggère donc l'existence d'un « système de récompense » soutenu par des afférences dopaminergiques venant du mésencéphale et innervant bon nombre de structures corticales et sous-corticales impliquées dans les processus de récompense et de motivations.

1.2.2. Classement des motivations : rôle de la dopamine.

1.2.2.1. La dopamine

Les neurones produisant la dopamine sont en proportion très minoritaires dans le cerveau, puisqu'ils représentent moins de 1% de la totalité des neurones du cerveau. La dopamine fait partie de la famille des catécholamines, tout comme la noradrénaline et l'adrénaline, et est le produit de la transformation de la **tyrosine**, un acide aminé essentiel. Comme toutes les catécholamines, la dopamine a une structure chimique composée d'un **cycle aromatique** et d'un groupement **éthylamine** (**Figure 5**).

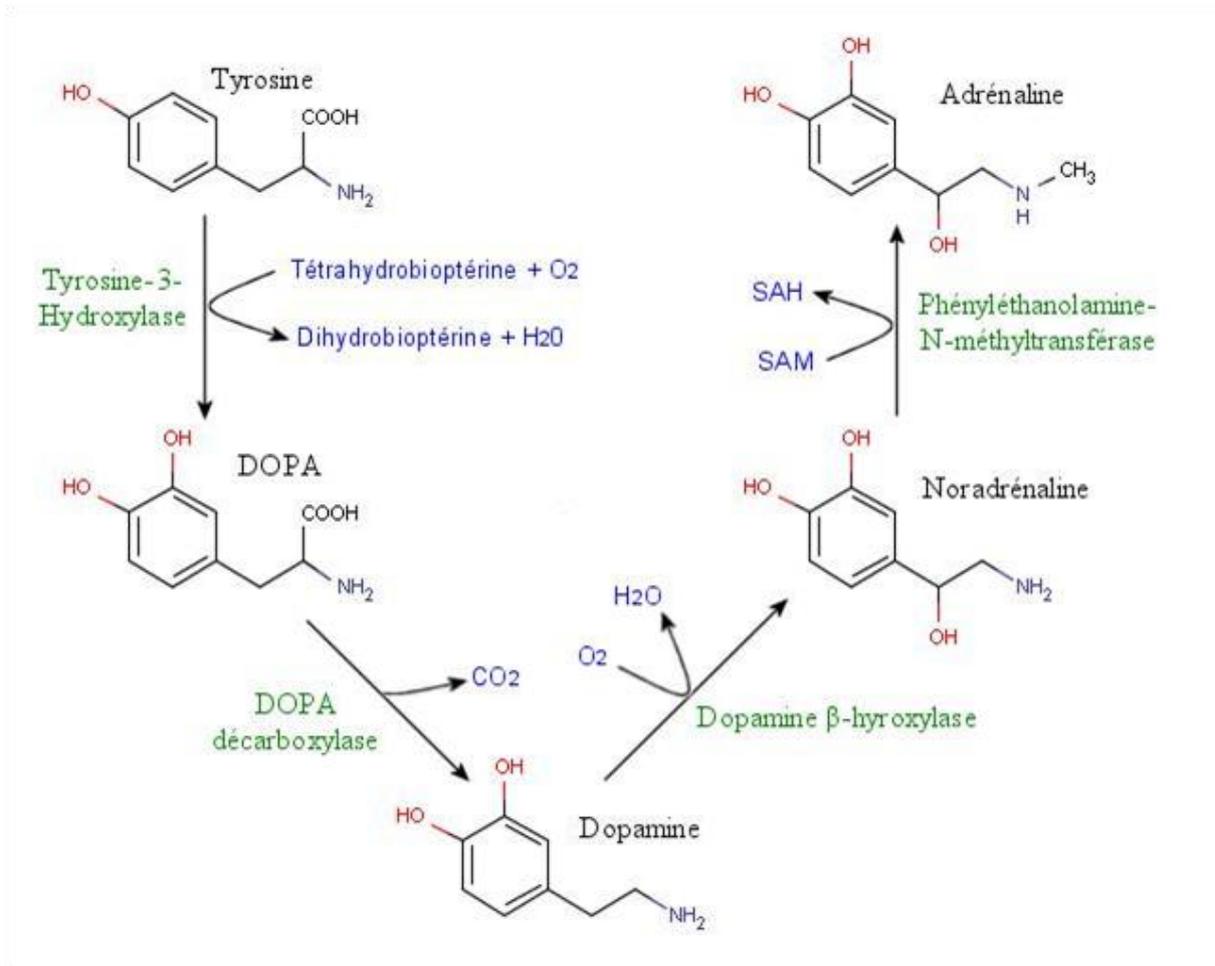


Figure 5: Voie de biosynthèse et structure chimique de la dopamine. La dopamine est composée de deux groupements : un cycle aromatique et un groupement amine, Ethylamine (D'après Wikipedia, source internet).

La voie de biosynthèse de la dopamine est initiée par un acide aminé essentiel : **la tyrosine**. La dopamine représente la première catécholamine de la chaîne de biosynthèse. En effet la tyrosine est d'abord transformée en L-DOPA par la *Tyrosine-3-Hydroxylase* (TH), puis, sous l'action de la *DOPA décarboxylase*, la L-DOPA devient la dopamine (**Figure 5**). Ensuite,

la chaîne de biosynthèse peut continuer ; elle comporte 2 étapes supplémentaires. C'est ainsi que dans les neurones noradrénergiques et adrénérgiques, la dopamine peut être soit hydroxylée par la *Dopamine β -Hydroxylase* pour donner la noradrénaline, puis méthylée pour donner enfin l'adrénaline. Une fois la dopamine synthétisée, elle est transportée dans des vésicules synaptiques grâce à un transporteur spécifique, le VMAT-2 (*vesicular monoamine transporter 2*). Lorsque la dopamine est libérée à la fente synaptique, et si elle ne s'est pas fixée sur les récepteurs dopaminergiques, elle peut être recaptée par un transporteur pré-synaptique, le Dopamine transporter (DAT). Ce transporteur joue un rôle crucial dans le contrôle de l'action de la dopamine en régulant la libération de dopamine à la synapse (Hoffman et al. 1998).

La dégradation de la dopamine dans l'organisme est assurée par deux enzymes principales : la *monoamine oxydase* (MAO) et la *catéchol-O-méthyl-transférase* (COMT). La première est exprimée au niveau de la membrane des mitochondries et permet la transformation de la dopamine en acide 3,4-dihydroxyphenylacétique (DOPAC). La COMT quant à elle dégrade la dopamine en 3-méthoxytyramine (3-MT). Pour finir la MAO et la COMT transforment respectivement le 3-MT et la DOPAC en acide homovanillique (HVA) (**Figure 6**).

1.2.2.2. Les récepteurs à la dopamine

Le rôle et l'action de la dopamine au sein du cerveau sont dépendants du type de récepteurs sur lequel elle se fixe. La dopamine agit principalement comme neurotransmetteur sur des récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires mais elle possède également une action hormonale (dont nous ne parlerons pas ici) qui a pour effet d'inhiber, au niveau de l'hypophyse, la libération de prolactine (Di Chiara & Bassareo 2007).

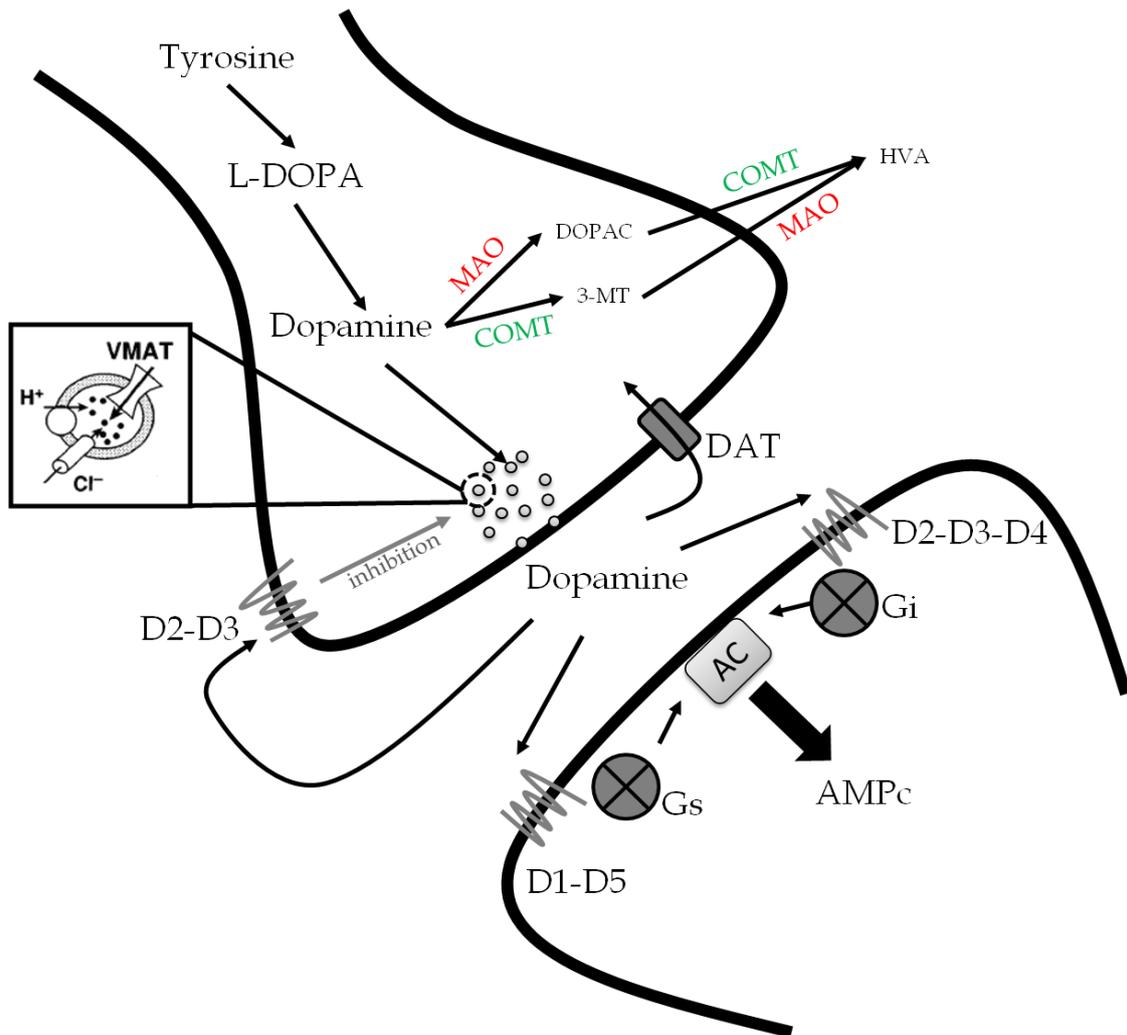


Figure 6: Représentation schématique d'une synapse dopaminergique. La dopamine est une catécholamine issue de la tyrosine et est dégradée par 2 enzymes, la MAO et la COMT. L'internalisation de la dopamine dans les vésicules synaptiques se fait grâce à un transporteur spécifique (VMAT). DAT : Dopamine transporter, AC : Adénylate cyclase, Gi/Gs : Protéine G inhibitrice ou stimulatrice (adapté de Hoffman et al. 1998).

En tant que neurotransmetteur, la dopamine agit sur 5 types de récepteurs, tous couplés à une protéine G (Greengard 2001; Sesack et al. 2003; Di Chiara & Bassareo 2007) : les récepteurs de **types D1-like**, contenant les sous-types D1 et D5 couplés à la protéine G_s . Les récepteurs de **types D2-like**, incluant les sous-types D2, D3 et D4 sont quant à eux couplés à la protéine G_i (**Figure 6**).

La répartition neuronale de ces récepteurs est différente, en effet les récepteurs D1-like sont exclusivement postsynaptiques alors que les récepteurs D2-like sont à la fois post- et présynaptiques (Sesack et al. 2003; Landry & Gies 2009). Une fois le relargage des vésicules

contenant la dopamine effectuée, elle se fixe sur les récepteurs postsynaptiques. La dopamine peut ensuite être très vite recaptée par le transporteur spécifique DAT. De plus la présence d'une multitude de récepteurs présynaptiques périphériques à la synapse empêche la diffusion de la dopamine hors de la synapse de relargage et inhibe la libération supplémentaire de vésicules (**Figure 6**).

Comme décrit précédemment, les récepteurs de la dopamine sont tous couplés à une protéine G au niveau de leur troisième boucle intracellulaire. Les protéines G (aussi bien G_i que G_s) sont des petites protéines constituées de 3 sous-unités (α , β , γ) capables de transformer la GTP (guanosine triphosphate) en GDP (guanosine diphosphate). A l'état inactif, c'est-à-dire quand la dopamine n'est pas fixée sur son récepteur, la protéine G (formée de ses 3 sous-unités) est liée à la GDP. Lors de la fixation de la dopamine sur le récepteur transmembranaire, celui-ci se lie à la protéine G et l'active, entraînant ainsi la fixation du GTP au détriment du GDP sur la sous-unité α . Cette fixation de GTP déclenche une séparation de la protéine G en 2, $G\alpha$ d'un côté et $G\beta\gamma$ de l'autre. Chacun de ces éléments peut agir sur des cibles différentes avant le retour à l'état inactif de la protéine passant par la déphosphorylation du GTP en GDP et le rassemblement du complexe (Neer 1995).

Les récepteurs D1-like sont liés à une protéine G_s c'est-à-dire que l'activité de la sous-unité $G\alpha$ va entraîner une activation de l'adénylate cyclase et ainsi une augmentation de l'AMPc. Cette augmentation d'AMPc entraîne une activation de la phosphokinase A et la phosphorylation d'un grand nombre de facteurs. De la même façon, les récepteurs D1-like peuvent être liés à une autre forme de protéine G (G_q), qui, une fois activée, intervient sur la libération calcique via la production IP3 (inositol triphosphate) et sur la voie de MAP-kinase (Mitogen-Activated Protein).

Les récepteurs D2-like sont quant à eux liés à la protéine $G_i/0$ et inhibent ainsi la production d'AMPc et l'activation de la cascade de phosphorylation sous-jacente. L'action de la sous-unité de la protéine G, $G\beta\gamma$, entraîne également le blocage de l'entrée de calcium dans la cellule (Beckstead et al. 2004).

La fixation de la dopamine sur l'un ou l'autre de ces récepteurs entraîne donc la libération ou non de calcium dans la cellule, et donc son activation ou son inhibition. De plus, le type de neurones sur lequel les récepteurs sont présents (interneurones GABA, cellules pyramidales) conditionne l'effet qu'aura cette fixation sur la chaîne cellulaire associée. Par exemple, si de la dopamine se fixe sur les récepteurs D1-like d'un interneurone

GABA, celui-ci sera activé et inhibera via la sécrétion de GABA tous les neurones auxquels il est connecté.

1.2.2.3. Les voies dopaminergiques

Chez l'Homme et le rongeur il existe à ce jour 17 groupes cellulaires distincts (A1 à A17) contenant des cellules capables de produire la Dopamine (**Figure 7A**). Les groupes A1 à A7 étant des groupes spécialisés dans la production de noradrénaline dont le précurseur est la dopamine (Dahlström & Fuxe 1964; Björklund & Dunnett 2007). Au niveau du mésencéphale, les groupes les plus étudiés restent les groupes A9 et A10 (**Erreur ! Source du envoi introuvable.**).

- La Substance noire *pars compacta* (SNpc) contient des neurones dopaminergiques qui projettent vers le striatum dorsal et forment la voie A9 plus communément appelée **voie nigrostriée**.
- L'aire tegmentale ventrale (ATV) contient le noyau A10 et projette en majorité vers les structures composant le système limbique, notamment le noyau accumbens (NAcc), l'amygdale (BLA), la formation hippocampique (**Figure 7**). Cette voie forme la **voie mésolimbique**. Une petite partie des neurones de la ATV et ceux du champ rétrosubstantiel (groupe A8) projettent vers le cortex préfrontal (CPF), donnant ainsi la **voie mésocorticale**. Bien souvent on parle de la **voie méso-cortico-limbique** en regroupant ces deux faisceaux dopaminergiques, confondant ainsi les groupes A8 et A10 (**Figure 7B**).

Inversement à ces voies très étudiées et décrites (autant sur le plan anatomique que sur le plan électrophysiologique), la localisation et la fonction des autres groupes de cellules dopaminergiques (groupe A11 à A17) restent très peu étudiées et ne feront pas l'objet d'une description précise dans ce manuscrit.

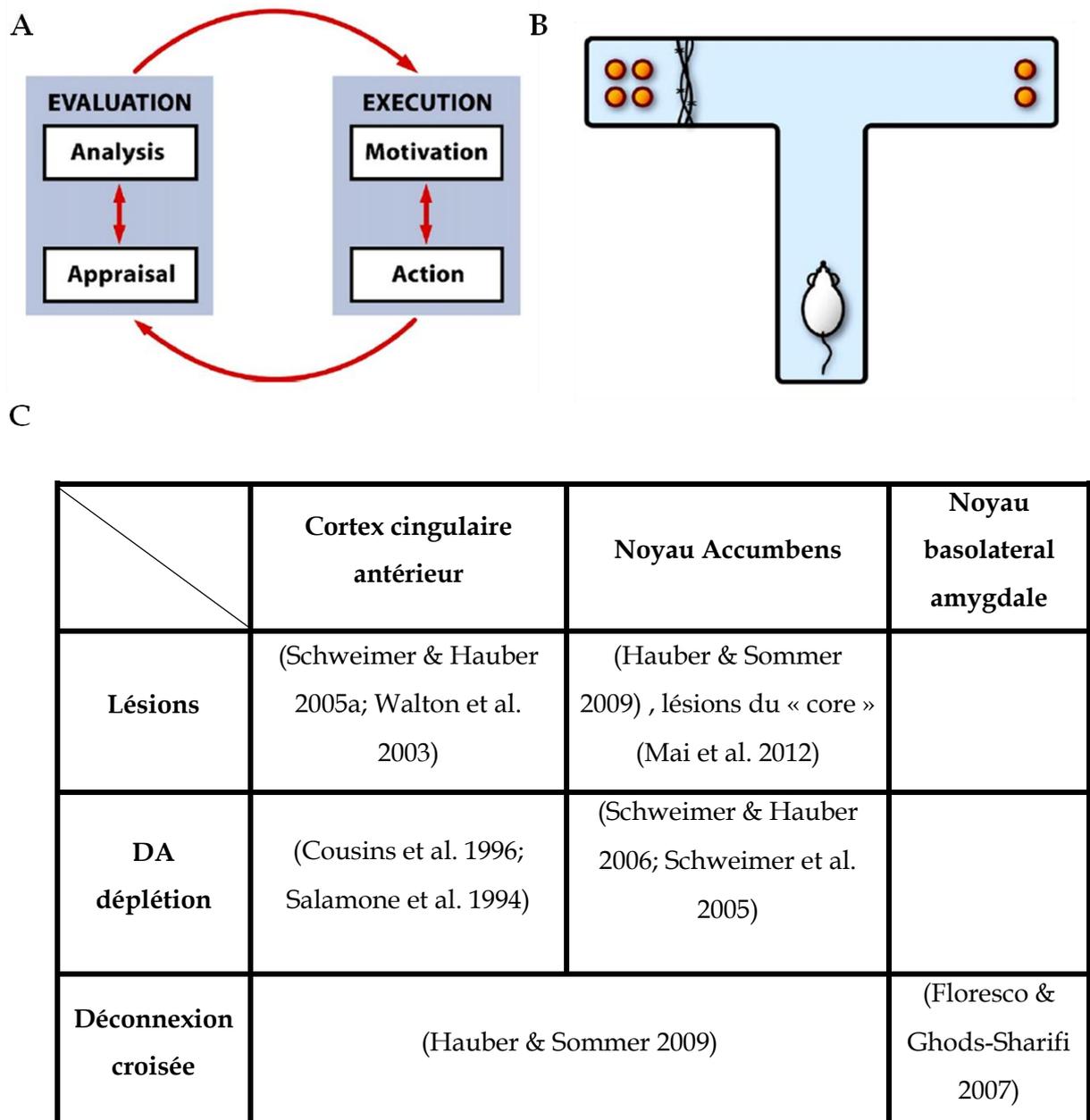


Figure 8: Interaction système dopaminergique et prise de décision. (A) Cycle de prise de décision comportant les processus d'évaluation et d'exécution. (B) Représentation schématique du labyrinthe en T. Les animaux normaux tendent à choisir le bras gauche (le plus grand renforcement, « fort-coût fort-bénéfice ») au dépend du bras droit (plus faible renforcement, « faible-coût-faible-bénéfice »). (C) Tableau non-exhaustif d'études de lésions ou de déplétions dopaminergique entraînant un déplacement du choix de l'animal vers le bras droit. (adapté de Assadi et al. 2009).

A ce stade nous sommes en droit de nous demander si toutes les motivations sont codées de la même façon par ce système dopaminergique. Lorsque nous sommes en face de plusieurs motivations comment faisons-nous pour évaluer la valeur de chacune de ces motivations et nous permettre de prendre la bonne décision ? Vu le nombre de structures innervées par le système dopaminergique et surtout le rôle de ces structures (cortex préfrontal médian, NAcc, BLA...), il est fortement probable qu'elles soit impliquées de façon importante dans les processus de choix entre plusieurs motivations, ou du moins dans le classement entre ces motivations (Hurd et al. 2001). De façon schématique, le processus de prise de décision^I peut être décomposé en 2 processus (**Figure 8A**) : un processus d'**évaluation**, qui fait intervenir l'analyse des **coûts et des bénéfices** des différentes options, ainsi que l'estimation des conséquences ; un processus d'**exécution** où l'individu fait appel à sa motivation pour le choix effectué et mobilise ses ressources pour effectuer la phase d'action et planifier la séquence comportementale pour atteindre l'option voulue (Salamone et al. 1994; Salamone et al. 2003) (Assadi et al. 2009) pour revue).

En 1994, Salamone et ses collègues (Salamone et al. 1994) ont développé un protocole dans le labyrinthe en T. Des rats ont été exposés à 2 types de récompenses alimentaires : la première située dans le bras droit, facile à atteindre (faible coût) mais de petite quantité (faible bénéfice). Pour atteindre la seconde, située dans le bras gauche du labyrinthe, l'animal doit passer par-dessus une barrière (fort coût) mais la quantité de nourriture est plus importante (fort bénéfice). Des rats normaux ont tendance à choisir le bras gauche, c'est-à-dire le bras « **fort-coût-fort-bénéfice** » au dépend du bras opposé (**Figure 8B**). Par la suite, des études de lésions, de déconnexions, ainsi que de déplétion du système dopaminergique au sein de structures spécifiques (NAcc ; cortex cingulaire antérieur, ACC^{II} et BLA) ont montré qu'il était possible d'induire le choix du bras droit au dépend du gauche (**Figure 8C**).

Ce changement de stratégie dans le choix de l'animal à l'issue d'une modification dopaminergique résulterait non pas d'un changement de la valeur hédonique du renforcement mais plutôt d'un déficit d'évaluation de la balance coûts/bénéfices (Rudebeck et al. 2006; Floresco & Magyar 2006; Phillips et al. 2007). Il existe donc un lien étroit et indispensable entre le système dopaminergique et les structures impliquées dans l'évaluation des coûts et de la valeur des motivations.

^I Le processus de prise de décision et ses composants seront abordés plus précisément en section 2.

^{II} Ces structures sont fortement impliquées dans les processus de prise de décision et elles reçoivent également de fortes afférences dopaminergiques. Nous approfondirons le rôle de ces structures dans la section 2.2.1.

De récentes études suggèrent en fait que le système dopaminergique est impliqué de façon bimodale dans la régulation des processus d'évaluation et d'exécution, et ce grâce à l'implication différentielle des deux types de récepteurs dopaminergiques D1-like et D2-like. Le modèle initialement proposé par Seamans et collègues en 2001, rend compte de la complexité des connections qui existent entre la dopamine et les récepteurs présents au niveau cortical. Les auteurs suggèrent qu'il existerait deux états d'activations dépendants du type de récepteurs sollicité. Un « **état D2** », où l'activation préférentielle de récepteurs D2-like conduirait à une réduction du réseau d'inhibition, laissant la possibilité à un bon nombre de signaux entrants d'atteindre le réseau préfrontal. Un « **état D1** », où l'activation prédominante des récepteurs D1-like entraînerait une nette augmentation de l'inhibition, de telle sorte que seuls les signaux les plus prégnants seraient capables de percer (Seamans et al. 2001). De plus, il a été montré que de fortes concentrations en dopamine, de type phasique à la synapse, induisaient plutôt une activation transitoire des récepteurs D2-like, alors qu'une concentration plus faible de type tonique entraînait une activation prolongée des D1-like (J K Seamans et al. 2001; Trantham-Davidson et al. 2004). De plus, l'innervation dopaminergique mésocorticale est principalement regroupée au sein du cortex préfrontal médian (CPFm) chez le rongeur. Cette innervation étant surtout concentrée au niveau des couches profondes à la fois sur les cellules pyramidales et sur les interneurons GABAergiques (Gaspar et al. 1995; Le Moine & Gaspar 1998; Santana et al. 2009). En effet les récepteur de type **D1-like** sont majoritairement exprimés au sein des couches corticales superficielles et profondes tandis que les **D2-like** sont uniquement exprimés dans les couches profondes (couches V et VI). De ce fait l'action de la dopamine au niveau préfrontal (via les récepteurs de la famille **D1-like** exprimés au niveau dendritique) permettrait de stimuler l'activation de certains neurones pyramidaux impliqués dans le processus cognitif en cours (Goldman-Rakic 1996; Goldman-Rakic et al. 2000) tout en diminuant l'activation des neurones pyramidaux adjacents grâce à l'action sur les interneurons GABAergiques (Tseng & O'Donnell 2004). De plus des études montrent que la dopamine peut agir conjointement avec le glutamate sur les récepteurs NMDA, favorisant ainsi une dépolarisation des cellules pyramidales, et l'émission de potentiels d'actions.

Ces hypothèses s'accordent parfaitement au modèle proposé plus haut (**Figure 8A**) : une activation transitoire de « type D2-like » permettant l'évaluation de plusieurs possibilités de choix au niveau préfrontal (nécessaire pour l'estimation des coûts et bénéfices et la prise en compte de situation identique) tandis qu'ensuite, une activation de plus longue durée de

« type D1-like » au niveau préfrontal permet à l'animal de se focaliser uniquement sur le choix établi (Granon et al. 2000).

1.3. Interface motivation, système cholinergique et cortex préfrontal.

Le but ici n'est pas de détailler de façon exhaustive un réseau neuronal mais plutôt de voir quelle est l'importance du système cholinergique dans la modulation du système dopaminergique projetant au CPF (influençant potentiellement de ce fait les aspects motivationnels) et quel rôle peut-il avoir sur les fonctions cognitives complexes impliquant le cortex préfrontal.

1.3.1. Système cholinergique

L'acétylcholine (ACh) est un ester synthétisé par une enzyme, la choline acétyltransferase (CAT) et dégradée par l'Acétylcholinesterase (AChE). Les principaux noyaux cholinergiques sont aux nombres de six (dénommés Ch1 à Ch6), répartis au sein de 2 grandes régions cérébrales et au sein de régions plus localisées (**Figure 9**):

- le **complexe du cerveau basal antérieur** (niveau basal du télencéphale) composé du septum médian (Ch1), des noyaux verticaux et horizontaux de la bande diagonale de Broca (Ch2 et Ch3, respectivement) ainsi que du noyau basal magnocellulaire (Ch4).
- La **région pontomésencéphalique**, composée du noyau tegmental pédonculo-pontin (Ch5) et du noyau tegmental dorsolatéral (Ch6).
- Le **striatum**, où 20% des interneurons striataux sont cholinergiques.
- Il existe également de nombreux noyaux contenant des motoneurons cholinergiques au niveau du tronc cérébral (les nerfs crâniens) (Kimura et al. 1980; Kimura et al. 1981; Kimura et al. 1984)

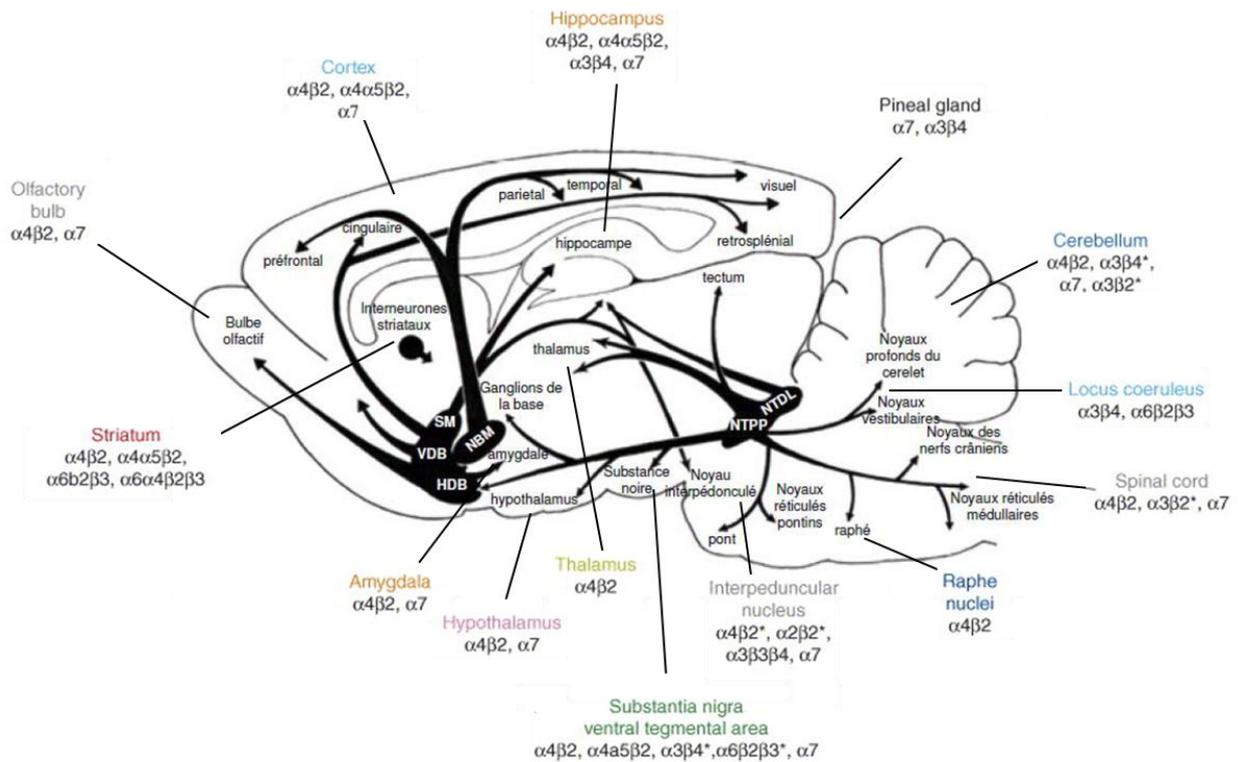


Figure 9: Principales voies cholinergiques chez le rongeur et répartition des récepteurs nicotiniques (nAChRs). Abréviations : SM : septum médian (Ch1); VDB (Ch2) & HDB (Ch3): noyau vertical & horizontal de la bande diagonale de Broca; NBM (Ch4) : noyau basal magnocellulaire ; NTPP (Ch5) : noyau tegmental pédonculo-pontin ; NTDL (Ch6) : noyau tegmental dorsolatéral. (adapté de Mesulam et al. 1983; Millar & Gotti 2009).

Les régions innervées par ces différents groupes de neurones cholinergiques sont multiples. L'hippocampe, les régions corticales ainsi que les bulbes olfactifs sont innervés par le **complexe du cerveau basal antérieur**, tandis que la **région pontomésencéphalique** innerve principalement le thalamus, le cervelet, les régions du tronc cérébral, ainsi que la ATV et la SN_{pc} (Mesulam et al. 1983).

Grâce aux nombreuses projections cholinergiques, l'ACh est donc un neurotransmetteur présent dans la totalité du système nerveux central (SNC) et possède de multiples rôles à la fois au sein du SNC et du système nerveux ortho et para-sympathique. Notamment, l'ACh est impliquée dans les processus de veille et de sommeil, dans le contrôle de l'attention, dans le développement de l'activité corticale et dans de multiples fonctions végétatives comme le contrôle de l'activité musculaire (Kimura et al. 1984; Blaha et al. 1996; Schliebs & Arendt 2006).

1.3.2. Les récepteurs cholinergiques

Au niveau du cerveau, l'ACh se fixe sur 2 types de récepteurs cholinergiques :

Les **récepteurs muscariniques** sont des récepteurs qui font partie des récepteurs métabotropiques à 7 passages transmembranaires couplés à des protéines G (*cf. section 1.2.2.2 sur les récepteurs à la dopamine*). Le type de protéines associées à ces récepteurs définit la famille de récepteurs muscariniques, excitateurs (protéine Gq) ou inhibiteurs (protéine Gi/G0). La première famille est formée par les récepteurs excitateurs M1, M3 et M5. La seconde famille est constituée par les récepteurs inhibiteurs : M2 et M4. Les récepteurs muscariniques sont beaucoup moins bien étudiés que leurs homologues nicotiques. L'engouement pour ces derniers est surtout dû à la forte affinité qu'ont ces récepteurs pour la nicotine, qui est un agoniste à forte affinité.

Les **récepteurs nicotiques (nAChRs)** représentent la deuxième classe de récepteurs à l'ACh. Ceux-ci sont des récepteurs ionotropiques pentamériques perméables aux ions Sodium (Na^+) et Calcium (Ca^{2+}). Les sous-unités de ces récepteurs sont de 5 types : α (10 sous-types : $\alpha 1$ à $\alpha 10$), β (4 sous-types : $\beta 1$ à $\beta 4$), γ , δ , ϵ . Exceptée pour la sous-unité $\alpha 8$ uniquement retrouvée chez les volatiles (Millar & Cecilia Gotti 2009), toutes ces sous-unités sont présentes chez l'Homme ainsi que chez les rongeurs et peuvent former des homopentamères ou hétéropentamères. Ces nAChRs peuvent être soit post-synaptiques, soit pré-synaptiques. Le site de fixation de l'ACh ou de l'agoniste sur ces récepteurs se trouve à l'interface entre deux sous-unité et ces nAChRs ont des propriétés de désensibilisation extrêmement dépendantes de leur composition en sous-unités. Par exemple, chez les mammifères, $\alpha 7$ possèdent une faible affinité à l'ACh et une désensibilisation très rapide, $\alpha 3\beta 4$ un taux de désensibilisation plus faible ainsi qu'une affinité faible, pour finir $\alpha 4\beta 2$ possèdent une bonne affinité et un taux de désensibilisation relativement bas (Le Novère et al. 2002).

Du fait du grand nombre de sous-unités présentes, le nombre de combinaisons et, par conséquent, de récepteurs nAChRs est important, chacun de ces récepteurs possédant des propriétés singulières (Le Novère et al. 2002; Changeux & Edelstein S J 2005). Toutefois deux nAChRs sont très représentés et étudiés au sein du SNC: il s'agit des récepteurs $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2^*$, l'étoile « * » impliquant que ce type de récepteurs peut être associé à d'autres sous-unités notamment $\alpha 5$ ou $\beta 4$ en plus de $\beta 2$ (Millar & Cecilia Gotti 2009; Thomsen et al. 2010) (**Figure 9**).

1.3.3. Rôle modulateur des récepteurs nicotiniques, nAChRs.

Nous avons vu dans la section précédente, que le système dopaminergique est très étendu au sein du SNC et qu'il possède un mécanisme d'action complexe et multiple. Parmi les systèmes modulateurs du système dopaminergique, le système cholinergique joue un rôle relativement important en ayant des liens très étroits à différents niveaux avec ce dernier (Laplante et al. 2004; Lester et al. 2010). L'étroite relation qui existe entre ces deux systèmes est à l'origine même de l'addiction à la nicotine [aspect non développés dans ce manuscrit]. Mais le système cholinergique est également connu pour ses implications au sein de maladies psychiatriques (impliquant des structures préfrontales) telles que la dépression, l'autisme ou encore la schizophrénie (Gotti et al. 2006) mais aussi dans des processus de mémoire, d'attention (Guillem et al. 2011) et dans la maladie d'Alzheimer (Zoli et al. 1999).

A ce jour il est bien connu que les nAChRs jouent un rôle majeur dans la modulation de la libération de neurotransmetteurs dans de nombreuses aires cérébrales (Dos Santos Coura & Granon 2012; Mansvelder et al. 2006; Gotti et al. 2006). En effet les projections du système cholinergique venant des structures du pont cérébral (Noyau tegmental pédonculo-pontin, NTPP et le noyau tegmental dorsolatéral, NTDL) innervent (Woolf & Butcher 1986) et modulent des structures sous-corticales (Klink et al. 2001; Blaha et al. 1996; Blaha et al. 1993; Uwe Maskos 2010). Cette modulation se fait *via* les nAChRs présents sur les corps cellulaires dopaminergiques de la ATV et de la SN_{pc} et modifier la libération de dopamine au sein du NAcc et du striatum. De la même façon il a été montré que certains nAChRs ($\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ principalement) présents sur les terminaisons dopaminergiques au niveau du CPF médian agissent sur la libération de dopamine chez le rat (Livingstone et al. 2009; Livingstone & Wonnacott 2009).

Depuis une quinzaine d'années maintenant des souris qui n'expriment plus la sous-unité $\beta 2$ des nAChRs (Souris Knock-out $\beta 2$: $\beta 2$ KO) ont été générées et ont permis l'étude de l'importance de ces nAChRs au sein de processus cognitifs complexes (Picciotto et al. 1995). L'intérêt premier de l'inactivation de cette sous-unité $\beta 2$ réside dans le fait que cette sous-unité n'est pas remplacée dans les pentamères contrairement à d'autres sous-unités β , c'est de plus la sous-unité qui possède le plus grand taux d'affinité à l'ACh. Ainsi, étant donnée sa large répartition au sein du SNC (Figure 9), la quantité de nAChRs dans le cerveau se trouve très fortement diminuée. Il ne reste quasiment que les récepteurs $\alpha 7$ mais qui eux désensibilisent rapidement.

Ces souris $\beta 2$ KO ont montrées un phénotype très particulier : elles ont notamment des déficits concernant l'addiction comme une diminution de l'auto administration de nicotine (Picciotto et al. 1998), un déficit de discrimination de drogues (Shoaib et al. 2002), des problèmes de nociception (Marubio et al. 1999) ainsi qu'une diminution de l'acuité visuelle (Rossi et al. 2001). Outre des performances spatiales et de contrôle de l'anxiété non affectées (Zoli et al. 1999; Granon et al. 2003), il a été montré que ces souris possèdent de forts déficits de flexibilité comportementale, notamment dans la gestion de conflits, composante essentielle lors d'interactions sociales (Granon et al. 2003; Bourgeron et al. 2006; Granon & Floresco 2009).

2. Prise de décision, flexibilité comportementale et choix de motivation

2.1. Les concepts de prise de décision et flexibilité comportementale

2.1.1. Définitions

Il est difficile de donner une définition exacte de la **prise de décision**. Néanmoins on peut s'accorder sur le fait que la prise de décision est la capacité à sélectionner et renforcer une option particulière parmi d'autres. Cette sélection se fait en fonction de plusieurs éléments internes (état émotionnel, besoins du sujet...) et externes (environnement particulier, contexte...) à l'individu, l'objectif étant de faire le choix le plus favorable pour l'individu à court et plus ou moins long terme. La prise de décision est donc intimement liée à la notion de **flexibilité comportementale**, c'est-à-dire à la capacité d'agir de manière non-rigide et de moduler son comportement face à un environnement changeant. Prendre une décision adaptée nécessite de pouvoir en évaluer les conséquences, et si besoin, d'adapter sa prise de décision à l'environnement dynamique. La plupart des mammifères, tels que les primates (H. F. Clarke et al. 2004; A. C. Roberts 2006), les chiens, les chats (Dorais Pagé & Dumas 2009), les rats (Kim & Ragozzino 2005; Floresco & Magyar 2006) et les souris (Brigman et al. 2006), montrent des capacités de flexibilité comportementale. Un comportement flexible est essentiel à la survie, et faire un choix n'est pas toujours simple car l'environnement est très souvent complexe et dynamique. En effet l'individu doit pouvoir réagir à des conditions environnementales changeantes inattendues, en modifiant son choix et ses priorités d'actions. Pour cela il est nécessaire que l'individu intègre différentes informations sensorielles, contextuelles, et personnelles. Par exemple, il ne réagira pas de la même façon face à un choix similaire qu'il aurait déjà effectué par le passé. Les conséquences de son choix passé ont été mémorisées et le cas échéant l'individu peut tenir compte de ses erreurs et modifier ainsi son action future.

On sait aujourd'hui qu'une myriade de fonctions émotionnelles, motivationnelles, cognitives et de mémoire, chacune associée à différents réseaux neuronaux, sont impliqués dans les processus de prise de décision (**Figure 10**). En plus des processus de motivation développés en première partie, les processus émotionnels sont de plus en plus intégrés dans la prise de décision. En effet, dans le cadre de sa théorie des marqueurs somatiques, A. Damasio avance que les processus affectifs permettent d'orienter inconsciemment et

rapidement les décisions de l'individu vers les options les plus favorables. Cette théorie, longtemps et encore aujourd'hui controversée (Dunn et al. 2006), a trouvé des éléments expérimentaux grâce à l'Iowa Gambling Task^{III}. Par ailleurs, Bechara A. et collègues ont mesuré une forte corrélation entre les réponses électrodermales et les bonnes performances des sujets (Bechara et al. 1996; Bechara et al. 1994). Au cours de la tâche, les sujets présentent une augmentation progressive de leur conductance cutanée *avant* la sélection des choix défavorables (Verdejo-García & Bechara 2009). Pour chaque option du choix, des sensations provenant de la périphérie (viscères, muscles somatiques, milieu interne, squelette) sont générées. Ces sensations sont appelées « marqueurs somatiques », et reflètent notre réponse émotionnelle à ces options. Ainsi, ces marqueurs somatiques modulent la valeur attribuée à chaque option. Plus généralement, l'évaluation affective des conséquences permettrait de guider, de façon inconsciente, un choix, dans des situations complexes. L'évaluation d'options sur de simples critères logiques de coût-bénéfices de l'action est insuffisante dans ce type de situations complexes. L'intégration de l'état émotionnel serait une donnée prise en compte inconsciemment par l'individu pour prendre une décision adaptée. Selon G. Coricelli, les décisions humaines ne peuvent pas uniquement reposer sur des choix rationnels, mais sont également fortement influencées par les émotions (Coricelli et al. 2007). On note ainsi l'influence de différents facteurs émotionnels dans la prise de décision, comme le stress (Preston et al. 2007), ou le regret (Camille et al. 2004; Coricelli et al. 2007).

De même qu'il existe une multitude de processus impliqués, il existe plusieurs formes de flexibilité^{IV}: l'habituation à la nouveauté (la diminution d'une réponse comportementale avec le temps); l'extinction (l'arrêt progressif de réponse lorsqu'un stimulus cesse de conduire à la récompense); le changement de règles ou de stratégies; et l'interaction sociale avec un nouvel individu (Granon & Floresco 2009). Chacune de ces types de flexibilités faisant intervenir de façon plus prégnante l'une ou l'autre des composantes qui gravitent autour de la notion centrale de comportement flexible. Ainsi, lorsque les comportements liés à l'une de ces composantes sont altérés (i.e. troubles de l'addiction, problèmes attentionnels, déficits de mémoire, non perception des indices environnementaux, etc...), l'individu peut être moins flexible et ainsi être amené à prendre de « mauvaises décisions », c'est-à-dire des décisions néfastes pour lui-même ou son entourage.

^{III} Cette tâche sera expliquée en détail dans la section 2.1.5.1 Mesures expérimentales chez l'Homme.

^{IV} Nous détaillerons plus précisément ces aspects en section 2.1.4 Mesures expérimentales.

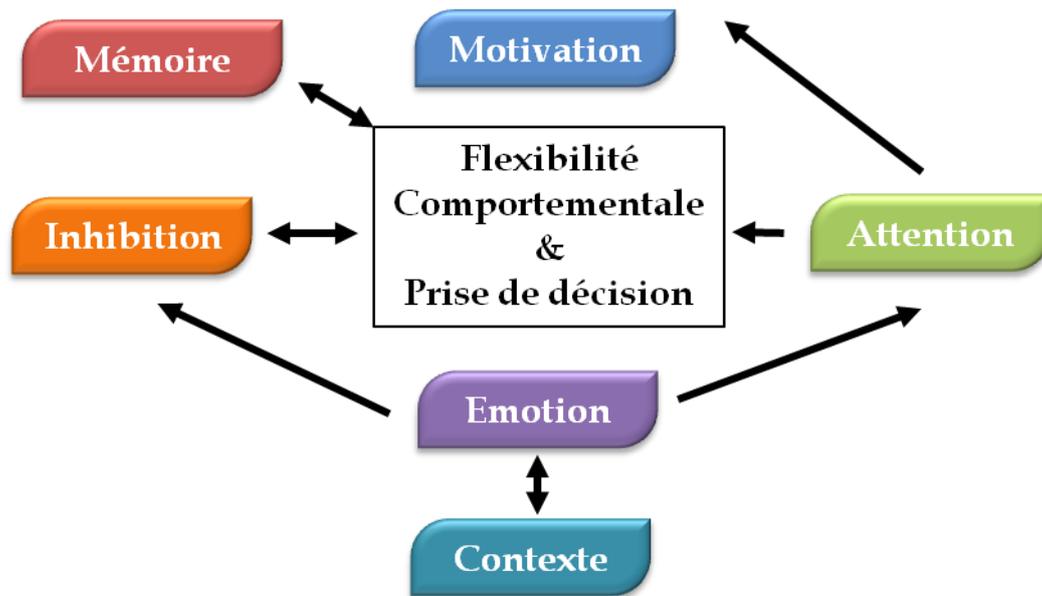


Figure 10: Représentation des processus fondamentaux autour de la notion de flexibilité comportementale. Les notions de mémoire, d'inhibition comportementale, d'émotion, d'attention, de motivation, et d'influence contextuelle sont liées aux processus de prise de décision.

2.1.2. Les différentes étapes du processus

Récemment, les neuroéconomistes ont développé la théorie suivante : la prise de décision ne serait pas un processus cognitif unique mais serait décomposé en plusieurs sous-processus agissant en synergie pour que l'individu prenne la décision optimale. La prise de décision serait donc un processus complexe nécessitant la mise en place d'une chronologie d'événements avec des boucles de rétrocontrôles qui permettraient de moduler certains paramètres (**Figure 11**), et donc de pouvoir réagir en temps réel (Doya 2008; Rangel et al. 2008).

La première étape de la prise de décision serait tout d'abord, **l'identification des options**. Cette étape implique l'identification et la représentation des différentes options parmi lesquelles l'individu devra choisir. L'identification des options prend en compte l'évaluation de l'état interne de l'individu (besoin, état de satiété, état physique) et des informations externes (informations contextuelles). Par exemple, lorsque la femelle guépard doit chasser, avant de lancer son attaque elle identifie son état de satiété et le nombre de petits qu'elle doit nourrir ce qui déterminera la taille et le poids de la gazelle qu'elle attaquera. Ensuite, elle doit également prendre en compte les informations

environnementales (terrain accidenté, distance du troupeau, présence d'autres prédateurs) afin d'identifier l'ensemble des possibilités qui s'offrent à elle.

Viendrait ensuite la seconde étape, **l'évaluation des options**. Durant cette étape l'individu va attribuer une valeur motivationnelle, **valeur espérée**, aux différentes options possibles. Cette attribution dépend de deux types de facteurs : les facteurs associés aux conséquences de l'action à venir, les **facteurs espérés** : l'incertitude (probabilité d'obtention), le risque, le délai ainsi que la valence (positive/ négative) et la saillance (intensité/magnitude) sont déterminants pour la valeur attribuée à chaque choix. En effet l'incertitude sur la connaissance de son environnement lors d'une prise de décision est une donnée importante. L'individu qui est face à un environnement qui change de façon inattendue, ou qui a une mauvaise connaissance de celui-ci, sera poussé à explorer son milieu et à mémoriser les nouvelles données de façon à réduire cette incertitude (Doya 2008). De très nombreux choix sont réalisés en situation d'incertitude dans la vie quotidienne, et il a été montré chez l'homme une forte aversion pour les situations de choix incertaines (Wang et al. 2012; Rode et al. 1999). Ces données renforcent l'idée que la prise en compte de l'incertitude pèse énormément dans la balance d'évaluation des choix. Ensuite, toute décision comporte un degré de risque dépendant d'une certaine probabilité liant l'action et ses conséquences. Aujourd'hui il existe deux théories dominantes pour expliquer l'influence du risque sur l'évaluation des options : « *Expected utility* » (l'utilité espérée) et « *prospect theory* » (théorie des perspectives). La théorie de « l'utilité espérée » postule que la valeur des perspectives est égale à la somme des valeurs des différents résultats pondérés par leurs probabilités. La théorie des perspectives avance quant à elle, que les valeurs des résultats dépendent maintenant d'un point de référence, r , et sont pondérés par une fonction non linéaire de probabilités objectives (Rangel et al. 2008). En plus de l'incertitude et du risque inhérent à toute situation de choix, s'ajoute le délai. C'est le laps de temps entre le déclenchement de l'action et les conséquences de l'action. Plus le délai augmente et plus la valeur d'une option est diminuée. Par exemple un gain d'argent immédiat est plus désirable que la promesse d'un versement dans 1 an (Doya 2008; Daw & Doya 2006). Des données d'imagerie cérébrale (IRMf) ont permis de montrer que pour l'ensemble de ces facteurs (incertitude, risque et délai), des circuits fronto-striataux étaient impliqués^v (Tanaka et al. 2004; McClure et al. 2004; Huettel et al. 2006; Hsu et al. 2005).

^v Voir implications des structures frontales dans la **section 2.2.1.3**.

Le deuxième type de facteur influençant l'évaluation des options est dépendant de ce que l'individu connaît déjà, c'est à dire les **facteurs réels** : état émotionnel, motivationnel (désirs et besoins) de l'individu, la sensibilité de l'individu aux différents facteurs espérés, le coût énergétique de l'action à réaliser.

La troisième étape est l'étape de **sélection d'une option et action**. Cette étape consiste à exprimer une préférence parmi toutes les options identifiées. Le but est la sélection de l'option, l'initiation, et l'exécution de l'action la plus adaptée au contexte et à l'état interne de l'individu en fonction des préférences établies à l'étape précédente. Cognitivement cette phase nécessite l'inhibition et/ou le désengagement d'actions en cours, la mise en place et le maintien de la séquence d'action ainsi que la correction d'erreurs et la planification temporelle de l'action. Cette étape engage des systèmes neuronaux impliqués dans l'initiation, le contrôle et l'achèvement de l'action, tels que le cingulaire antérieur et le CPF latéral (Ernst & M. P. Paulus 2005). Du fait des nombreux processus complexes impliqués, un certain nombre d'anormalités telles qu'une action prématurément initiée (impulsivité), une action incomplète (fragmentation), une action insuffisamment motivée ou décalée (retard psychomoteur), peuvent apparaître.

Enfin, la dernière étape, **l'évaluation des conséquences**, est une étape de comparaison entre la **valeur espérée** et la **valeur réelle** de l'action entreprise. L'individu évalue la différence entre ces deux valeurs et cette différence constitue un signal rétroactif (en anglais : *feedback*) qui sera intégré dans un processus d'apprentissage et de mémoire (Schultz 2002; Schultz 2012). Ce processus d'apprentissage permettra, en influençant l'étape d'évaluation des choix, d'optimiser les décisions futures lorsqu'une situation similaire se représentera.

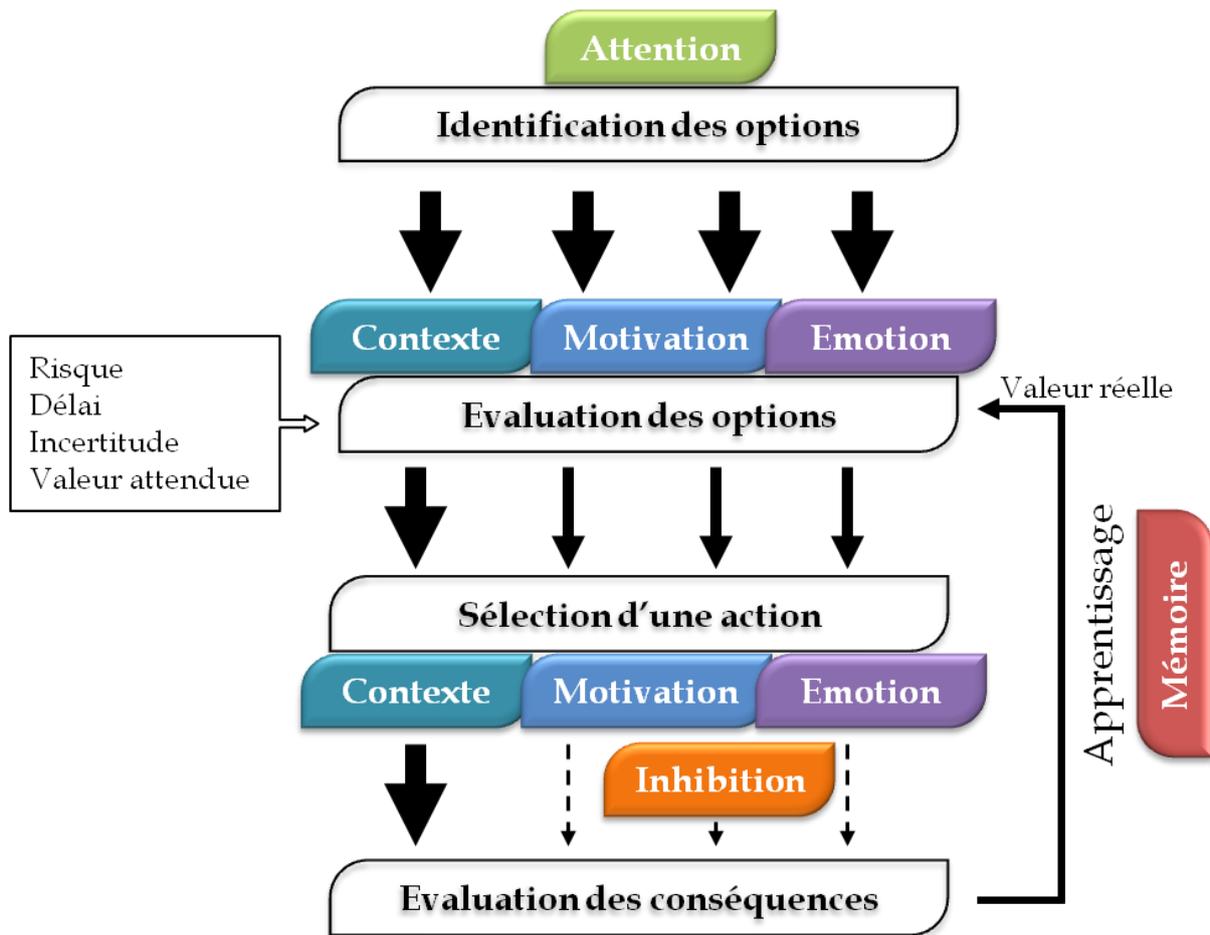


Figure 11: Différentes étapes des processus de prise de décision. Lors de l'étape d'évaluation des options, plusieurs facteurs relatifs à chaque option sont pris en compte : le risque, le délai, l'incertitude, la valeur attendue. Cette dernière sera comparée à la valeur réelle de l'option choisie (Schéma original).

2.1.3. *Evolution des études sur la prise de décision*

Quand on voit le nombre de processus impliqués dans la prise de décision, on imagine le nombre important de dysfonctionnements exécutifs ou neurobiologiques à l'origine d'une prise de décision inadaptée. En effet le déficit de flexibilité comportementale est une caractéristique commune à de nombreuses pathologies psychiatriques et de neuropathologies^{VI} telles que les troubles de l'addiction (Volkow & Fowler 2000; Schoenbaum et al. 2006), la schizophrénie (Callicott et al. 2003; Ernst & Paulus 2005), l'autisme (Jamain et al. 2008; Chevallier et al. 2012), le jeu pathologique (Dreher 2007; Linnet et al. 2006; P Cavedini, Riboldi, Keller, et al. 2002), le trouble d'hyperactivité avec déficit attentionnel (ADHD) (Ernst et al. 2003), ou encore les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou de Huntington (Poletti et al. 2011; Labudda et al. 2010; Gleichgerrcht et al. 2010). L'étude de la prise de décision est en plein essor actuellement, et la raison majeure concerne les enjeux de santé publique ; en effet les pathologies psychiatriques et neurodégénératives ayant pour symptôme des déficits de prise de décision sont nombreuses et on imagine aisément l'impact de décisions inadaptées sur la vie de millions de personnes touchées par ces pathologies. Ainsi, le nombre de champs de recherche sur la prise de décision n'a cessé d'augmenter depuis les 50 dernières années. Aujourd'hui psychologues, économistes, neuroéconomistes, roboticiens, neurologues, neuropsychiatres, psychiatres, neuroscientifiques, et comportementalistes se côtoient dans l'étude de la prise de décision et dans la compréhension des mécanismes de prise de décision chez l'Homme et chez l'animal (**Figure 12**). Grâce à l'observation des comportements de l'individu dans le milieu naturel, ils ont fait émerger les grands principes cognitifs et neurobiologiques de ces comportements. De plus, très tôt, l'observation et l'utilisation de patients cérébrolésés a permis de définir l'implication de certaines aires cérébrales dans ces processus (Damasio 1994). S'en ai suivit les progrès de l'imagerie cérébrale fonctionnelle (IRMf) ainsi que des tests comportementaux, à la fois chez l'homme et chez l'animal, qui ont permis de déterminer les bases neurobiologiques des différents aspects de la prise de décision.

^{VI} Nous reviendrons plus en détails sur les différentes pathologies liées aux troubles de la prise de décision.

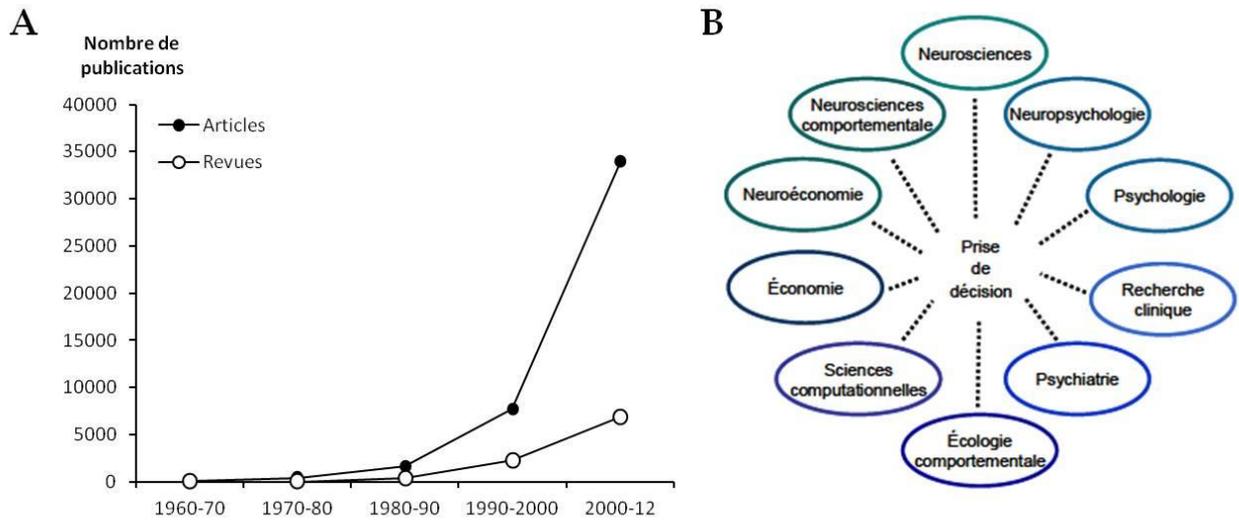


Figure 12: Evolution du nombre de publications et disciplines consacrées à la prise de décision. (A) Augmentation exponentielle du nombre de publication, articles ou revues, consacrées à l'étude de la prise de décision par tranche de 10 ans, de 1960 à aujourd'hui. (Source Pubmed) (B) Représentation des différentes disciplines qui s'intéressent aux processus de prise de décision (M. Rivalan 2009).

2.1.4. Mesures expérimentales

« L'impact de la flexibilité lors de processus de prise de décision est maximum lorsque l'environnement (interne ou externe) change, quand les stimuli appropriés sont inattendus (dans le temps ou l'espace), quand la règle couramment utilisée est modifiée, quand l'acte moteur n'est plus valide et lorsque le sujet doit choisir entre différentes types/sources/valeurs de récompenses. Par conséquent, on peut cibler différents types de tâches comportementales qui permettront de mesurer les comportements flexibles »

(Granon & Floresco 2009).

Historiquement les mécanismes à la base des processus de prise de décision ont été beaucoup plus étudiés chez l'homme que chez l'animal. Ces études se sont faites par le biais d'études neuropsychologiques couplées à des analyses d'imagerie cérébrale en constante évolution, et qui permettent ainsi d'identifier les acteurs structurels impliqués dans ces processus. Néanmoins, très récemment, des tâches développées chez l'Homme, ont été adaptées à l'animal et ont permis d'étudier et d'approfondir les connaissances mécanistiques sur la prise de décision. Je ne vais pas faire un catalogue détaillé des différentes tâches utilisées, mais me focaliser sur les tâches les plus utilisées (dans notre laboratoire et d'autres,

et à la fois chez l'homme et chez l'animal) en abordant à chaque fois les avantages et inconvénients de chaque test. Ceci permettra de comprendre pourquoi les scientifiques continuent de développer des tests expérimentaux pour étudier ces processus, tant les mécanismes sont nombreux et diffus et les tests incomplets pour la plupart.

2.1.4.1. Mesures expérimentales chez l'Homme

a. L'Iowa Gambling Task

Il existe chez l'homme plusieurs protocoles expérimentaux permettant l'étude de processus de prise de décision. Le plus connu d'entre eux est l'*Iowa Gambling Task* (IGT).

L'IGT a, au départ, été développé par Antoine Bechara à l'université de médecine d'Iowa, lors de l'étude des déficits de prise de décision en situation complexe chez des patients cérébrolésés (Bechara et al. 1994; Bechara et al. 1996). L'IGT permet d'étudier les processus de choix en situation complexe, conflictuelle, et incertaine où les conséquences des choix ne sont pas connues à l'avance. Le principe de ce test est relativement simple : le sujet part avec une cagnotte de 2000\$ au début du test avec le but de maximiser ses gains en choisissant successivement une carte parmi 4 tas de cartes disponibles (tas A, B, C, D). Chaque tas est associé à un gain de montant fixe suivi, selon une probabilité donnée, d'une perte d'argent. L'association gains/pertes est faite de telle sorte que les tas A et B soient défavorables (**Figure 13A**); le sujet gagne 100\$ mais les montants qu'il peut perdre sont plus importants (de 150 à 1250\$). Alors que les tas C et D sont plutôt favorables ; le sujet gagne peu (50\$) mais les pertes qu'il peut subir sont moins importantes (de 25 à 250\$ maximum). Les patients ne connaissent pas la répartition des cartes dans les différents tas, ni la valeur des gains ou des pertes qu'ils peuvent engendrer, ni même le nombre d'essais auxquels ils ont droit (100 au maximum dans la version de Bechara).

La bonne stratégie à long terme consistant à ne choisir que les tas à faibles renforcements (tas C et D) et ainsi à maximiser ses chances de gains à la fin de l'expérience. Les patients cérébrolésés montrent une rigidité comportementale dans le choix de la stratégie adoptée ; ils sont incapables de changer de stratégie (opter pour les tas les moins rémunérant) même s'ils sont conscients qu'ils perdent beaucoup d'argent (Bechara et al. 1994; Bechara et al. 1996)

Du fait qu'il permet une détection fine des troubles de la prise de décision, ce test est beaucoup utilisé à la fois en recherche clinique mais également comme outil de diagnostic. En effet, il est utilisé pour détecter certaines psychopathologies, comme les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), les troubles d'addiction ou les troubles alimentaires (Bechara & Damasio 2002; Bechara et al. 2002; Cavedini, Riboldi, Keller, et al. 2002; Cavedini et al. 2004; Cavedini, Riboldi, D'Annuncci, et al. 2002). L'IGT possède une vraie validité écologique du fait de la complexité de la situation dans laquelle le sujet est mis (proche d'une situation de choix réel). A contrario, l'inconvénient majeur de L'IGT est le fait que c'est un test uniquement probabiliste à motivation uniquement monétaire. Le sujet pari sur une action et sur ses conséquences en fonction de probabilités non-connues. Ce test oublie d'aborder un aspect très important dans la flexibilité comportementale : le choix et le fait de basculer entre plusieurs motivations (motivation monétaire, sexuelle, alimentaire, par exemple). De plus, il n'y a aucun changement de règle.

b. Le Wisconsin Card Sorting Test.

C'est à partir de travaux montrant que certains dommages cérébraux entraînaient des difficultés à classer des stimuli par rapport à des caractéristiques telles que la forme et la couleur, que Grant et Berg (Grant & Berg 1948) ont mis au point le Wisconsin Card Sorting test (WCST). Lors de ce test, le sujet a devant lui 4 types de cartes qui diffèrent par la forme, le nombre et la couleur des motifs qui y sont apposés (**Figure 13B**). Le sujet dispose d'un tas de carte du même genre. L'épreuve consiste à classer les cartes selon différentes caractéristiques : la couleur, la forme ou le nombre de motifs. Les consignes sont simples : *« Vous devez placer, une à une, chaque carte de votre paquet en dessous de l'une ou l'autre de ces 4 cartes. Je ne peux pas vous dire comment placer les cartes mais je vous dirais à chaque fois si votre réponse est correcte ou non. Si c'est faux, essayez simplement de placer correctement la carte suivante. Il n'y a pas de limite de temps. Etes-vous prêt ? On y va ».*

L'examineur commence alors par appliquer la règle des couleurs, obligeant le sujet à classer les cartes en fonction de leur couleur. Au bout de 10 placements correctement réalisés, la règle change (i.e. application de la règle du nombre) et le sujet doit découvrir par lui-même le changement de règle par essais-erreurs successifs. Il doit ainsi adapter son comportement de façon à continuer de classer les cartes correctement. On observe alors dans quelle mesure le sujet continue d'organiser les cartes selon l'ancienne règle (réponses persévératives), reflet d'un déficit de flexibilité lié à la non-mise à jour de la nouvelle règle de classement.

Ce test possède une dimension que l'IGT n'a pas : la dimension de changement de règle qui permet de mettre à nu tout déficit de persévérance lié à une mauvaise flexibilité comportementale. Mais il ne met pas en évidence cet aspect « projection », planification de la meilleure stratégie à long terme, ni même l'aspect « pari », c'est-à-dire prise de risque, comme le fait l'IGT.

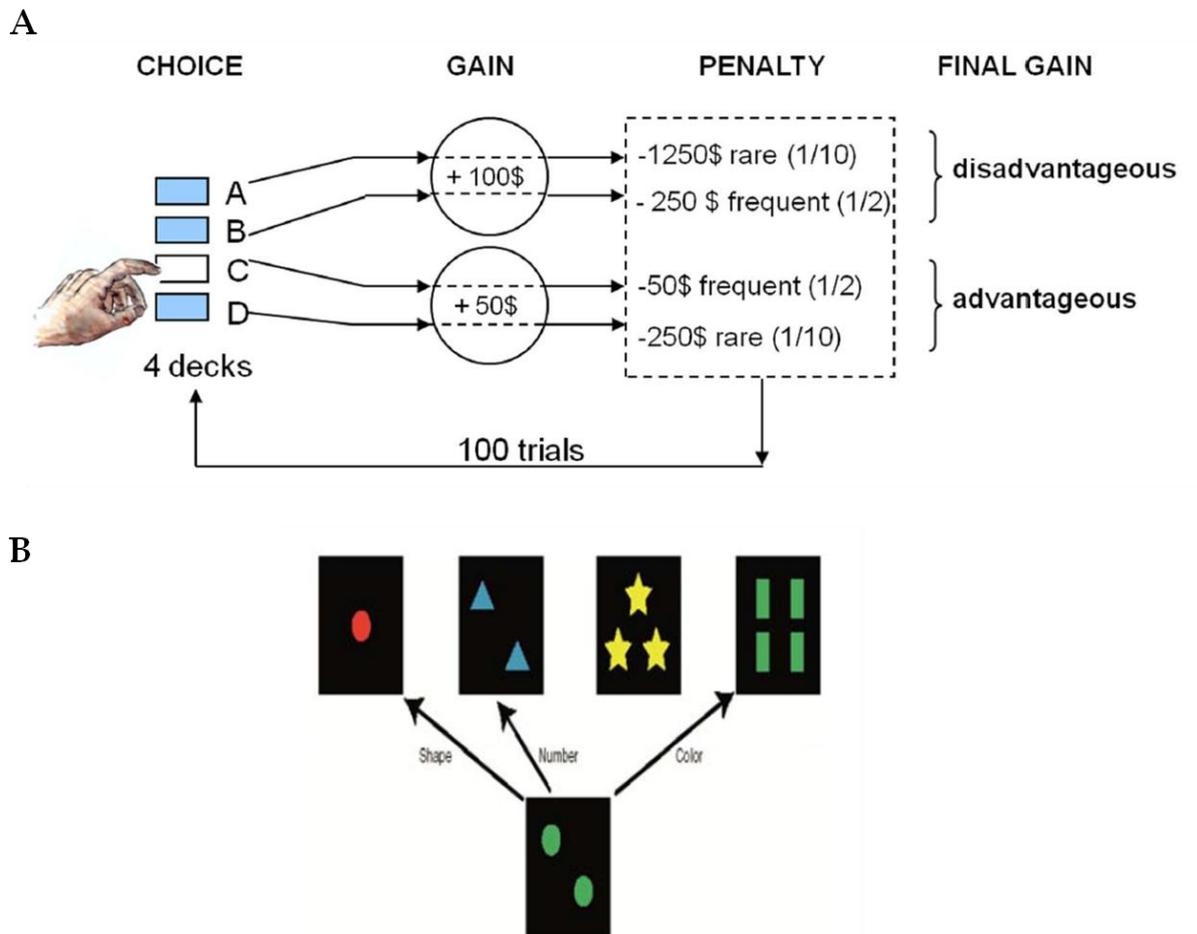


Figure 13: (A) Principe de l'Iowa Gambling Task (IGT) et (B) du Wisconsin Card Sorting Task (WCST) utilisé chez l'homme. (A) Les choix A et B entraînent des gains importants associés à de fortes pertes, tandis que les paquets C et D entraînent des gains et des pertes plus faibles. (B) Durant le WCST, le sujet peut classer les cartes selon plusieurs correspondances, la forme, le nombre ou la couleur (adapté de Rivalan et al. 2011; Grant & Berg 1948).

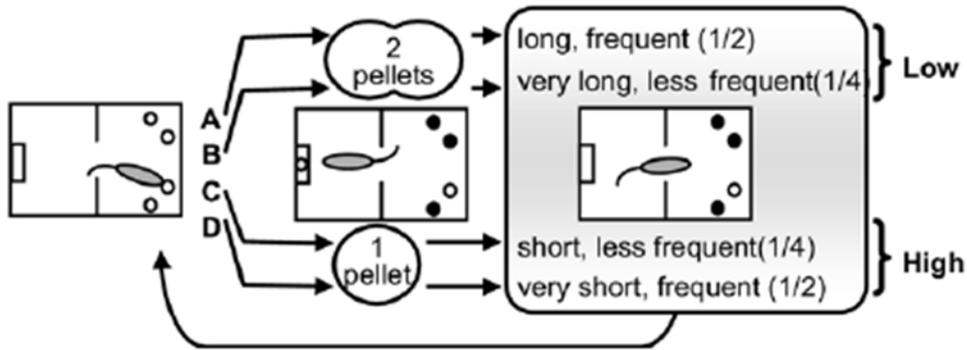
2.1.4.2. Mesures expérimentales chez l'animal

a. Rodent Gambling Task (RGT) adapté de l'IGT.

Récemment des versions de l'IGT ont pu être adaptées à l'animal de laboratoire (Rivalan et al. 2009; Rivalan et al. 2011; Zeeb et al. 2009; van den Bos et al. 2006; Young et al. 2011). Le principe reste le même, l'animal doit choisir entre 4 options, le gain est remplacé par de la nourriture appétitive (pastilles de nourriture) et pour modéliser les gains importants et plus faibles, on fait varier la quantité de ces pastilles (**Figure 14A**). Dans cette version adaptée, comme dans l'IGT chez l'homme, chacun des gains de nourriture est associé à une probabilité qui peut entraîner une conséquence négative. Elle est modélisée soit par des pastilles de nourriture aversives de quinine (van den Bos et al. 2006), soit par un « temps mort » (délai) durant lequel l'animal ne peut plus effectuer de choix (Zeeb et al. 2009; Zeeb & Winstanley 2011; Rivalan et al. 2009; Rivalan et al. 2011). Les variations entre auteurs sont multiples et on peut ainsi faire varier la quantité de nourriture obtenue par une action, la probabilité de délivrance des punitions et leur intensité ce qui, comme chez l'humain, provoque un conflit entre l'obtention d'une grande quantité de nourriture immédiate et des gains moins importants sur l'ensemble du test.

Comme la tâche d'IGT chez l'humain, le RGT permet d'étudier le contrôle de la prise de décision dans une situation complexe et risquée, car l'animal n'a pas connaissance des probabilités associées aux différentes actions. L'utilisation du RGT permet, grâce à l'utilisation de modèles animaux de stress ou d'addiction aux drogues, l'étude de psychopathologies et l'influence de facteurs génétiques. La validité écologique du RGT est liée au fait que les comportements et les processus sous-jacents à l'exécution de cette tâche semblent similaires entre l'homme et le rat (Rivalan et al. 2009; Rivalan et al. 2011).

A



B

Task features	IGT	RGT _{reward or quinine}	RGT _{reward probabilities}	RGT _{one session reward and time-out}	RGT _{reward or time-out}
Original references	Bechara et al. (1994)	van den Bos et al. (2006)	Pais-Vieira et al. (2007)	Rivalan et al. (2009)	Zeeb et al. (2009)
Apparatus	Computerized card game	Manually operated maze	Manually/automated arena	Automated operant chamber	Automated operant chamber
No. of choice options	4	4	2	4	4
Reward	Monetary gain	Sucrose pellets	Sucrose pellets	Palatable food pellets	Sucrose pellets
Reward occurrence	Each trial	Alternate with punishment	Alternate with punishment	Each trial	Alternate with punishment
Punishment	Monetary loss	Quinine pellets	No reward	Time-outs	Time-outs
Conflict immediate rewards	100 (A and B) vs. 50 (C and D)	3 (A) vs. 1 (B)	3 (A) vs. 1 (B)	2 (A and B) vs. 1 (C and D)	3:4 (A and B) vs. 1:2 (C and D)
Conflict long-term payoff	Per 10 cards -250 vs. +250	Per 10 trials 3 vs. 8 pellets ratio = 2.7	Per 10 trials 9 vs. 8 pellets ratio = 0.9	Total test: 60 vs. 300 pellets ratio = 5	Total test: 353 vs. 117 (average) ratio = 3
Task duration	Single session (100 trials)	10 daily sessions (10-20 trials)	Single session	Single session (1 h)	25 daily sessions for stability (approximately 100 trials per 30 min session)
Pre-training procedure	None	10-min habituation	20-25 days	5-7 days	10-15 days incl. 7 forced-choice sessions
Prior knowledge of contingencies	No	No	No	No	Yes
Motivational aspects	n/a	90-95% of FFW	80% of FFW	95% of FFW	85% of FFW

Values for the conflict long-term payoff are hypothetical calculations for RGT_{one session reward and time-out} and RGT_{reward and time-out} (based on a fixed trial duration of 9 or 5s, respectively). FFW, free-feeding weight.

Figure 14: Adaptation de l'IGT aux modèles rongeurs (RGT) et nombreuses variations. (A) Principe du RGT : comme chez l'homme le choix des trous A et B entraîne une plus grande récompense immédiate mais des pénalités plus longues, tandis que le choix des trous C et D est plus favorable à long terme pour l'animal. **(B)** Comparaison des différentes mises au point de Gambling chez l'animal et la tâche initiale d'IGT. (adapté de Rivalan et al. 2011; de Visser et al. 2011).

De plus la RGT intègre également la complexité de la situation de choix, proche d'une condition de choix réelle. En effet les conditions du RGT sont aussi très similaires aux conditions de prise de décisions complexes auxquelles les rongeurs peuvent être confrontés dans leur environnement naturel. Seulement, comme chez l'humain, le RGT reste une tâche qui n'étudie que certains aspects de la prise de décision (pari sur le futur et prise de risque) sans changement de règles. De plus, il existe de nombreuses études parallèles consacrées à l'élaboration d'un protocole d'IGT chez l'animal de laboratoire (**Figure 14B**). Il reste encore à valider l'utilisation de ces modèles dans l'investigation des facteurs et mécanismes impliqués dans les déficits de prise de décision chez l'animal.

- b. WSCT, Reversal, autres tâches de flexibilité (changement de stratégie, habituation...etc.)

La flexibilité comportementale et la prise de décision peuvent être mesurées de différentes façons chez l'animal. En effet, il existe des tâches comportementales qui impliquent d'autres aspects de la flexibilité comportementale, notamment lors d'interaction avec un environnement changeant. Il est connu que cette même flexibilité prend tout son sens lorsque l'environnement, interne ou externe à l'individu, change. Avec l'IGT et son application chez le rongeur (RGT), nous venons de voir les aspects de changements internes à l'individu. Mais il existe de nombreux tests comportementaux faisant intervenir des processus de flexibilité. Comme chez l'humain, il existe chez le rongeur des tâches similaires au WCST qui impliquent un changement de règle, auquel l'animal doit s'adapter en faisant preuve de flexibilité ; la plus connue est le *Reversal learning*. Cette tâche met en jeu des formes complexes de flexibilité où un organisme doit cesser de répondre à un stimulus auparavant important, et concentrer ses réponses sur un stimulus précédemment futile. Ce type de tâche est bien souvent utilisé lors d'associations stimulus-récompense, où l'animal est entraîné à discriminer cette association. Lorsqu'il y parvient, la règle change et le stimulus n'est dorénavant plus lié à la récompense. Chez le rongeur, ce type de comportement flexible peut être observé lors de tâches de conditionnement opérant (Schoenbaum et al. 2000) ou dans la piscine de Morris (Delatour & Gisquet-Verrier 2000; Schrijver et al. 2004; Li et al. 2001). En effet une fois que l'animal a appris la localisation de la plateforme (ou de l'indice en piscine sèche), on change cette plateforme de place et on regarde si l'animal est capable de changer de stratégie de recherche une fois qu'il s'est aperçu que la plateforme n'est plus à l'endroit habituel.

Une autre tâche beaucoup utilisée mettant aussi en exergue les processus impliqués lors de changements de règle est le *set-shifting*, souvent appelée aussi *attentionnal set-shifting*. Cette tâche a tout d'abord été mise au point chez le primate pour étudier les processus d'adaptation à des changements de règles (Roberts et al. 1988; Dias et al. 1996), puis à été transposée aux rongeurs (Birrell & Brown 2000; Floresco & Jentsch 2011). Durant cette tâche, l'animal doit retrouver de la nourriture enfouie dans une coupole en se basant soit sur une odeur différente entre les deux coupoles, soit sur la texture de la sciure qui recouvre la nourriture, soit sur la texture de la coupole. Par exemple, lors du premier essai, si l'odeur est l'information discriminante, alors durant chaque essai la coupole contenant la nourriture sera marquée de la même odeur, mais la sciure et la texture de la coupole changera à chaque essai. Une fois que l'animal réussit 6 essais corrects d'affilé, la règle change et la coupole contenant la nourriture est changée. Celle qui la contenait auparavant est vide, et *vice-versa*. L'animal doit alors s'adapter à ce changement de règle *intra-dimensionnel* en creusant dans la coupole opposée (**Figure 15A**). Au bout de 6 essais corrects la règle change de nouveau : cette fois-ci l'animal est en présence de deux nouvelles coupoles (comme lors de l'essai 1) avec des odeurs, textures de sciure et textures de coupole différentes. Il ne doit plus discriminer la coupole correcte en fonction de l'odeur, mais en fonction de la texture de cette dernière ; c'est le *set-shifting extra-dimensionnel*. Cette dernière procédure permet surtout de vérifier que les mauvaises performances de l'animal sont attribuables à une impossibilité de changer de stratégie attentionnelle relative à plusieurs composantes d'un même stimulus, plutôt qu'à un déficit d'inhibition d'approche du stimulus précédemment associé à la récompense.

Le même type d'approche expérimentale est utilisé chez le rat avec un labyrinthe en croix (Block et al. 2007; Floresco & Jentsch 2011). L'animal est entraîné à tourner à droite pour obtenir la récompense alimentaire sans tenir compte des indices visuels apposés sur les parois ou le sol du labyrinthe. Lors du reversal, l'animal doit au contraire utiliser l'indice visuel qui le mènera à la nourriture (**Figure 15B**). L'équipe de Stan B Floresco a également mis en place un test automatisé de *set-shifting* en utilisant une chambre opérante (**Figure 15C**). Ce test repose sur les mêmes principes précédemment décrits, à savoir le changement de stratégie au cours de la tâche (Floresco et al. 2008). L'un des principaux avantages de ces tests est qu'ils permettent de tester différents aspects de l'apprentissage nécessaires à la mise en place de comportement flexible, comme la discrimination d'indices et l'attention.

Il existe d'autres types de tâches comportementales permettant d'étudier des indices de flexibilité comportementale. Comme par exemple la tâche du labyrinthe en croix avec changement de règle développée par S. Granon (Cressant & Granon 2003), l'**habituation** qui est la diminution progressive de réponses à la suite d'une stimulation répétée. Spontanément on observe chez le rongeur une habituation lors de l'exploration de la nouveauté (nouvel objet ou nouvel environnement). Communément, l'habituation est considérée comme la plus simple forme d'apprentissage. Mais également comme la première étape d'adaptation d'un individu, qui le conduit à considérer un environnement ou un objet comme familier. Ainsi l'habituation permet d'avoir un premier indice de la flexibilité d'adaptation spontanée. L'**extinction**, qui est la capacité de stopper une réponse à un stimulus précédemment renforcé peut aussi être un indice de flexibilité (Granon & Floresco 2009). Le sujet n'est ainsi plus renforcé s'il continue de répondre et la tâche peut durer jusqu'à ce qu'il arrête de répondre.

Ce qu'il faut comprendre, c'est la multiplicité des processus impliqués dans les processus de prise de décision ou de flexibilité comportementale, et donc la multiplicité des tests comportementaux utilisés pour les mettre en évidence. Nous pouvons ainsi disséquer la flexibilité comportementale en plusieurs blocs, certains plus élémentaires mettant en jeu des processus simples tels que l'habituation, l'exploration flexible. D'autres plus complexes qui requièrent d'autres processus d'évaluation rapide à des changements non prédictibles, comme la dévaluation de la récompense (i.e. extinction), le changement de l'environnement (i.e. tâche de set-shifting).

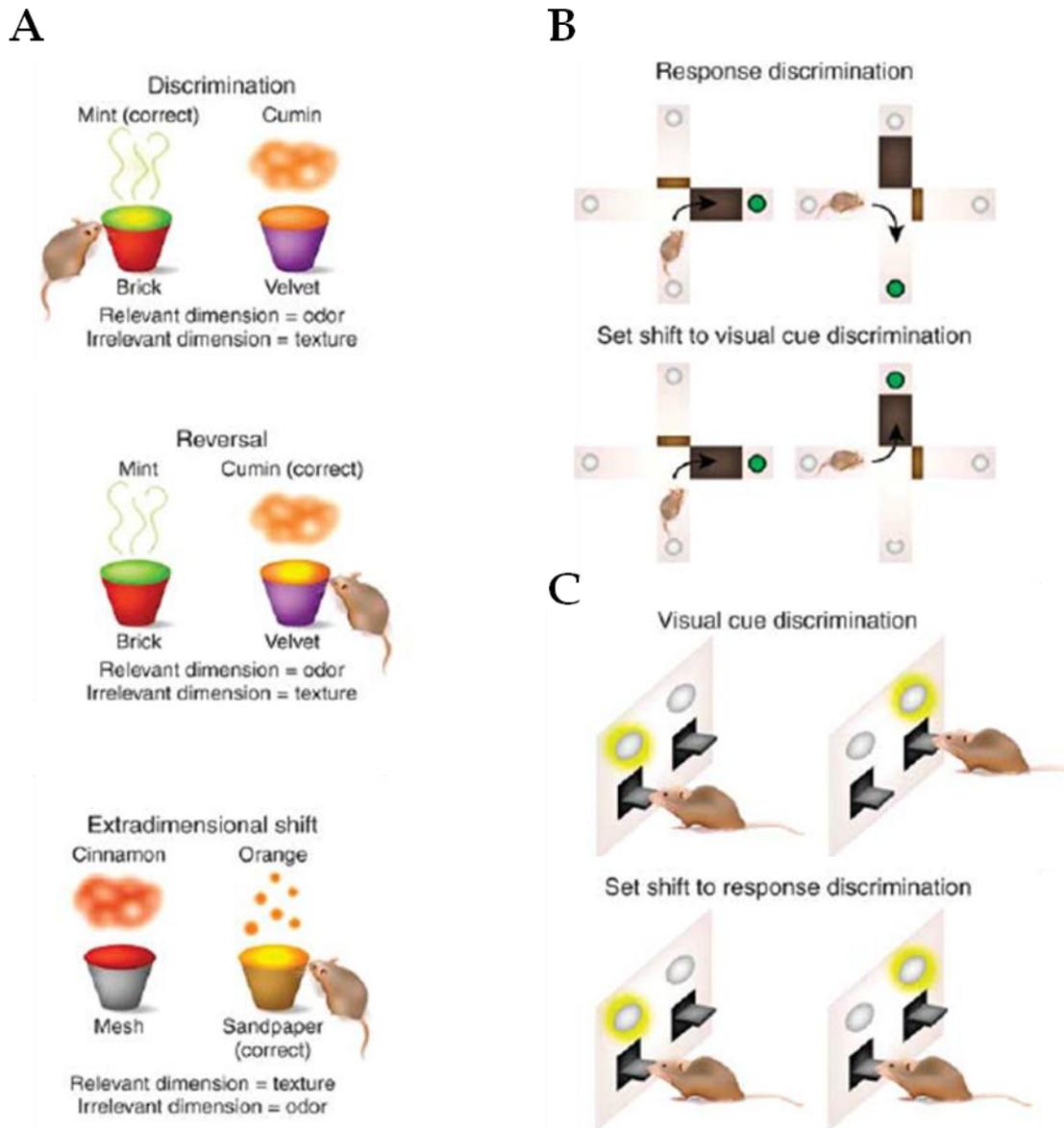


Figure 15: Mesures expérimentales de flexibilité comportementale chez le rat. (A) Tâche de « set-shifting » chez le rat avec changement de règle intra-dimensionnelle et extra-dimensionnelle. **(B)** Tâche de « reversal learning » où le rat doit s’adapter à répondre en fonction du stimulus visuel et non plus en fonction de l’orientation spatiale. **(C)** Tâche de « set-shifting » automatisée chez le rat développée par S. Floresco (adapté de Floresco & Jentsch 2011).

c. Tâche d'interaction sociale (SIT, « *Social interaction task* »)

L'établissement d'une nouvelle interaction sociale implique des processus de perception, d'émotion, de motivation, et d'action. L'étude de l'interaction sociale s'est longtemps focalisée sur quatre aspects :

1) Les seuls aspects émotionnels, relatifs au stress induit par la confrontation à un nouvel individu (Saudou et al. 1994; van Wimersma Greidanus & Maigret 1996; A. Holmes et al. 2002).

2) Les aspects « mémoire » lors de la reconnaissance de congénères connus/inconnus (J. N. Ferguson et al. 2002)

3) Les aspects reproductifs mâle/femelle.

4) L'intérêt pour un congénère (Jamain et al. 2008; Crawley 2007).

Néanmoins, l'étude de l'interaction sociale au sein d'un environnement nouveau pour deux individus de même sexe et de même âge permet de s'affranchir de tous ces paramètres sexuels et mnésiques. De plus, en faisant varier la taille de l'environnement où se déroule l'interaction sociale, le niveau d'anxiété généré par la rencontre des deux individus est considérablement réduit. Ainsi l'interaction entre deux individus dans un environnement nouveau et plus grand que leur cage de vie entraîne la mise en place de séquences comportementales complexes, telles que les approches uni ou bilatérales, les échappements, les exploration proches, qui nécessitent énormément de flexibilité comportementale de la part des deux individus (Granon et al. 2003; Bourgeron et al. 2006). En effet, lors de cette tâche il existe un conflit, une balance entre deux (ou plus selon les cas) motivations majeures et très prégnantes chez les rongeurs : l'exploration d'un nouvel environnement et l'interaction avec un nouveau congénère. Dans la tâche mise en place par S. Granon chez la souris, ces deux motivations peuvent être modulées soit en introduisant l'un des deux animaux avant l'autre dans la cage d'interaction, soit en isolant l'individu test préalablement à la tâche. Concrètement, la tâche se déroule ainsi : l'individu que l'on veut tester est isolé pendant les 3 semaines qui précèdent l'expérimentation, renforçant ainsi sa motivation pour l'interaction sociale. Le jour du test, celui-ci est placé dans la cage d'interaction, seul, pendant 30 minutes ce qui lui permet de découvrir l'environnement. Au terme de cette habituation, un congénère, constamment élevé en cage sociale avec d'autres individus, est introduit dans la cage. Moduler ainsi le niveau motivationnel d'un individu et créer un conflit de

motivation sont deux paramètres qui affectent la prise de décision et donc nécessitent d'adopter un comportement flexible pour pouvoir faire séquentiellement les deux choses et satisfaire les deux motivations (Dehaene & Changeux 2000; Pochon et al. 2008). Comme lorsque nous rencontrons une personne pour la première fois, nous n'avons aucune idée de la façon dont elle va réagir aux différents comportements que l'on peut initier. Faut-il que je lui serre la main ou que je lui fasse la bise pour la saluer ? Comment réagira-t-elle si je l'invite à boire un verre ? Si je suis trop bavard ? Lors de cette tâche d'interaction sociale c'est la même chose. Les souris se doivent d'adapter leur comportement aux réactions et comportements de l'autre, ce qui nécessite une grande flexibilité comportementale en temps réel.

Ainsi cette tâche d'interaction sociale est une tâche multimotivationnelle, où l'animal doit basculer d'une motivation à une autre et ainsi adapter son comportement en fonction de ses propres motivations et de son état émotionnel, mais aussi en fonction du comportement de l'individu auquel il est associé. Finalement, l'étude des séquences comportementales établies durant la mise en place de cette interaction sociale permet d'étudier le comportement flexible des animaux sans processus d'apprentissage, contrairement aux autres tâches décrites précédemment. Par contre, comme pour l'IGT ou le RGT, cette tâche ne possède aucun changement de règle explicite.

L'existence d'autant de tests pour étudier la flexibilité comportementale ou la prise de décision chez l'humain ou l'animal ne veut pas dire qu'il en existe des plus solides que d'autres. Au contraire, ils ont tous leurs avantages et leurs inconvénients résultants principalement des processus qu'ils recrutent. En effet, ces différents tests reproduisent des situations de choix à des niveaux différents. Ils impliquent des niveaux variés de processus attentionnels, d'action, motivationnels et émotionnels. Chacun de ces tests est une fenêtre ouverte sur plusieurs de ces processus à des niveaux de résolutions différents ; et cette variété de processus mise en jeu lors de ces tests comportementaux permet aux expérimentateurs que nous sommes d'étudier la prise de décision sous différents angles.

2.2. *Substrats neurobiologiques impliqués dans la prise de décision*

Durant plusieurs années, l'hypothèse dominante mettait en avant l'existence d'un « Centre des décisions » unique et exécutant toutes les décisions : le cortex préfrontal (CPF). Aujourd'hui, des études à la fois anatomiques et fonctionnelles ont montré que les processus de prise de décision faisaient intervenir de nombreux acteurs neurobiologiques autres que le CPF. La complexité de ces processus rend compte de la difficulté d'avoir une compréhension globale et complète des différentes régions cérébrales impliquées. Toutefois, l'imagerie cérébrale chez des sujets sains (Tom et al. 2007), l'étude de patients avec des lésions cérébrales, et l'approches lésionnelles chez l'animal (Rudebeck et al. 2007; Bissonette et al. 2008), ont permis de mettre en évidence l'implication de différentes sous-parties du CPF (Wallis 2007) mais aussi de structures sous-corticales dans ces processus de décision (Tom et al. 2007; Dreher 2007). Chez l'Homme comme chez l'animal, l'étude approfondie de la contribution du CPF à permis d'avoir une vision plus complète des différentes fonctions qui lui sont attribuées. Mais hormis le rôle prépondérant du CPF dans de multiples fonctions cognitives supérieures, il y a également tout un circuit de structures sous-corticales qui sont nécessaires pour prendre des décisions adaptées et adopter un comportement flexible.

2.2.1. *Le cortex préfrontal*

2.2.1.1. *Organisation corticale*

Le cortex préfrontal présente un patron d'organisation commun à tout le néocortex chez les mammifères. Il est constitué de 6 couches cellulaires parallèles de la couche I à la couche VI réparties comme suit (Boretius et al. 2009):

- Couche I (couche moléculaire) : pauvre en cellules nerveuses, constituée principalement de cellules gliales et de fibres.
- Couche II (couche granulaire externe) : contient de petits neurones pyramidaux qui reçoivent des afférences des autres zones corticales.
- Couche III (couche pyramidale externe) : contient la majorité des neurones pyramidaux, dont les axones forment les fibres interhémisphériques et intrahémisphériques (aussi appelées commissures), tandis que leurs dendrites atteignent la couche moléculaire.

C'est de cette couche cellulaire que partent les efférences vers les autres structures corticales (connexions cortico-corticales).

- Couche IV (couche granulaire interne) : formée de petits neurones non pyramidaux représentés par des cellules étoilées. Cette couche peut également être utilisée pour définir le cortex comme étant une structure cellulaire contenant une couche IV granulaire. Cette zone est la zone principale qui reçoit les projections issues du thalamus médiodorsal (MD).

- Couche V (couche pyramidale interne) : contient des neurones pyramidaux dont les dendrites apicaux se projettent soit dans la couche I soit dans la couche IV. Les axones de ces neurones se projettent à distance vers les zones sous-corticales (striatum, moelle épinière...).

- Couche VI (couche polymorphe): constituée de neurones qui se projettent pour la plupart dans le thalamus.

De façon générale, le CPF est constitué de deux types de neurones : les cellules pyramidales de taille variable selon les couches cellulaires ; elles sont glutamatergiques et présentent de nombreuses collatérales. Et les interneurones GABAergiques. Il existe plusieurs types de cellules GABAergiques : cellules chandelier, double bouquet, basket, et les cellules contenant la cholécystokinine, réparties selon leur profil électrophysiologique de décharge ainsi que sur des critères de morphologies et neurochimiques (Dos Santos Coura & Granon 2012). Ces deux types de population forment un microcircuit au sein des cortex (**Figure 16C**), et agissent (activation ou inhibition) l'un sur l'autre (Seamans et al. 2001; Trantham-Davidson et al. 2004) (Cf. **section 1.2.3**).

2.2.1.2. *Caractéristiques cytoarchitectoniques*

D'un point de vue anatomique on pourrait simplement définir le CPF comme étant le pôle antérieur du cortex des mammifères, situé en avant du genou du corps calleux. Mais il existe, à la fois chez le rongeur et l'Homme, une grande variété de définitions à la fois anatomiques, fonctionnelles, et phylogénétiques, pour définir cette partie du cerveau qu'est le cortex préfrontal. La première définition date de 1948 (Rose & Woolsey 1948) : elle propose que « *le cortex préfrontal soit défini par des afférences du noyau medio dorsal du thalamus* ». L'existence d'un CPF chez les rongeurs à longtermis été un débat, mais rapidement l'équipe de Bryan Kolb (Uylings et al. 2003) à mis en place des critères à la fois cytoarchitectoniques et fonctionnels pour définir le CPF d'abord chez le rat, puis chez la souris (Van De Werd et al.

2010). Les critères pris en compte pour discuter l'homologie entre aires corticales de différentes espèces sont : 1) la connectivité de la structure ; 2) les propriétés fonctionnelles ; 3) la présence et la distribution spécifique de neurotransmetteurs et récepteurs ; 4) le développement de la structure ; et enfin seulement pour les espèces proches au plan phylogénique 5) les caractéristiques cytoarchitectoniques. A partir de ces critères, le CPF de rat et de la souris a été défini comme étant l'ensemble des structures se situant derrière le bulbe olfactif et devant le cortex moteur primaire (M1).

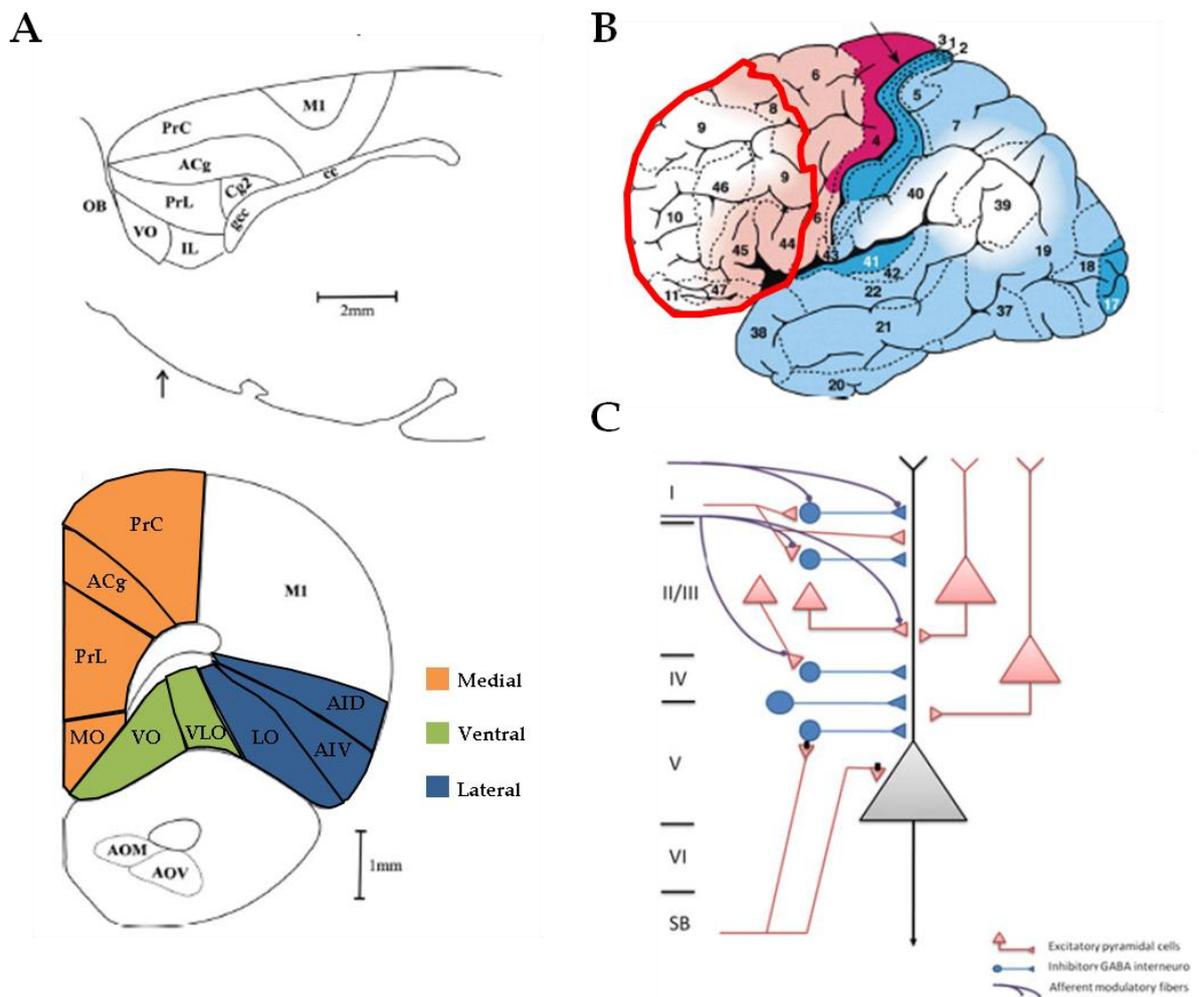


Figure 16: Le cortex préfrontal chez le rongeur et chez l'Homme. (A) Diagramme illustratif du cortex préfrontal de rat en vue sagittale, 0.9mm de la ligne médiane (haut) et en section coronale, 3.5mm du Bregma (bas). La vue coronale représente les différentes régions médiane, ventrale et latérale (adapté de (Jeffrey W Dalley et al. 2004)). (B) Organisation du cortex préfrontal (zone entourée en rouge) chez l'Homme selon les aires de Brodmann (adapté de (Fuster 2001)). (C) Architecture du cortex en couches cellulaires allant de la couche I à VI contenant les différents types cellulaires (adapté de Dos Santos Coura & Granon 2012).

D'un point de vue connectivité, le CPF communique très largement avec les structures corticales et sous-corticales (Barbas 2000; Fellows 2004; Fuster 2001) ; globalement presque toutes les structures influencent de façon directe ou indirecte le fonctionnement du CPF. Cette situation semblerait faire du CPF le berceau de convergences neuronales, visant à la résolution de conflits entre un certain nombre de motivations ou d'informations sensorielles, qui aboutissent à la décision à prendre. En outre chez tous les mammifères, le cortex préfrontal est la partie du cortex qui se développe la plus tardivement (Fuster 2001; Huttenlocher 1990; Huttenlocher & Dabholkar 1997). Des études d'imagerie chez l'Homme montrent qu'il n'est complètement fonctionnel et mature qu'à l'adolescence (Chugani et al. 1987; Paus et al. 1999; Sowell et al. 1999). Ceci est cohérent avec les observations comportementales montrant que cette aire cérébrale est indispensable pour certaines fonctions cognitives de haut rang tel que la capacité de raisonnement complexe.

Le CPF est l'une des trois principales subdivisions du lobe frontal qui est aussi composé du cortex prémoteur et du cortex moteur (Krawczyk 2002). Il est classiquement divisé en 3 régions principales: une latérale, une médiane et une ventromédiane (Tanji & Hoshi 2008; Selemon & Goldman-Rakic 1988).

Chez le rongeur (rat et souris) le cortex préfrontal se subdivise en trois grandes parties (**Figure 16A**) (Heidbreder & Groenewegen 2003; Van De Werd et al. 2010) :

- Le **cortex préfrontal médian**, composé de l'infralimbique (**IL**), du prélimbique (**PrL**), du cingulaire antérieur (**ACg1 et ACg2**), et du cortex orbitofrontal médian (**MO**).
- Le **cortex préfrontal latéral**, composé du cortex orbitofrontal latéral (**LO**) et dorsolatéral (**DLO**), du cortex agrulaire insulaire dorsal (**AiD**), et ventral (**AiV**).
- Le **cortex préfrontal ventral**, comportant le cortex orbitofrontal ventral (**VO**) et le cortex orbitofrontal ventro-latéral (**VLO**).

Chez l'Homme (**Figure 16B**) les 3 grandes parties se présentent ainsi (Petrides & Pandya 2001):

- Le **préfrontal dorsolatéral (DLPFC)** constitué des aires de Brodmann 9, 46 et 9/46.
- Le **préfrontal ventrolatéral (VLPFC)** constitué des aires de Brodmann 47/12 et 45.
- Le **préfrontal médian (MPFC)** constitué des aires de Brodmann 32 et de la partie de l'aire 24.

- Le **cortex orbitofrontal (COF)** est la partie ventrale du lobe frontal. Situé juste derrière le front et au dessus des orbites oculaires, il est constitué de 5 régions: aire frontopolaire 10, l'aire 11 (antérieure), l'aire 13 (postérieurement), l'aire 14 (médiane) et l'aire 47/12 (latérale).

2.2.1.3. Fonctions des sous-parties du CPF

L'implication du CPF dans les mécanismes de prise de décision date du 19^{ème} siècle. En 1948, Phinéas Gage un contremaître chargé de la construction d'une voie de chemin de fer, est victime d'une explosion qui lui propulse une barre à mine à travers le crâne, lui infligeant d'importants dommages préfrontaux (**Figure 17**). A l'époque les outils pour analyser ce type de blessure étaient rudimentaires (pas d'imagerie médicale par exemple) mais les médecins étaient formels : le comportement de Gage P. avait changé. Il s'était mis à avoir des difficultés de jugement et de prise de décision en général. L'analyse du trajet de la barre à mine à montré que ses lésions étaient essentiellement localisées au niveau du CPF ventromédian (Damasio et al. 1994; Ratiu et al. 2004).

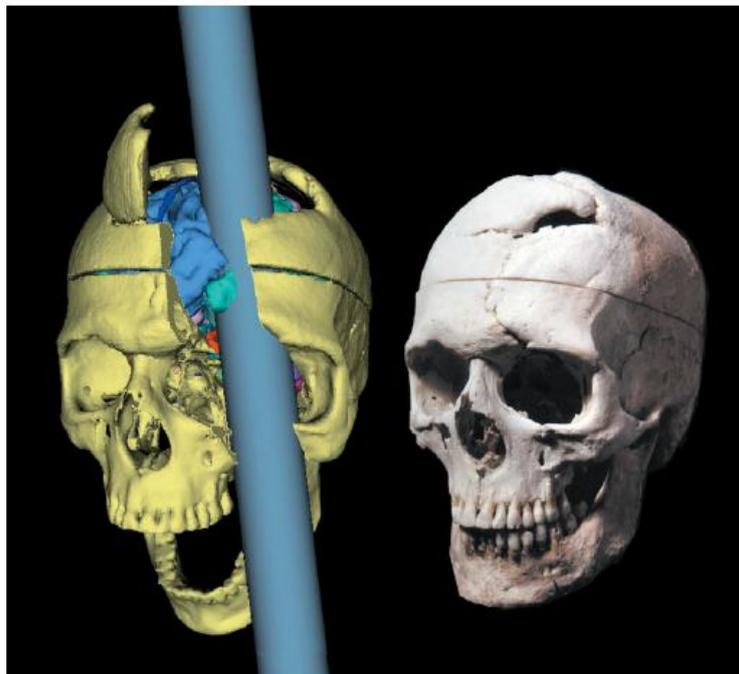


Figure 17: Reconstruction 3D du trajet de la barre à mine à partir du crâne de Phinéas Gage (Ratiu et al. 2004).

Les études conduites directement sur Gage P. ou indirectement via les rapports médicaux, ont depuis été largement retrouvés chez des patients cérébrólésés. Les progrès de l'imagerie fonctionnelle et l'utilisation de tâches comportementales comme l'IGT, le WCST, ont permis d'affiner les diagnostics. En général, les patients présentant des lésions du CPF possèdent de bonnes capacités cognitives mais souffrent de troubles les empêchant de prendre des décisions adaptées sur le long terme (Damasio et al. 1994). Les nombreuses études de neuroimagerie ont montré non seulement l'activation du CPF lors de processus de récompenses, planification, mémoire de travail, mais aussi que cette région peut être subdivisée à la fois en terme de sous-processus distincts, mais également en fonction de connectivité de ces sous-régions aux autres structures cérébrales. Comme le précise Krawczyk D., cette dichotomie n'est pas à interpréter comme une indication qu'il existe des subdivisions autonomes du CPF qui prennent en charge des fonctions de manière isolée, mais plutôt comme le fait que différentes régions de ce CPF sont impliquées dans des composantes distinctes de processus cognitifs (**Figure 18**) (Krawczyk 2002).

- Le Cortex orbitofrontal

Le cortex orbitofrontal (COF) est une région plus ventrale, c'est la région du cerveau directement derrière le front, au dessus des orbites oculaires. Cette région est largement impliquée dans l'évaluation et le filtrage des informations perceptuelles, quelles soient sociales, émotionnelles ou motivationnelles. En effet le COF est connecté à de nombreuses structures du système limbique et reçoit des afférences de plusieurs modalités sensorielles (Wallis 2007; Ongür & Price 2000). Le COF apparaît comme étant très impliqué dans le traitement de la valeur de récompense. Les données anatomiques suggèrent que cette région intègre de multiples informations sensorielles pour attribuer une valeur motivationnelle à chaque stimulus (Wallis 2007). Le COF possède des projections denses vers le NAcc (Haber et al. 1995), et reçoit des afférences directes de cellules dopaminergiques de l'ATV mais également des projections directes et indirectes (relayées par le thalamus) d'autres structures limbiques telles que l'Amygdale, Gyrus cingulaire, et l'hippocampe (Ray & Price 1993; Oades & Halliday 1987; Volkow & Fowler 2000; Coricelli et al. 2007). Ces connections permettent aux structures sous-corticales de pouvoir donner une information actualisée de la valeur de chaque stimulus. Ainsi, le comportement de patients cocaïnomanes dans des tâches de prise de décision comme l'IGT, montre une claire différence d'activation du COF, suggérant que

les consommateurs de cocaïne n'ont pas la même représentation du renforcement que les sujets contrôles (Bolla et al. 2003; Volkow & Fowler 2000; Kalivas et al. 2005). De la même façon, de récentes données obtenues chez les rongeurs montrent une disposition à prendre des décisions inadaptées dans un contexte risqué chez des animaux ayant subis des lésions spécifiques du COF (Zeeb & Winstanley 2011; Pais-Vieira et al. 2007). Toutes ces caractéristiques donnent à cette région du CPF un rôle crucial dans la prise de décision. Rôle qui se trouve à l'interface entre des processus émotionnels, motivationnels et cognitifs, et de la valeur attribuée aux stimuli environnementaux (Krawczyk 2002; Roberts 2006). De plus le COF est la région centrale de la théorie des marqueurs somatiques d'A. Damasio. En effet, vu ses connexions avec les structures impliquées dans la gestion des émotions (telles que l'amygdale, l'insula, le cortex somatosensoriel), le COF serait impliqué dans l'intégration des informations de l'état somatique de l'individu en prévision du choix de telle ou telle option. Il a été montré que des lésions du CPFvm ou COF entraînent une diminution des performances dans l'IGT. De plus, les patients présentant ce type de lésions ont, non seulement de mauvaises performances, mais celles-ci sont décorréliées de toute réponse électrodermale (Bechara et al. 1994; Bechara et al. 1996; Bechara et al. 2001).

- Le cortex cingulaire antérieur (ACC) et CPF dorsolatéral (CPFdl)

Le cortex cingulaire antérieur (ACC) est une région médiane du CPF qui s'étend le long du corps calleux (ACg1 et ACg2 chez le rongeur, A24 et A32 chez l'homme et le primate). L'ACC est globalement impliqué dans les processus qui encodent le contrôle de l'action dirigée vers un but. Il définit si une action mérite d'être réalisée en vue des coûts et bénéfices attendus (Schweimer & Hauber 2005b; Schweimer & Hauber 2006). En effet, des données obtenues chez les rats avec des lésions de l'ACC, montrent une tendance à choisir le bras faible-coût-faible-bénéfice plutôt que de devoir grimper une barrière pour obtenir plus de nourriture (Walton et al. 2003; Rushworth et al. 2004) (Cf **section 1.2.3** et **Figure 8**). Il permet d'évaluer les choix lorsque l'individu est confronté à une situation conflictuelle. Pour cela il évaluerait les coûts et bénéfices des actions et jouerait également un rôle dans le contrôle des performances. L'ACC projette sur des régions motrices : les ganglions de la base, le cortex moteur et la moelle épinière. Il semblerait donc que ce soit une zone de convergence des commandes cognitives qui module l'activité motrice avant son transfert vers le système moteur (Picard & Strick 1996; Paus et al. 1993). De plus cette structure semble

jouer un rôle de choix dans les processus de mise en place et de maintien de comportements sociaux (Rushworth et al. 2007; Rudebeck et al. 2007). Donc l'ACC jouerait un rôle dans l'intégration des variations de renforcement des options possibles, et permettrait d'avoir une représentation actualisée des actions motivées et de leurs valeurs.

Le CPFdl est, comme son nom l'indique, une partie plus latérale du CPF. Cette sous-région peut être divisée en plusieurs sous-parties, certaines plus dorsales, d'autres plus latérales. Le CPFdl est très impliqué dans le traitement cognitif, la récupération et la sélection des informations qui permettraient la construction d'un plan pour atteindre un but particulier (Wallis 2007; Seamans et al. 2008). Il a également un rôle dans les processus attentionnels, la planification d'actions et dans le traitement du langage (Rangel et al. 2008; Fuster 2001; Fuster 1997). La spécificité de cette région est qu'elle présente très peu d'afférences mais de nombreuses interconnexions corticales, notamment avec des sous-parties préfrontales, telle que l'ACC (Tanji & Hoshi 2008; Fellows 2004), impliqué dans l'évaluation des conséquences et leurs impacts sur la sélection de l'action.

- Cas particulier du cortex prélimbique/ infralimbique (IL)

Chez le rongeur il existe deux sous-parties médianes du CPF très impliquées dans les processus de prise de décision : le cortex prélimbique (PrL) et le cortex infralimbique (IL). Ces parties médianes du CPF apparaissent beaucoup moins différenciées que chez l'Homme mais elles partagent des caractéristiques anatomo-fonctionnelles de plusieurs régions du CPF humain. Elles pourraient être associées d'un point de vue fonctionnel au cortex préfrontal dorsolatéral (CPFdl) de part leurs implications cruciales dans les processus exécutifs (Granon et al. 1994; Uylings et al. 2003; Vertes 2006; Farovik et al. 2008). Cependant sur le strict plan anatomique, leur organisation est beaucoup plus proche du CPF ventromédian (Rushworth et al. 2004; Vertes 2006).

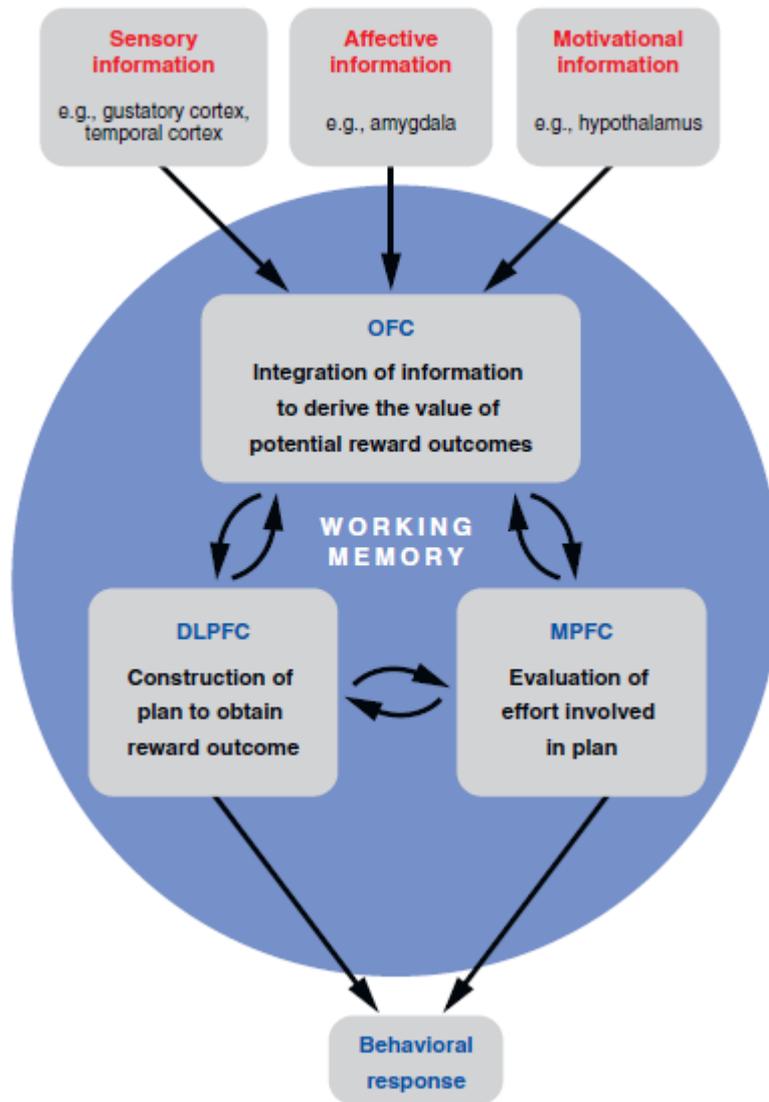


Figure 18: Modèle original des mécanismes neuronaux à l'origine de la prise de décision dans le CPF (Schéma original de Wallis 2007).

Chez le rat, le CPFm a été considéré comme l'une des plus importantes structures impliquée dans les processus d'intégration d'informations spatiales. En effet le PrL reçoit des afférences directes de l'hippocampe ventral (CA1) et du subiculum (Condé et al. 1995). Seulement, ce rôle relativement éloigné des processus de prise de décision reste encore aujourd'hui très controversé (Delatour & Gisquet-Verrier 2000; Oualian & Gisquet-Verrier 2010). Jusqu'à récemment, les études de lésions, conduites pour disséquer le rôle de cette région chez le rat, ne faisaient pas de distinction entre le PrL et l'IL. En effet plusieurs études montrent que la partie la plus médiane comprenant le PrL et l'IL, est impliquée dans les processus attentionnels et les processus de flexibilité comportementale, tout deux importants

pour intégrer des informations relatives à la mémoire de travail et à la mémoire spatiale (Delatour & Gisquet-Verrier 2000; Granon & Poucet 1995; Granon & Changeux 2011). Cependant, de récentes études ont pu montrer un rôle distinct de ces deux sous-parties dans les processus de flexibilité comportementale. Schématiquement, le PrL semble impliqué dans la sélection et le maintien d'une stratégie tandis que l'IL aurait un rôle de sélection de cette stratégie (Rich & Shapiro 2009; Oualian & Gisquet-Verrier 2010).

2.2.1.4. *Connections cortico-corticales*

Le CPF est une région cérébrale qui dispose de nombreuses connections à la fois au sein même du CPF, mais également avec d'autres structures corticales comme les aires prémotrice, somatosensorielle, et sensorielle (Uylings et al. 2003; Helen Barbas 2000; Preuss & Goldman-Rakic 1989). De plus le CPF est également connecté aux aires motrices primaires, permettant le contrôle cognitif des actes moteurs (Selemon & Goldman-Rakic 1988; Preuss & Goldman-Rakic 1989; Kouneiher et al. 2009). En ce qui concerne les projections cortico-corticales au sein même du CPF, des études de traçage chez le macaque rhésus ont permis de mettre en évidence une connexion entre le CPFdl qui reçoit de nombreuses projections du CPF médian, et du COF qui envoie des projections au CPF ventro-latéral (Barbas & Pandya 1989; Barbas 2000).

Ainsi les connexions cortico-corticales peuvent être classées en 2 catégories en fonction de leur profil d'innervation :

- un réseau dorso-médian (ACC) qui reçoit des afférences de différentes modalités sensorielles.

- un réseau plus ventro-médian (PrL, IL) qui reçoit de façon privilégiée des projections directes de l'hippocampe, et qui est fortement connecté avec le COF, et les zones corticales entorhinale et périrhinale (Ongür & Price 2000; Heidbreder & Groenewegen 2003).

2.2.1.5. *Circuit fronto-sous corticaux*

En plus d'avoir des relations au sein même du CPF, certaines zones du CPF sont sous l'influence des principaux systèmes de neuromodulation. Le CPF reçoit des projections du noyau basal de Meynert (Ach), du locus coeruleus (Noradrénaline, NA), des noyaux du

raphé (sérotonine, 5-HT), et de l'ATV (DA). Concernant l'innervation dopaminergique, il est intéressant de noter que la densité de fibres dopaminergiques suit un gradient dorsal-ventral et est très importante dans le PrL et L'IL (Floresco & Magyar 2006).

Le CPF projette également vers un grand nombre de régions sous corticales (**Figure 19**). Parmi ces régions on compte des projections envoyées au thalamus médiadorsal ainsi qu'à l'hypothalamus latéral. Si on prend l'exemple du PrL et de l'IL chez le rongeur, le premier projette, en plus de ces projections corticales, majoritairement sur la partie médiane du striatum dorsal (DMS), ainsi que sur certains acteurs du système limbique comme le cœur du NAcc (NAcc « core »), l'ATV ou l'amygdale (BLA). L'IL envoie des efférences sur les mêmes zones, à noter qu'il projette sur la coque du NAcc (NAcc shell) et non sur le cœur, mais également sur des zones beaucoup plus caudales telles que la substance grise périaqueducale (PAG, noyau impliqué dans l'émission et le contrôle de vocalisations chez le rongeur), le noyau du tractus solitaire (NTS) ou encore le noyau parabrachial (PB) (Vertes 2006; Gabbott et al. 2005; Heidbreder & Groenewegen 2003; Krawczyk 2002).

Comme précédemment décrit, le striatum est connu comme étant un lieu de convergence et d'intégration d'informations qui proviennent essentiellement du cortex, et ce, chez toutes les espèces, notamment chez le primate et le rongeur (Haber & Knutson 2010; Pan et al. 2010; Voorn et al. 2004; Haber 2003). Cette structure peut être séparée en deux sous-régions en fonction des projections qui y arrivent : le striatum dorso-médian (DMS) et le striatum ventral (VS). La partie dorsale étant impliquée dans la programmation de mouvements volontaires, alors que la partie ventrale est impliquée dans les processus de récompenses (Haber & Knutson 2010). Le DMS représente également la structure d'entrée des ganglions de la base, qui est un ensemble de régions composées du striatum, du globus pallidus, du noyau sous-thalamique et de la substance noire réticulée (SNr). Ces régions sont liées entre elles par des boucles unidirectionnelles allant du striatum au thalamus, puis formant une boucle revenant vers les zones corticales (cortex moteur essentiellement) en repassant d'abord par le thalamus. Les ganglions de la base permettent notamment le contrôle moteur, et le déclenchement de mouvements volontaires harmonieux (Chudasama & Robbins 2006).

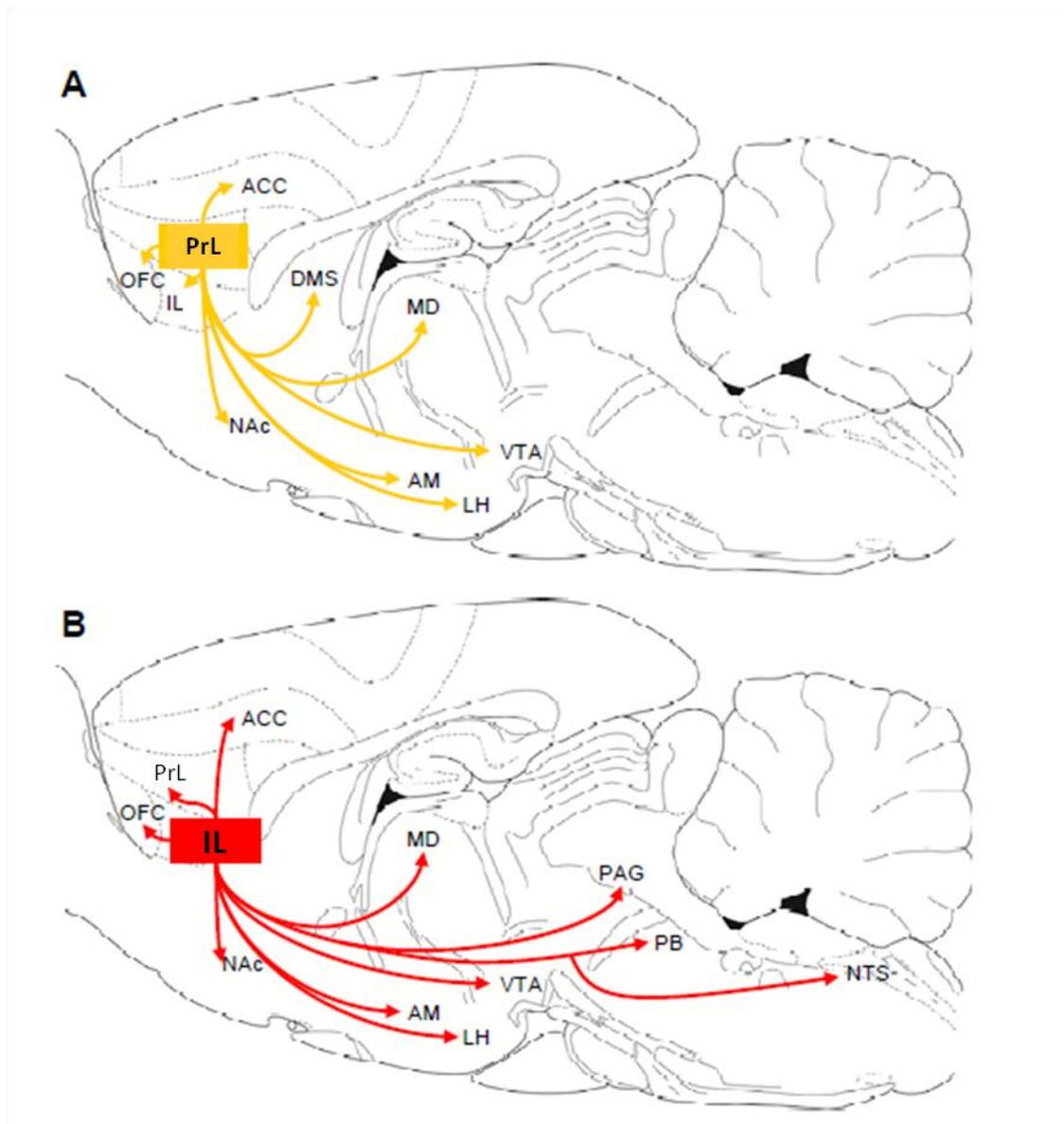


Figure 19: Principales efférences des cortex prélimbique PrL (A) et infralimbique (B). ACC : Cortex cingulaire antérieure ; AM : amygdale ; DMS : striatum dorso-médian ; IL : cortex infralimbique ; LH : Hypothalamus latéral ; MD : thalamus médiadorsal ; NAc : noyau accumbens ; NTS : noyau du tractus solitaire ; PAG : substance grise périaqueducale ; PB : noyau parabrachial ; PrL : cortex prélimbique ; OFC : cortex orbitofrontal ; ATV : aire tegmentale ventrale (adapté de Vertes 2006).

Il existe au sein du striatum une organisation topographique particulière des projections venant du CPF (**Figure 20A**), on observe ainsi un gradient d'organisation selon un axe dorso-ventral et selon un axe médio-latéral (Haber 2003; Haber & Knutson 2010; Pan et al. 2010; Voorn et al. 2004). Cette organisation particulière et le fait que plusieurs régions du CPF sont engagées dans des projections vers le striatum, ont permis de définir un modèle de **boucles cortico-striato-pallido-thalamo-corticales**^{VII} passant par ces différentes régions des ganglions de la base (Alexander et al. 1986; Chudasama & Robbins 2006). Parmi ces boucles, trois seraient impliquées dans différentes fonctions essentielles à la prise de décision (**Figure 20B**).

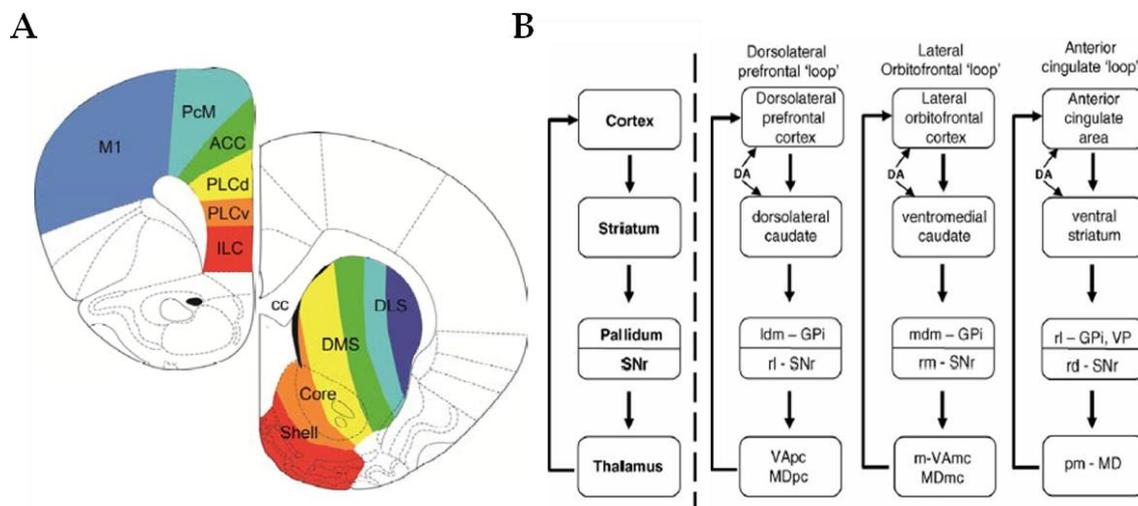


Figure 20: Organisation des circuits fronto-striataux connectant les sous-régions du CPF au striatum. (A) Topographie des projections préfrontales au striatum chez le rongeur (Voorn et al. 2004; Haber 2003) (B) Chaque boucle commence dans une région spécifique du CPF (CPFdl, COF, ou ACC) et innerve différents niveaux des ganglions de la base avant de retourner au cortex (adapté de Alexander et al. 1986; Chudasama & Robbins 2006).

^{VII} On parlera par la suite de boucles cortico-striatales, omettant volontairement les autres acteurs de ces boucles rétroactives par soucis de simplicité.

2.3. Flexibilité comportementale, prise de décision et pathologies

Etudier les processus et substrats neurobiologiques associés à la prise de décision représente également un enjeu de santé publique relativement important. En effet, bon nombre de pathologies, psychiatriques, neurobiologiques ou dégénératives, montre des signes de déficiences de flexibilité comportementale et de prise de décision. Des données d'imagerie cérébrales ou issues de tâches comportementales (i.e. l'IGT ou le WCST) ont permis de mettre en évidence des atteintes de la prise de décision au cours de: la schizophrénie (Callicott et al. 2003; Brigman et al. 2006), les troubles d'hyperactivité avec déficit attentionnel ou THDA (Ernst et al. 2003), les Troubles Obsessionnels Compulsifs (Graybiel 2008; P Cavedini, G Riboldi, D'Annucci, et al. 2002), les troubles de l'addiction aux jeux (Cavedini, Giovanna Riboldi, Roberto Keller, et al. 2002), et aux drogues (Bolla et al. 2003; Volkow & Fowler 2000; Bechara & Damasio 2002; Bechara et al. 2001; Bechara et al. 2002), les troubles du comportement alimentaire (P Cavedini et al. 2004), et les troubles de l'autisme (Gillberg 2010; Bourgeron et al. 2006) et chez les sujets atteints de la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (Poletti et al. 2011; Labudda et al. 2010; Gleichgerrcht et al. 2010). Les substrats neurobiologiques associés à ces différentes pathologies ne sont pas tous clairement identifiés.

3. Modèle animal de déficit de flexibilité pendant l'interaction sociale

3.1. L'utilisation de modèles animaux

3.1.1. Avantage de l'utilisation de modèles animaux

De façon à étudier plus amplement les processus de prise de décision et pour en comprendre toute la complexité, les chercheurs utilisent de plus en plus les modèles animaux. Ces modèles permettent l'étude de processus, pathologiques ou sains, de façon spontanée ou induite par différentes manipulations (génétiques, pharmacologique). L'utilisation de tels modèles en neurosciences présente des avantages certains, qui permettent de repousser les limites imposées par l'éthique de l'expérimentation sur l'Homme et les biais liés à l'histoire de chaque sujet. Par exemple l'environnement des animaux de laboratoire utilisés en Neurosciences est contrôlé, et leur patrimoine génétique connu permet de mener des études génétiques à grande échelle sur de nombreux individus, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme. Enfin, l'expérimentation animale donne la possibilité de mener des études invasives comme des lésions, des études électrophysiologiques, ou des injections pharmacologiques, souvent impossible chez l'Homme. La grande disponibilité de ces animaux ainsi que leur similarité génétique (clones), permet de disposer d'un grand nombre d'individus dans chaque groupe expérimental lors des études.

3.1.2. Validité expérimentale du modèle souris

En 1969 McKinney et Bunney (McKinney & Bunney 1969) ont proposé des critères permettant d'établir la bonne validité de modèles animaux de maladies psychiatriques. Initialement ces critères étaient au nombre de cinq :

- 1) Les symptômes chez l'animal devaient être raisonnablement analogues à ceux observés chez l'Homme.
- 2) Il devait y avoir un changement comportemental observable à la fois chez le modèle et chez le patient, qui pouvait être objectivement quantifié.
- 3) Des observateurs indépendants devaient être en accord sur les critères objectifs pour pouvoir tirer des conclusions à partir d'états subjectifs.
- 4) Les traitements qui amélioreraient la condition chez l'Humain devaient avoir un effet chez l'animal.

5) Et enfin, le système se devait d'être reproductible par plusieurs investigateurs. Ces critères ont depuis été repris et retravaillés par la communauté scientifique qui s'est accordée sur l'établissement de trois grandes lignes de validité (Overall 2000; Crawley 2007), décrites ci-après.

1) La « *Face validity* » ou Validité d'apparence

La validité d'apparence désigne les analogies comportementales qui existent entre le modèle animal et l'Homme. Pour qu'un modèle animal soit considéré comme viable, il doit présenter des comportements semblables à ceux observés chez l'humain. Il existe, par exemple, une grande similarité entre les comportements de prise de décision chez l'humain et chez la souris. Ainsi, dans des tâches comportementales comme l'IGT, le WCST, ou encore les tâches de *reversal*, les animaux sains choisissent toujours les options les plus favorables pour remporter de la nourriture.

2) La « *Construct validity* » ou Validité de construction

La validité de construction du modèle dépend de l'existence d'équivalences fonctionnelles pour les processus impliqués. Ce point est très délicat lorsqu'il s'agit de définir un modèle animal car il est difficile de savoir si les comportements similaires que l'on observe au sein des deux espèces font intervenir les mêmes structures neuronales ou pas. Or, le CPF présente de grandes variations du point de vue anatomique entre les espèces. Ainsi, l'existence d'un CPF chez les rongeurs (rat ou souris) à longterm a été contredite, notamment à cause de l'utilisation de critères anatomiques de définition du CPF peu adaptés aux rongeurs (Brown & Bowman 2002). Depuis, l'évolution et l'inclusion de nouveaux critères basés sur l'analogie fonctionnelle, les systèmes de neurotransmission et le développement embryologique ont permis de poser les bases de nombreuses analogies entre le CPF des primates et celui des rongeurs (Uylings et al. 2003). En section « **2.2.1 Le cortex préfrontal** » nous avons ainsi abordé les analogies qui existent au sein de l'organisation du CPF et de ses connexions avec le reste du cerveau à la fois chez l'Homme et chez le rongeur.

D'un point de vue fonctionnel, il est clairement établi aujourd'hui que les processus exécutifs tel que la prise de décision ou la flexibilité comportementale font intervenir le CPF chez l'Homme comme chez le rongeur (Dalley et al. 2004; Brown & Bowman 2002). L'utilisation d'un ensemble de mesures expérimentales (détaillées en **section 2.1.4**) et

d'études lésionnelles ou d'imagerie chez l'animal a permis de mettre en évidence les bases préfrontales de ces processus cognitifs supérieurs, mais également d'affiner les analogies fonctionnelles qui existent entre l'homme et l'animal.

3) La « *predictive validity* » ou Validité prédictive

Le modèle animal présente une bonne validité prédictive lorsque, à partir des résultats obtenus sur celui-ci, il est possible de transposer les effets de la manipulation. Il faut ainsi s'intéresser au potentiel *translationnel* du modèle, par exemple en étudiant les effets d'un traitement médicamenteux dont les résultats seraient prédictifs des effets de ce traitement chez l'Homme.

Pour conclure, il est important de noter qu'il n'existe pas de modèle animal parfait regroupant l'intégralité de toutes les conditions précédemment citées, cela supposerait la connaissance complète de tous les mécanismes et substrats neurobiologiques impliqués ; et diminuerait l'intérêt du modèle animal.

3.1.3. *Modèle de flexibilité comportementale : l'interaction sociale des $\beta 2$ KO*

Comme abordé dans la « **section 2.1.4.2 Mesures expérimentales chez l'animal** », il existe une multitude de tâches comportementales pour tester la flexibilité comportementale chez la souris. La tâche d'interaction sociale est une tâche qui se rapproche beaucoup de la situation naturelle dans laquelle les animaux doivent choisir entre explorer un environnement nouveau et l'approche d'un nouveau congénère. Durant cette tâche les animaux doivent faire preuve d'une grande flexibilité comportementale et prendre des décisions adaptées à leur environnement mais aussi au congénère. De plus cette tâche nous permet dans le cadre de ce travail de thèse d'étudier l'impact des motivations naturelles (exploration d'environnement et d'approche de congénère) sur la prise de décision. En effet lors de cette tâche, les souris alternent spontanément entre les différentes motivations, alors que des souris génétiquement modifiées qui n'expriment pas la sous-unité $\beta 2$ des nAChRs (**cf. section 1.3.3**) montrent un comportement plus rigide. Elles ont beaucoup plus de mal à se défaire d'un type de comportement, en l'occurrence l'approche de congénère, et délaissent drastiquement l'exploration de l'environnement (Granon et al. 2003). Ce type de déficit est tout à fait comparable au comportement « rigide » de patients présentant des lésions préfrontales chez l'homme (Bechara et al. 1994; Bechara et al. 1996), et, est très similaire à des

pathologies entraînant des troubles du comportement social tel que l'autisme (Ey et al. 2011; Bourgeron et al. 2006; Jamain et al. 2008). Ainsi l'interaction sociale chez le rongeur présente un bon modèle d'étude de la flexibilité comportementale en situation de choix complexe incertaine, comme peuvent l'être les situations sociales.

3.2. Les vocalisations chez les animaux

3.2.1. Historique

De nombreuses espèces émettent des sons à caractères plus ou moins informatifs (Bradbury & Vehrencamp 2000; Doupe & Kuhl 1999; Francescoli 2000; Wilson & Hare 2004). Ces sons pourraient relayer différents types d'informations sur l'environnement (détection de prédateur, recherche de nourriture ou de partenaire), sur l'individu lui-même (âge, taille, poids, sexe) ou encore sur son état interne (état émotionnel, reproductif...). Les rats et les souris de laboratoire émettent des vocalisations de type ultrasonore. Ces vocalisations ultrasonores (USVs, « *ultrasonic vocalizations* ») pourraient faire partie des indices environnementaux pris en compte par les animaux pour réaliser leurs choix.

Historiquement, l'émission de ces USVs chez les rongeurs à longterm a été étudié lors de deux grands types de conditions expérimentales :

1) Chez les petits isolés de leurs mères (Scattoni, Gandhi, et al. 2008; Branchi et al. 1998). Comme dans beaucoup d'espèces, les nouveau-nés rongeurs sont aveugles, ils se déplacent très mal, et sont totalement dépendant de leur mère. Durant les premières semaines de vie, ces petits émettent un bon nombre de sons à haute fréquence (Ehret 2005). Ces USVs sont semblables à des cris d'appel qui guident la mère jusqu'aux petits lorsqu'ils s'éloignent du nid (**Figure 21D panneau bas**). Ils sont émis suite à un changement de température corporelle, à un contact avec un adulte, et/ou suite à une manipulation de la part de la mère ou de l'expérimentateur. La plupart des études se concentrent donc sur les relations qui existent entre l'émission de tels sons et leur impact sur le comportement maternel (Branchi et al. 1998; Hahn & Lavooy 2005; Wöhr et al. 2008; Ehret 2005).

2) Chez l'adulte dans différentes conditions aversives ou appétitives (Brudzynski 2007; Burgdorf et al. 2008; Borta et al. 2006; Schwarting et al. 2007; Scattoni et al. 2010; Jamain et al. 2008; Portfors 2007). Chez l'adulte les USVs sont étudiées au sein de très nombreuses conditions, mais le plus souvent l'observation de vocalisations se fait lors de comportements

à orientation sexuelle (Holy & Guo 2005; Hoffmann et al. 2011; Scattoni et al. 2010; Hammerschmidt et al. 2009), ou lors de conditions de stress intense ou d'événements plaisants (Branchi et al. 1998; Ahrens et al. 2009; Burgdorf et al. 2008). En effet, chez le rat Panksepp J. fût l'un des premiers à montrer l'émission de vocalisations lors de comportements de jeux, de chatouilles administrées par l'expérimentateur (Burgdorf et al. 2008; Panksepp 2007; Panksepp & Burgdorf 2000). Chez la souris l'interaction sociale est fréquemment associée à l'émission de vocalisations ultrasonores spécifiques, notamment lors d'interactions femelles-femelles, ou mâles-mâles en l'absence de toute motivation sexuelle (Scattoni et al. 2010; Jamain et al. 2008; Panksepp et al. 2007).

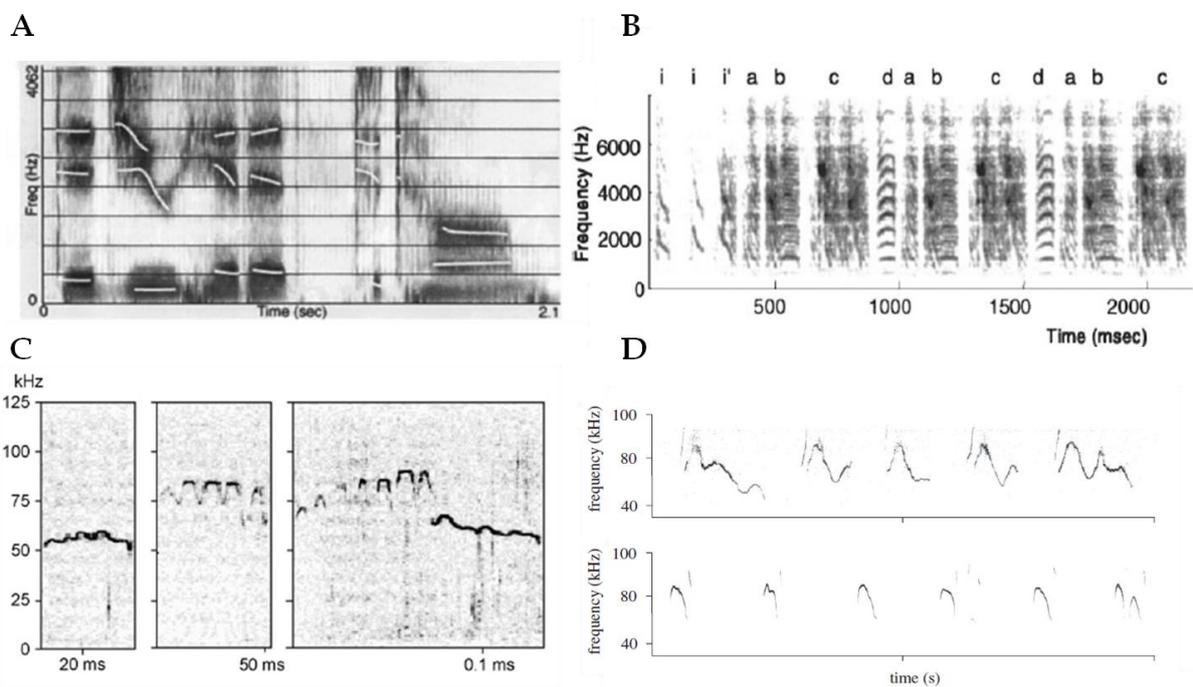


Figure 21: Exemples de sonagrammes de vocalisations émises par (A) les humains (Doupe & Kuhl 1999) (B) par le canarie (Doupe & Kuhl 1999) (C) par les rats (R K W Schwarting et al. 2007) (D) par les mâles en présence de femelles (haut) par les petits isolés de leur mère (bas) (Hammerschmidt et al. 2009).

3.2.2. *Types de vocalisations ultrasonores*

La bande de fréquence à laquelle ces USVs sont émises est relativement haute en fréquence : entre 30 et 110 kHz et donc indiscernables à l'oreille humaine (**Figure 21**). Ces vocalisations peuvent avoir plusieurs formes (détaillées par la suite) en fonctions de critères comme la modulation de fréquence, la durée, la construction ou encore la fréquence moyenne d'émission. Il existe encore aujourd'hui un débat sur la façon de catégoriser ces USVs ; sont-ce des chants (en anglais : *songs*) ? Des appels (en anglais : *calls*) ? Ou simplement des sons ? Globalement cela dépend énormément du contexte, et aucun consensus dans la communauté scientifique n'est atteint à ce jour.

Par exemple, nous avons vu précédemment que chez les rongeurs (rat et souris principalement), les petits émettent des USVs semblables à des cris qui déclenchent un comportement d'approche chez les mères (D'Amato et al. 2005; Smotherman et al. 1974; Noirot 1972). Ce type de vocalisations posséderait les caractéristiques des « calls » ou cris d'appels ; c'est-à-dire des unités de sons continues, distinctes et reproductibles qui peuvent être temporellement isolées d'autres unités par un silence (Doupe & Kuhl 1999). De même, lorsque l'on parle de chants, nos pensées vont immédiatement vers les oiseaux chanteurs, système modèle par excellence de ce domaine. Ainsi, Broughton (Broughton 1963) propose une définition précise d'un chant : « un son d'origine animal, non produit par accident et sans sens », qui contient « une série de notes », généralement plus d'un seul type, produit successivement sous forme de pattern, de façon à former une séquence reconnaissable ou un pattern temporel, » et produit « dans une succession complète de périodes ou de phrases ». Cette définition permet ainsi de distinguer un chant structuré d'une succession aléatoire de vocalisations. Grâce à une analyse spectro-temporelle des vocalisations de mâles chez la souris, Holy & Guo ont montré que dans un **contexte de copulation** les souris mâles produisent des USVs avec toutes les caractéristiques des chants (Holy & Guo 2005). Ces USVs présentent effectivement des répétitions de séquences formant des phrases avec un pattern temporel reconnaissable (**Figure 22A**). De plus ces USVs caractéristiques, que l'on pourrait appeler « *chants de souris* », sont discriminées par les souris femelles, qui les différencient des USVs produit par les petits, et qui répondent au chant par un comportement d'approche (Hammerschmidt et al. 2009).

Il semblerait donc que selon le stade de vie et les conditions environnementales ou contextuelles, les rongeurs soient capables de produire des vocalisations qui

correspondraient à certaines caractéristiques environnementales plus qu'à d'autres. Toutes ces USVs peuvent être séparées en syllabes. Ce sont des unités de sons reproductibles avec des caractéristiques de formes et de structure similaires. Chez le rat la classification des USVs se fait en deux catégories en fonction de la fréquence d'émission : soit 22-kHz, soit 50-kHz (Litvin et al. 2007; Panksepp & Burgdorf 2000; Portfors 2007; Brudzynski & Ociepa 1992; Brudzynski & Pniak 2002). Cette classification fait écho à l'état émotionnel de l'individu. Cette relation sera décrite ci-après en **section 3.3.1**. Cependant, l'hétérogénéité des USVs de 50 kHz chez le rat a poussé certains auteurs à effectuer une classification selon des critères objectifs de fréquence, de durée et de forme (comme chez la souris). C'est le cas avec la classification proposée par J. Wright et collègues qui regroupe 14 classes différentes d'USVs chez le rat (Wright et al. 2010)

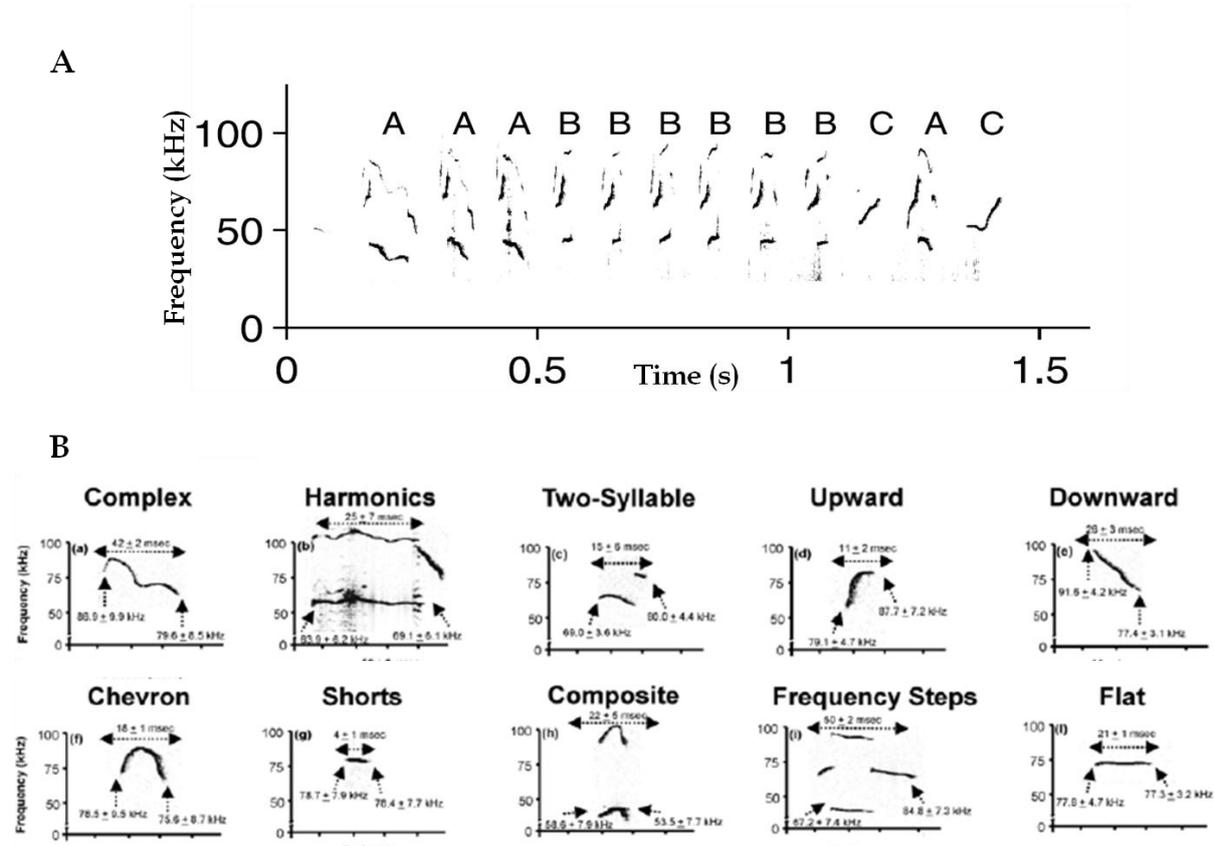


Figure 22: Séquence d'USVs et classification chez la souris. (A) Exemple de « chants de souris » émis par un mâle lors d'un accouplement. (B) Méthodes de classification couramment employée pour classer les USVs de souris (adapté de Scattoni et al. 2010; Holy & Guo 2005).

Chez la souris (adulte ou nouveau-né), les USVs ont été regroupées selon des caractéristiques de forme, de fréquence et de durée. De nombreuses études proposent des méthodes de classification et donc des classes différentes ; et encore aujourd'hui aucune classification universelle n'est retenue pour ranger ses USVs selon ces critères. Il existe cependant une méthode de classification qui regroupe les USVs en fonctions de leurs formes, en considérant des critères de durée, de modulation de fréquence, et de « saut(s) de fréquence(s) » (Scattoni, Gandhi, et al. 2008; Scattoni et al. 2010; Holy & Guo 2005; Wöhr et al. 2011; Wöhr et al. 2008; Panksepp & Lahvis 2007; Jamain et al. 2008). Grâce à cette méthode, environ une dizaine de classes d'USVs différentes émergent et permettent de les classer (**Figure 22B**).

3.3. Utilisation du modèle USVs chez le rongeur

Comme pour n'importe quel modèle, la question de la validité expérimentale est légitime lorsque l'on parle des USVs. De nombreuses espèces émettent des sons, et l'utilité des USVs chez la souris ou le rat répond-t-elle à des critères analogues chez l'Homme ?

Aussi, la question de l'émission et de l'appareil vocal permettant cette émission doit être détaillée. Chez les mammifères l'appareil permettant la production de sons est le larynx. L'organisation ainsi que l'anatomie et l'utilisation de ce larynx s'est très bien conservée au cours de l'évolution (Thomas et al. 2009; Arriaga & Jarvis 2011). Pendant longtemps il était considéré que les rongeurs émettaient deux types de sons : les cris audibles et les ultrasons non audibles pour l'Homme, les premiers étant produits par l'appareil laryngé, les seconds par une espèce de sifflement (L. H. Roberts 1975). Depuis, plusieurs études montrent que le larynx est engagé dans la production d'USVs chez les rongeurs. Des lésions uni et bilatérales des nerfs laryngés (reliant les muscles du larynx aux aires prémotrices) empêchent la production d'USVs chez les souris adultes et les petits (Nunez et al. 1985). De même des études électrophysiologiques ont permis d'observer une décharge des motoneurones parcourant ces nerfs, synchronisée avec l'émission d'USVs chez le rat (Yajima & Hayashi 1983a; Yajima & Hayashi 1983b) mais également chez le macaque (Yajima & Larson 1993). D'autre part il a été montré que la production d'USVs chez les rongeurs apparaît principalement lors des phases d'expiration de l'air, qui, en passant par le larynx fait vibrer les cordes vocales. Chez le rat il existe une forte corrélation entre la durée de l'expiration et la durée des USVs émises (Hegoburu et al. 2011).

3.3.1. Les USVs chez le rat

Comme décrites précédemment, les connaissances accumulées sur l'émission et le ou les rôle(s) des USVs chez les rats sont nombreuses. En effet, il est admis aujourd'hui que les rats émettent deux types de vocalisation différenciables par leur fréquence d'émission et qui sont observées dans des contextes très différents. D'une part, il y a les USVs de 22-kHz, produites dans des contextes aversifs ou dangereux pour l'animal. Ils sont observés en présence de prédateurs (Blanchard et al. 1991) ou lors de la délivrance de chocs électriques (Borta et al. 2006). Ces USVs de 22-kHz sont largement considérées comme étant des cris d'alarme capables d'induire une baisse de réponse comportementale chez les individus qui les entendent (Litvin et al. 2007; Brudzynski & Chiu 1995). D'autre part, il existe des USVs de 50-kHz, qui sont produites dans des contextes émotionnels plus positifs, comme lors des comportements de jeux (Panksepp 2007; Burgdorf et al. 2008), durant des contextes sexuels (N. R. White, Cagiano, Moises, et al. 1990; Brudzynski 2005) ou lors de contextes sociaux (Wright et al. 2010). Ces deux catégories sont relativement bien définies d'un point de vue fréquence et durée. Les 22-kHz sont de longues vocalisations (durée supérieure à 100 ms), et de fréquence constante (généralement autour de 20 -25 kHz, **Figure 23A**). À l'inverse les 50-kHz sont beaucoup plus hétérogènes (**Figure 23B**) et englobent des USVs allant de 30 à 70 kHz avec de nombreuses formes (Brudzynski & Pniak 2002).

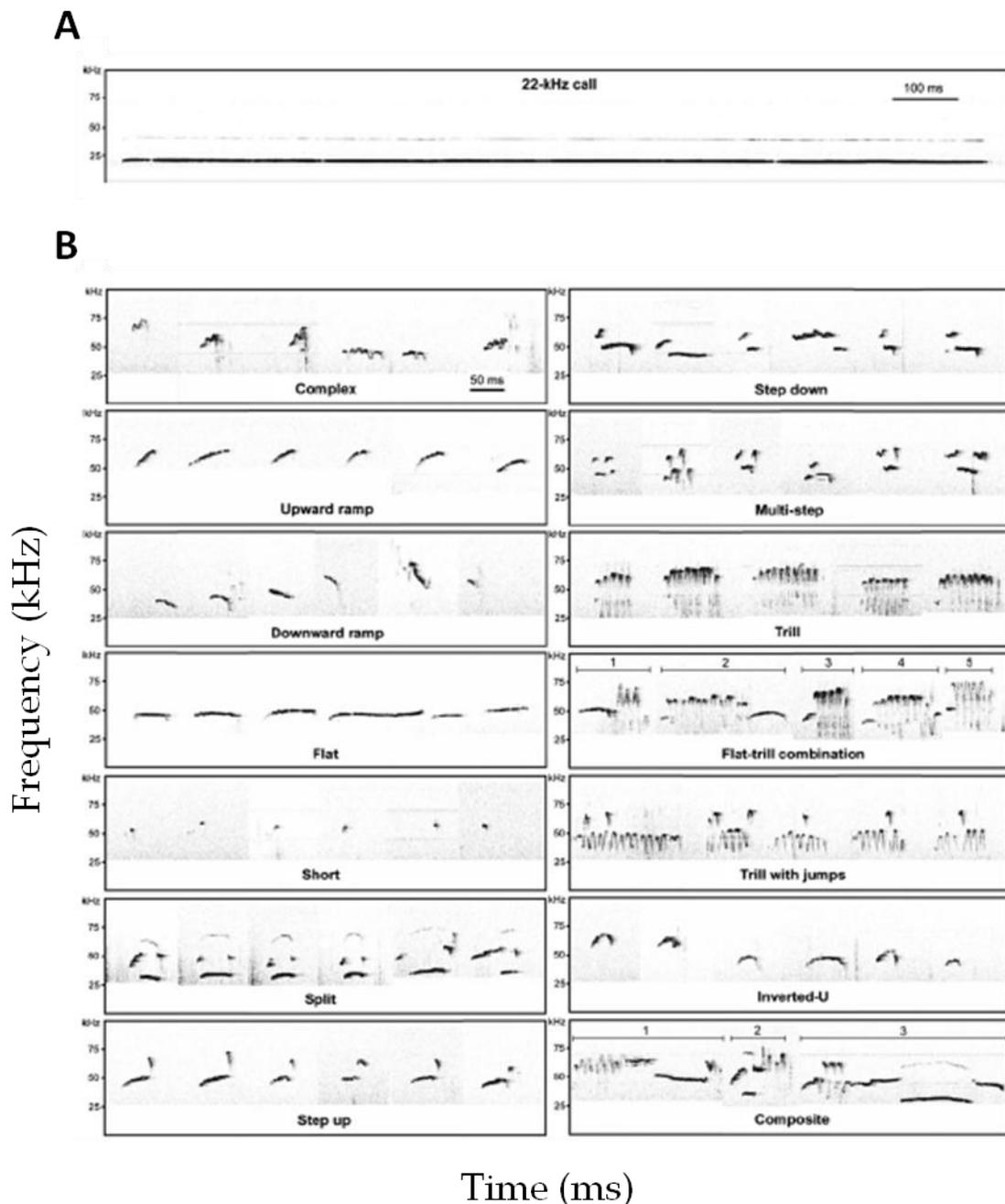


Figure 23: Spectrogramme des vocalisations (A) 22-kHz et (B) 50-kHz de rats. Les vocalisations hautes fréquences sont hétérogènes et regroupent plusieurs sous-groupes d'USVs en fonction de critères de forme, fréquence et de durée (adapté de Wright et al. 2010).

Des données de pharmacologie ont mis en évidence une augmentation, dose dépendante, de la production d'USVs 50-kHz lors d'injections d'amphétamine (activateur du système dopaminergique) par voie intrapéritonéale, systémique, ou directement intracérébrale au sein du NAcc (Wright et al. 2010; Wintink & Brudzynski 2001; Thompson et

al. 2006; Burgdorf et al. 2001). La production d'USVs de 50-kHz peut également être déclenchée par l'injection de Glutamate dans des structures antérieures du cerveau, comme l'aire préoptique hypothalamique (Wintink & Brudzynski 2001). Ces données supposent que cette activation glutamatergique est médiée par le système dopaminergique, car la production d'USVs est stoppée par l'injection d'antagoniste dopaminergique. De la même façon, l'émission d'USVs peut être déclenchée par des injections de carbachol (agoniste cholinergique) au sein du NAcc (Fendt et al. 2006). Sachant que le système cholinergique module massivement le système dopaminergique dans le cerveau (Zhang et al. 2002; Yeomans et al. 2000) l'injection de carbachol dans le NAcc activerait aussi le système dopaminergique au sein du NAcc, activant ainsi le système de récompense. Ces données pharmacologiques sont soutenues par des données électrophysiologiques qui montrent la production d'USVs à la suite de stimulations électriques intracérébrales (BSR) dans la ATV ou l'hypothalamus latéral (Burgdorf et al. 2000). Ainsi, il semblerait que deux systèmes de neurotransmission majeurs (le système cholinergique et dopaminergique) modulent l'émission de ces 2 types d'USVs.

En ce qui concerne les vocalisations de basses fréquences (22-kHz USVs), l'apport bibliographique est moindre. Néanmoins, on trouve des données montrant une production d'USVs à 22-kHz lors d'injections d'agonistes cholinergiques (carbachol) au sein du NTL (Brudzynski 2001; Brudzynski 1994). Selon Brudzynski S. (Brudzynski 2007), l'activation d'une partie du système cholinergique ascendant s'accompagne d'un « état négatif » associé à l'émission d'USVs 22-kHz, tandis que l'activation du système dopaminergique induirait un « état positif » associé au USVs de 50-kHz. Ceci permettant à l'animal de signaler son état interne, en émettant soit l'un soit l'autre type de vocalisation à l'instant « t ». Ainsi, ces bonnes connaissances du comportement vocalisant chez le rat, et la relation qui lie l'état de l'individu et les USVs, font du rat et de ces USVs de bons outils pour tester les effets anxiolytiques, ou anxiogènes de certains composés, ou pour permettre une caractérisation de modèles phénotypiques de dépression (Borta et al. 2006; Schwarting et al. 2007; Wöhr & Schwarting 2009).

3.3.2. *Les USVs chez la souris*

Les souris adultes, comme les rats, émettent des USVs dans un grand nombre de conditions expérimentales, comme des conditions d'accouplement (Scattoni et al. 2010; Holy & Guo 2005; Portfors 2007), des conditions typiquement sociales avec deux individus de

même sexe (Scattoni et al. 2010; Panksepp et al. 2007; Moles et al. 2007), et plus rarement des conditions douloureuses ou stressantes (Williams et al. 2008; Ko et al. 2005). Mais il n'existe pas, comme chez le rat, une dichotomie claire entre deux types d'USVs avec des niveaux de fréquences très différents. Quelques hypothèses suggèrent néanmoins une émission de vocalisations basses fréquences (environ 30 kHz) en situations aversives (Ko et al. 2005) et l'émission de vocalisations hautes fréquences lors d'une injection d'amphétamine par voie intrapéritonéale (Wang et al. 2008). Toutefois, l'importance de l'état émotionnel ou motivationnel de l'individu dans l'émission d'USVs reste très matière à débat (Wang et al. 2008; Moles et al. 2007).

Les études chez la souris présentent un avantage de choix dont ne bénéficient pas les études sur le rat : celui de pouvoir utiliser et générer des souris transgéniques. Grâce à cela, plusieurs acteurs faisant partie du système de production des USVs ont pu être identifiés. C'est le cas du gène FOXP2, dont la mutation est responsable de pertes de langage chez l'humain (Enard et al. 2009; Shu et al. 2005), du récepteur μ -opioïde (Wöhr et al. 2011; Moles et al. 2004), des neuropeptides vasopressine (Scattoni, McFarlane, et al. 2008) et ocytocine (Winslow et al. 2000). Les systèmes sérotoninergiques (El-Khodori et al. 2004), et endocannabinoïdes (Fride et al. 2005) sont également impliqués dans la production d'USVs.

La relative bonne connaissance des USVs chez la souris, et la multiplicité des modèles générés, font des USVs un bon élément phénotypique de caractérisation des modèles souris de syndrome autistique. Ainsi, les USVs sont très utilisées dans la caractérisation de ces modèles. En effet, un des premiers critères de détermination du syndrome autistique chez l'homme est la diminution, le retard, ou l'apparition d'un décalage de langage (DSM-IV 1994). On observe ainsi chez les modèles murins une diminution drastique du nombre d'USVs (Jamain et al. 2008; Scattoni et al. 2010; Scattoni, Gandhi, et al. 2008; Bourgeron et al. 2006; Arakawa et al. 2007).

Partie II : Objectifs de thèse

Objectifs de thèse

Nous avons vu grâce à l'ensemble des données décrites ci-avant, que la flexibilité comportementale est modulée par de nombreux facteurs dont les motivations intrinsèques à l'individu. De nombreux travaux ont montré l'impact de la modification des processus motivationnels, lors d'addictions aux drogues, sur la flexibilité comportementale. En revanche, peu de choses ont été étudiées sur l'implication des motivations dites « naturelles ». La compréhension de l'impact de la valeur de ces états motivationnels est nécessaire lors de prises de décision non adaptées chez l'Homme comme chez l'animal.

Le but de ce travail de thèse est de comprendre **comment les motivations naturelles modulent la flexibilité comportementale chez la souris adulte mâle** ; comment les souris utilisent des informations motivationnelles pour prendre des décisions ? Pour ce faire, j'ai dans un premier temps cherché à **identifier des indices neurobiologiques, puis des indices comportementaux associés au processus de prise de décision dans un contexte social**. Enfin, j'ai étudié **l'effet de la modulation de motivation sur la flexibilité comportementale**. Ce travail de thèse s'articule donc autour de trois grandes questions auxquelles trois chapitres apportent des éléments de réponse:

- Quelle est le réseau spécifiquement impliqué dans la flexibilité comportementale lors de l'interaction sociale?
- Existe-t-il des indices comportementaux pris en compte lors de l'interaction sociale qui renseignent sur l'impact du niveau de motivation sociale?
- Quel est l'effet du conflit motivationnel sur cette flexibilité comportementale ?

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux différents **substrats neurobiologiques impliqués dans la flexibilité comportementale (Chapitre 1)**. Quelle est l'étendue du réseau impliqué lors d'une tâche de flexibilité comportementale, et est-ce que ce réseau est le même chez des animaux présentant des troubles de flexibilité ? Pour cela j'ai étudié l'activation neuronale chez des souris C57BL6/J lors d'une tâche d'interaction sociale. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une **implication différentielle du cortex prélimbique dans la flexibilité comportementale** et sont en partie reporté dans l'**ARTICLE 1**. De plus, grâce à ces données, nous avons pu montrer l'importance de la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotinique à l'acétylcholine au sein du cortex prélimbique et comprendre leurs implications dans le déficit de flexibilité des animaux $\beta 2$ KO (**ARTICLE 1**). Enfin nous avons

comparé l'activation neuronale chez des animaux β 2KO et C57BL6/J, et précisé l'identité des neurones activés grâce à des expériences de double marquage cellulaire.

Le second objectif a été d'identifier des **indices comportementaux associés au processus de prise de décision**. Les souris émettent-elles des vocalisations lors de contextes sociaux ? Ces vocalisations jouent-elles un rôle dans la prise de décision ? Pour répondre à ces questions, nous nous sommes intéressés à la production et la prise en compte de vocalisations, chez les souris C57BL6/J et β 2KO, lors de différents contextes, sociaux ou non. L'étude des vocalisations a d'abord été réalisée au sein de différentes conditions sociales directes, telles que l'interaction sociale et le « labyrinthe 3 chambres », ou indirectes, lors de la présentation d'indices olfactifs (urine de congénères). Ces travaux ont permis de mettre en évidence une émission de vocalisations fortement liée au « degré d'information sociale » disponible, et *a fortiori*, au niveau de flexibilité comportementale requis par l'animal testé. De plus l'enregistrement et l'étude de vocalisations dans des contextes non-sociaux variés a permis de supposer l'existence d'un lien entre production de vocalisation et état motivationnel. Une partie de ces données a fait l'objet d'une publication (**ARTICLE 2**) et de communications orales.

Un troisième objectif de ce travail de thèse a été d'étudier **l'effet de la modulation de la motivation sociale sur la flexibilité comportementale, et l'impact du conflit motivationnel lors du choix entre deux motivations concurrentes (Chapitre 3)**. Pour cela, nous avons dans un premier temps, développé, en collaboration avec une équipe de l'Institut Pasteur, un logiciel d'analyse détaillé et semi-automatique du comportement social. Ces travaux ont donné lieu à une publication à laquelle je suis associé (**ARTICLE 5**). Grâce à cette analyse, nous avons pu mettre en évidence des marqueurs comportementaux relatifs à l'interaction et à la flexibilité. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'importance de la motivation sociale dans l'établissement de contacts sociaux, et dans la mise en place de ces marqueurs de flexibilité. Ces données sont partiellement publiées et réparties dans l'**ARTICLE 2** et dans l'**ARTICLE 3**. Dans un second temps, en nous basant sur les résultats de l'article 3 notamment, nous avons mis en place une tâche de conflit motivationnel dans le labyrinthe à 3 chambres. Ceci nous a permis de poser la question suivante : chez des individus présentant des troubles de la flexibilité comportementale (comme les souris β 2KO), est-ce qu'une mauvaise évaluation des motivations perturbe leur choix ? Ces travaux, notamment, nous ont permis de mettre en évidence la hiérarchie des motivations chez les souris WT et β 2KO, et ont donné lieu à l'écriture de l'**ARTICLE 4** en cours de préparation.

Partie III : Matériels & méthodes

Matériels & méthodes

Les principaux points des matériels & méthodes sont détaillés dans les articles soutenant ce travail de thèse. Toutefois certains éléments feront l'objet d'une description détaillée dans le chapitre suivant.

1. Souris utilisées

Les souris utilisées pour l'intégralité de ce travail de thèse sont des souris mâles C57BL/6J âgés de 8 à 10 semaines (Laboratoire Charles River). Ces souris seront appelées « Wild type » (WT) lorsqu'elles sont comparées à des animaux mutants. Nous avons aussi utilisé des souris mutantes mâles β 2KO (Picciotto et al. 1995) âgés de 8 à 10 semaines (Laboratoire Charles River). Ces souris, créées génétiquement, sont déficientes pour la sous-unité β 2 des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine. Elles ont été croisées sur plus de 20 générations avec des C57BL/6J. Des analyses génomiques (plus de 400 différentes et indépendantes) ont montrées qu'elles ne possèdent pas de différences avec le fond génétique des souris C57BL6/J.

Toutes les souris ont été élevées en cage sociale (4-5 individus par cage) dès réception (15x30 cm), nourries et hydratées *ad libitum*. Les conditions d'animalerie sont standard: pièce maintenue à 20 - 22 °C avec contrôle d'humidité et cycle jour/nuit de 12/12h (lumière à 8h du matin), luminosité à 270 - 300 Lux dans une salle aérées. Certaines souris ont reçu, pour des questions d'expérimentation, un traitement d'élevage ou alimentaire particuliers : ceux-ci seront décrits ci-après dans les sections correspondantes. Les animaux sont toujours traités selon les normes éthiques en vigueur définies par le CNRS pour la santé animale en stricte conformité avec les recommandations CEE n°86/609.

2. Tâche d'interaction sociale (SIT pour « social interaction task »)

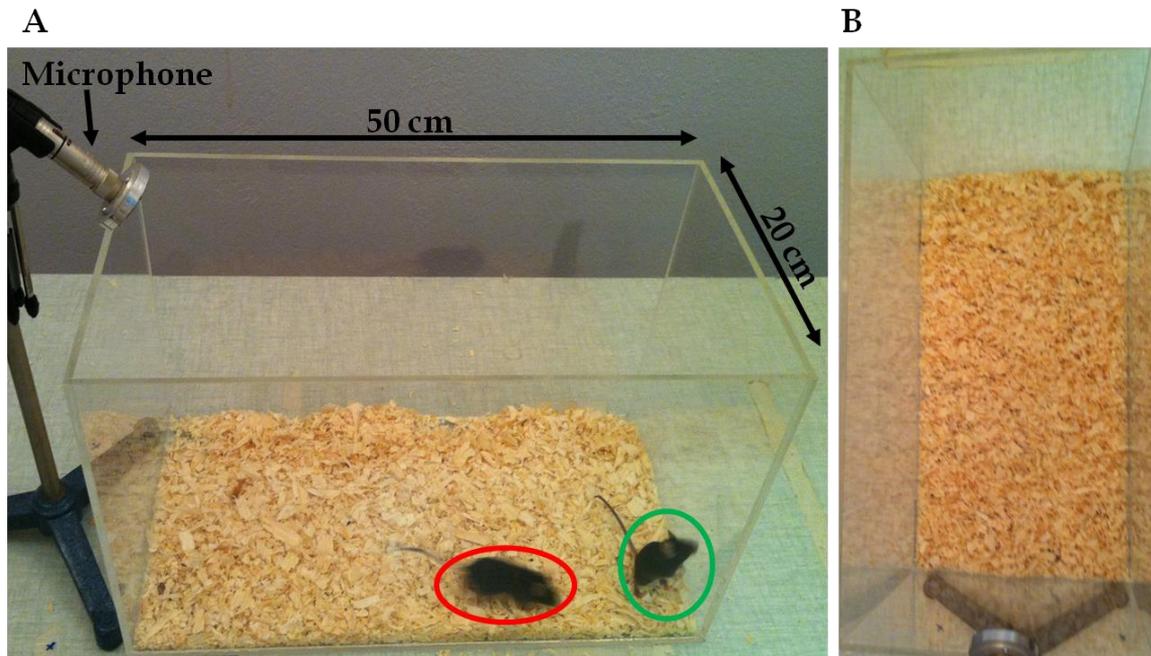


Figure 24: Photos de la cage d'interaction sociale (SIT). (A) Positionnement du micro d'enregistrement et dimensions. (B) Vue de la caméra vidéo d'enregistrement.

Cette tâche consiste à mettre en conflit deux types de motivations très prégnantes chez la souris à l'état naturel : **l'exploration d'un nouvel environnement** et le **contact avec un congénère de même sexe et de même âge** (Granon et al. 2003). Les souris test âgées de 11 à 15 semaines peuvent avoir été isolées ou non durant les 3 semaines précédant l'expérimentation et avoir été ainsi placées en cage individuelle (cage de 15x30 cm). Le jour de l'expérimentation l'intensité lumineuse a été contrôlée et ajustée à 100-110 Lux et de la sciure propre a été disposée au fond de la cage pour chaque souris. La cage d'expérimentation a été placée dans une pièce inconnue et calme. Les animaux sont amenés dans l'environnement 30 minutes avant le début de la tâche. La souris test (rouge sur la **Figure 24**) a été placée seule dans la cage d'interaction sociale (Plexiglas transparent de 50x20 cm) pendant 30 minutes (Habituation), puis une souris mâle inconnu, de même âge, et élevée en cage sociale (4 à 5 individu), appelée « visiteur » (vert), a été placée dans la cage pendant les 8 minutes de la durée du test. L'ensemble de la tâche dure 38 minutes (30 min d'habituation + 8 min d'interaction sociale) et a été filmée par une webcam Hercules® positionnée au dessus et l'analyse des données s'est faite ultérieurement. L'ensemble des expériences comportementales se déroulent de 10h à 17h dans la journée.

3. Interaction avec un nouvel objet

Cette tâche est une variante de la SIT, elle possède exactement les mêmes caractéristiques et le même déroulement temporel; à savoir 30 min d'habituation avant l'introduction d'un nouvel objet dans la cage. L'animal, précédemment isolé durant 3 semaines, est autorisé à explorer ce nouvel objet placé au centre de la cage pendant un temps défini par l'expérimentateur. L'ensemble de la tâche a été filmé par une webcam Hercules ® positionnée au dessus et l'analyse des données s'est faite ultérieurement.

4. Exploration libre d'environnement

Les souris ont simplement été placées dans la même cage que pour l'interaction sociale et peuvent l'explorer librement pendant 30 minutes. De la sciure fraîche a été placée au fond de la cage et a été changée entre chaque souris. De la même façon les souris peuvent avoir été isolées ou non durant les 3 semaines précédant l'expérimentation. L'ensemble de la tâche a été filmé par une webcam Hercules ® positionnée au dessus et l'analyse des données s'est faite ultérieurement.

(motivation sociale) une souris élevée en cage sociale (4 à 5 individus) a été placée sous un pot de plexiglas, ce pot possède de petits trous permettant à la souris de respirer et de passer son museau. Lors de la première session les souris sous le pot ont été habituées pendant 3 sessions de 15 minutes par jour pendant 2 jours. Lors de la deuxième session elles ont été réexposées 15 min la veille de l'expérimentation (**Figure 25**).

Entre chaque essai l'ensemble du dispositif a été nettoyé avec de l'alcool à 60% puis avec de l'eau distillée. Les souris test ont été socialement isolées durant les 3 semaines précédant l'expérimentation en les plaçant en cage individuelle (cage 15x30 cm), et sont nourris *ad libitum* sauf en préparation à la seconde session. De plus pour les deux sessions les souris test ont été habituées à consommer des pellets de sucroses durant les 3 jours précédant l'expérience.

Pour les deux sessions, après la phase d'habituation, les motivations ont été placées dans les chambres opposées, à l'opposé du microphone d'enregistrement des vocalisations. Pour cette phase, la souris test a délicatement été placée dans le compartiment central tandis que l'expérimentateur place les motivations. La localisation (gauche ou droite) de chaque motivation a été alternée entre les sujets.

6. Le stress de contention

Durant cette tâche les souris ont été précédemment socialement isolées. Elles ont ensuite été placées dans un tube (type Falcon ® 50mL) dont l'extrémité a été coupée pour permettre à la souris de respirer. Le tube contenant la souris a ensuite été fixé à une table avec du scotch double face pour éviter qu'il ne roule. L'expérimentation dure 10 minutes ; ensuite la souris a été replacée dans sa cage et le tube changé entre chaque souris.

7. Enregistrement et analyse des vocalisations ultrasonores (USVs)

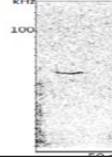
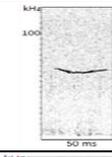
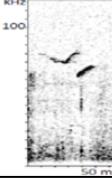
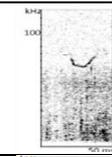
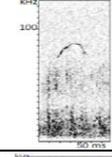
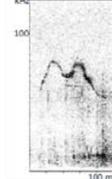
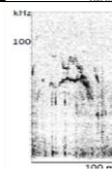
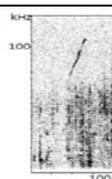
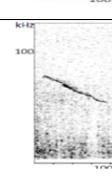
7.1. Enregistrement des sons

Durant L'ensemble des conditions et tâches présentées ci-dessus nous avons enregistré l'émission d'USVs de couples d'animaux (Interaction sociale) ou de la souris test seulement (Exploration & contention). Pour cela un microphone polaroid/CMPA condensé spécifique pour les ultrasons a été placé à proximité des différents dispositifs. Le micro doit être placé

suffisamment haut pour que le cône de détection couvre l'ensemble de la zone concernée, mais suffisamment près car les ultrasons sont très vite absorbés, de part leur propriétés physiques. Ce microphone est connecté à une interface d'enregistrement Ultrasound gate 416H, elle-même reliée à un ordinateur possédant le logiciel d'enregistrement Avisoft® Recorder USGH (fréquence d'échantillonnage : 250 kHz ; FFT-length : 1024 points ; 16 bits). Tous les matériels et les logiciels proviennent d'Avisoft Bioacoustic (Berlin, Allemagne).

7.2. Analyse des sons

Pour toutes les tâches et conditions énumérées l'analyse des vocalisations a été faite *a posteriori* avec le logiciel d'analyse SASLab Pro (Avisoft Bioacoustic®, Berlin, Allemagne). Les spectrogrammes ont été générés selon les paramètres suivants : fréquence d'échantillonnage : 250 kHz ; FFT-length : 1024 points ; 16 bits ; Fenêtre : Blackman ; overlap : 87.5% ; résolution temporelle : 0.512 ms ; fréquence de résolution : 244 Hz). J'ai comptabilisé le nombre total de vocalisations émises par chaque dyade de souris (i.e. pour l'interaction sociale) ou par chaque souris individuellement (i.e. en exploration d'environnement ou stress de contention), et j'ai mesuré manuellement pour chacune des vocalisations émises différentes variables de fréquence (fréquence de début, fréquence de fin, fréquence minimale et fréquence maximale). La classification de chacune des vocalisations est basée sur des critères de durée et de modulation de fréquence (adapté de (Scattoni, Gandhi, et al. 2008; Branchi et al. 1998; Scattoni et al. 2010; Enard et al. 2009)). J'ai ainsi déterminé 10 types de vocalisations (tableau ci-après). Notons que certaines USVs n'ont pu être classées à cause de leur profil incertain (fréquence inférieure à 20kHz, bruit de fond trop important, etc...). Elles ont donc été regroupées dans une catégorie « autres » notée « X », et ne sont à aucun moment prises en compte lors des analyses. Ces vocalisations représentent une minorité sur l'ensemble des USVs enregistrée, et sont équitablement réparties selon les différentes conditions expérimentales.

Vocalisation	Spectrogramme	Durée	Modulation de fréquence (entre min et max)	Description particulière
Short « S »		$2 \leq \Delta d$ $\leq 50 \text{ ms}$	$\leq 10 \text{ kHz}$	unité courte de vocalisations
Flat « F »		$> 50 \text{ ms}$	$\leq 10 \text{ kHz}$	unité longue de vocalisations non modulée
One frequency jump		écart de temps entre les unités $\leq 10 \text{ ms}$	Saut de fréquence	présence d' un seul et unique saut de fréquence
Multiple frequency jumps		écart de temps entre les unités $\leq 10 \text{ ms}$	Saut de fréquence	multiple (≥ 2) sauts de fréquence
U-Shape « U »			$\geq 10 \text{ kHz}$	Symétrie ou peu d'écart entre les deux branches ($\leq 5 \text{ kHz}$)
Chevron « C »			$\geq 10 \text{ kHz}$	
Modulated « M »			$\geq 10 \text{ kHz}$	unité modulée passant au moins 2 fois par le même point de fréquence
Composite « W »			N.D	composée d'au moins 2 éléments émis simultanément
Upward « H »			$\geq 10 \text{ kHz}$	augmentation continue de fréquence
Downward « D »			$\geq 10 \text{ kHz}$	diminution continue de fréquence

8. Modulation de motivations naturelles

Pour certaines conditions expérimentales, nous avons mis en place au sein du laboratoire des variations de protocole de façon à accentuer le conflit de motivation auquel les animaux peuvent être soumis durant certaines tâches. Nous avons notamment utilisé l'isolement social ; cela consiste à isoler ou non l'animal test avant la tâche. En effet ce dernier s'il a été isolé 3 semaines auparavant possède une motivation, *a priori*, plus forte pour l'interaction sociale au détriment de l'exploration de l'environnement nouveau. En laissant cet individu en cage sociale on ne modifie plus sa balance des motivations. Lors de cette thèse j'ai testé, comparé et analysé l'impact de cet isolement sur l'interaction sociale, l'exploration de l'environnement et sur le stress de contention.

Comme décrit précédemment lors du labyrinthe des 3 chambres, la privation de nourriture a également été utilisée comme modulateur de la motivation alimentaire.

9. Enregistrement des réponses auditives du tronc cérébral

Pour enregistrer la réponse auditive du tronc cérébral (en anglais : Auditory Brainstem Response, ABR), les souris (16 C57BL/6J et 14 β 2KO) ont été anesthésiées avec un mélange de kétamine (150mg/Kg) et Xylazine (10mg/Kg) en injection intrapéritonéale. Chaque animal a ensuite été placé sur une couverture chauffante. Les électrodes sous-cutanées ont ensuite été placées à trois points différents : l'électrode de référence a été placée sur le vertex à la surface du crâne, l'électrode de masse a été placée dans le muscle de la cuisse et l'électrode d'enregistrement à proximité de la bulle tympanique à l'arrière de l'oreille, le long de l'os du crâne (Willott 2006). Ensuite un haut parleur a été placé dans l'oreille droite de l'animal, en le dirigeant bien le long du conduit auditif et non en direction du lobe de l'oreille (**Figure 26A**).

Pour chaque souris une série de stimuli audio a été présentée selon l'ordre suivant : un clic (sons de 100 μ s regroupant l'ensemble des fréquences), puis des sons purs de 1, 2, 4, 5, 8, 12, 16, 24 et 32 kHz d'une durée de 10 millisecondes et d'intensité décroissante (de 80dB à 0 dB) en commençant par 80 dB et en diminuant l'intensité par palier de 10 dB si la réponse est bonne (**Figure 26B**).

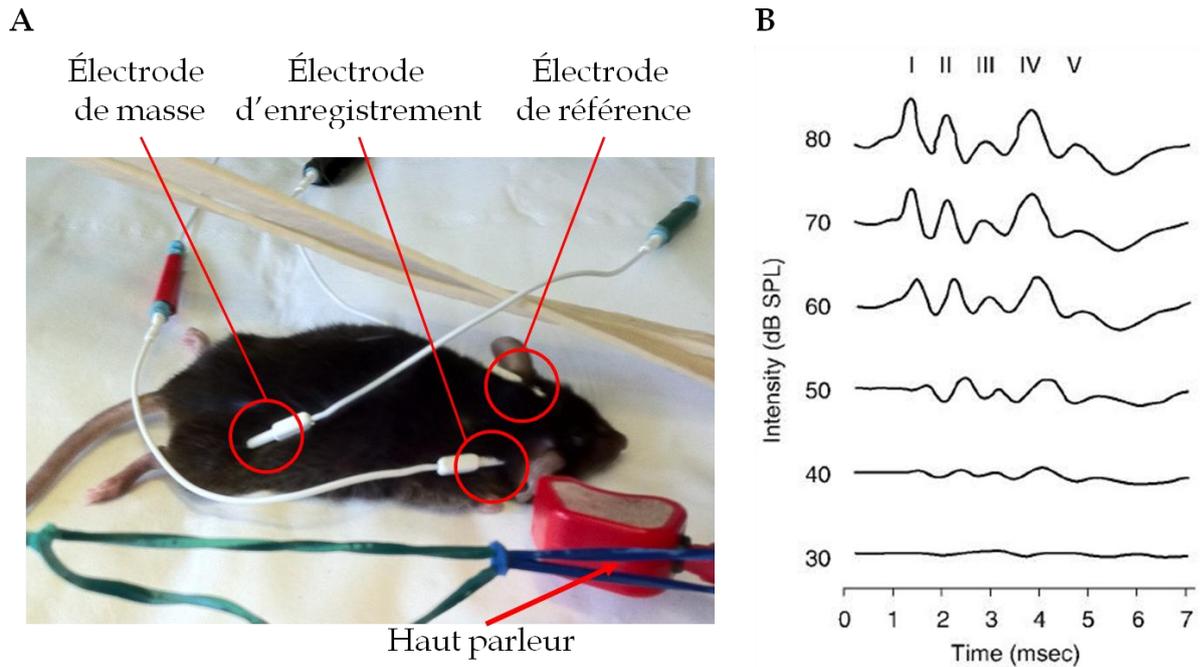


Figure 26: Principe d'enregistrement des réponses auditives du tronc cérébral. (A) Emplacement des électrodes et position de l'animal lors de l'expérimentation (B) Courbe de réponse du tronc cérébral aux stimulations acoustiques (ABR) à différentes intensités. Les différentes ondes d'enregistrement (notées I, II, III, IV, V) représentent la réponse du nerf auditif (pour l'onde I) ainsi que l'activité ascendante dans le mésencéphale auditif (Willott 2006).

Chaque stimulus a été répété quinze fois par secondes de façon à éviter le bruit de fond généré par l'activité cardiaque et respiratoire, lorsqu'environ 500 réponses ont été obtenues, elles ont alors été moyennées. Ceci permet de déterminer le seuil d'audition de l'animal (Gourévitch et al. 2009) comme étant l'intensité qui précède celle à laquelle aucune onde auditive n'apparaît en réponse au stimulus, avec une précision de 5 dB SPL⁸. L'ensemble de ces enregistrements a été réalisé avec le logiciel Centor USB (DELTAMED) en collaboration avec le J-M Edeline.

⁸ : Le dB **SPL** (ou décibel Sound pressure level) est l'unité de mesure utilisée en acoustique, définie par le rapport de la puissance par unité de surface du son que l'on mesure et une puissance par unité de surface de référence (20 μ Pa).

10. Histologie & marquages cellulaires

Les gènes immédiats précoces, aussi appelé IEG (en anglais : *Immediat Early Gene*), sont des gènes qui s'activent très tôt à la suite de l'activation cellulaire. La transcription de ces gènes est rapide (e.g. pour *c-fos*, 1h30 environ pour atteindre 100% de l'activation qui ne dure que 2 heures), transitoire (Bisler et al. 2002). De plus, il a été montré que ces gènes immédiats précoces jouent un rôle dans des modifications neuronales à long terme, tels que les mécanismes de plasticité synaptique ou la formation de la mémoire. Ils existent de nombreux gènes immédiats précoces et parmi les plus étudiés se trouvent; *c-fos*, *JunB*, *Krox-24*, *ICER*. La plupart de ces gènes immédiats précoces (*c-fos* et *Krox-24* par exemple) représente la famille des facteurs de transcriptions nucléaires qui agissent en messagers tertiaires dans des voies de transduction du signal. Le gène immédiat précoce *c-fos* produit une protéine, appelée c-Fos, de 380 acides aminés qui est un facteur de transcription. La protéine c-Fos, peut se dimériser avec la protéine c-Jun (*c-jun*) et former le complexe transcriptionnel AP-1. Ce complexe transcriptionnel reconnaît précisément la séquence de nucléotides TGACTC. L'expression de c-Fos est, en plus d'être transitoire et rapide, ubiquitaire; ce qui fait de la protéine c-fos un marqueur de l'activité générale très utilisé, notamment grâce à l'**immunohistochimie** qui met en évidence la présence de la protéine dans les noyaux des cellules (Kohut et al. 2009; Herrera & Robertson 1996; Matsuo et al. 2009; Kobelt et al. 2004; Kovács 2008). Nous avons utilisé ce marquage chez des animaux WT (n=27) et β 2KO (n=22).

10.1. Plan expérimental

Pour chacune des expériences trois groupes indépendants ont été formés ; le groupe « social » (interaction avec un congénère), le groupe « nouvel objet », et le groupe « contrôle ». Le déroulement du plan expérimental pour chacun de ces groupes est présenté sur le schéma suivant :

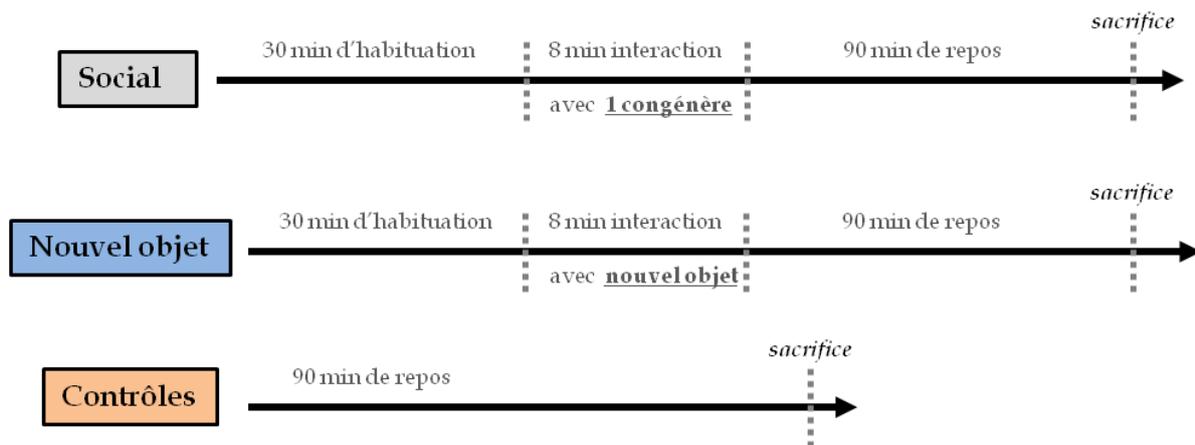


Figure 27: Plan expérimental précédant l'obtention des coupes pour l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence. Trois groupes sont formés, « social », « nouvel objet », et « contrôles ». Les deux premiers subissent 30 min d'habituation avant 8 min d'interaction soit avec un congénère inconnu soit avec un nouvel objet. A la suite de ces 8 min ils sont replacés dans leurs cages de vie respectives pendant 90 min en attendant leur sacrifice. Le groupe « contrôle » lui ne subit aucune interaction, il est simplement sacrifié après 90 min.

10.2. Obtention des coupes flottantes

A la suite du protocole expérimental, les souris ont été sacrifiées avec 0,5ml de Pentobarbital Sodique. Elles ont ensuite été perfusées en intracardiaque d'abord avec du PBS 1X pour évacuer tout le sang (pendant 5 minutes), puis avec de la PFA 4% (40ml de PFA en 10min.). Une fois perfusé, le cerveau a été prélevé avec précaution et stocké dans de la PFA 4% toute la nuit. Les coupes d'une épaisseur de 70 μ m ont été réalisées au vibratome, et elles ont été récupérées en coupes flottantes dans du PBS 1X en attendant l'immunohistochimie.

10.3. Immunohistochimie (marquage c-Fos)

Les coupes (pots X) ont été exposées au principe général de l'immunohistochimie présenté dans la **Figure 28**. La réaction colorimétrique servant de marquage est une réaction d'oxydation de la 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochlorique (DAB) amorcée par l'ajout d'eau oxygénée (H₂O₂) dans le milieu d'incubation sous agitation. Dès que la coloration atteint le seuil jugé satisfaisant, la réaction est stoppée par ajout d'un grand volume de Tris-HCL.

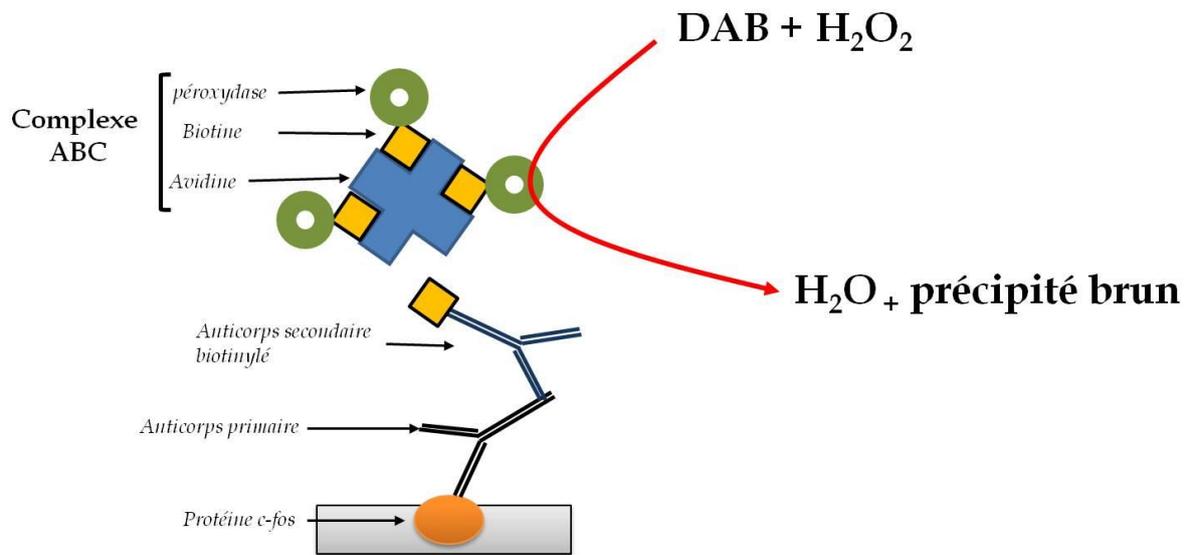


Figure 28: Principe de détection d'une protéine (ici c-fos) par immunohistochimie basée sur la réaction d'oxydation de la DAB.

Un pot « contrôle », noté pot 0, a été constitué de 5-6 coupes à chaque fois. Il a servi à vérifier l'absence de marquage non spécifique en exposant les coupes uniquement à l'anticorps secondaire sans l'anticorps primaire (**Figure 29**).

10.4. Montage et séchage des coupes

Suite à l'immunocytochimie, les coupes ont été montées sur des lames SUPERFROST® à l'aide d'un pinceau. Ensuite, elles ont été déshydratées dans des bains successifs d'eau et d'alcool (eau distillée, 50% EtOH, 75% EtOH, 90% EtOH, 100% EtOH, Xylène), avant d'être montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

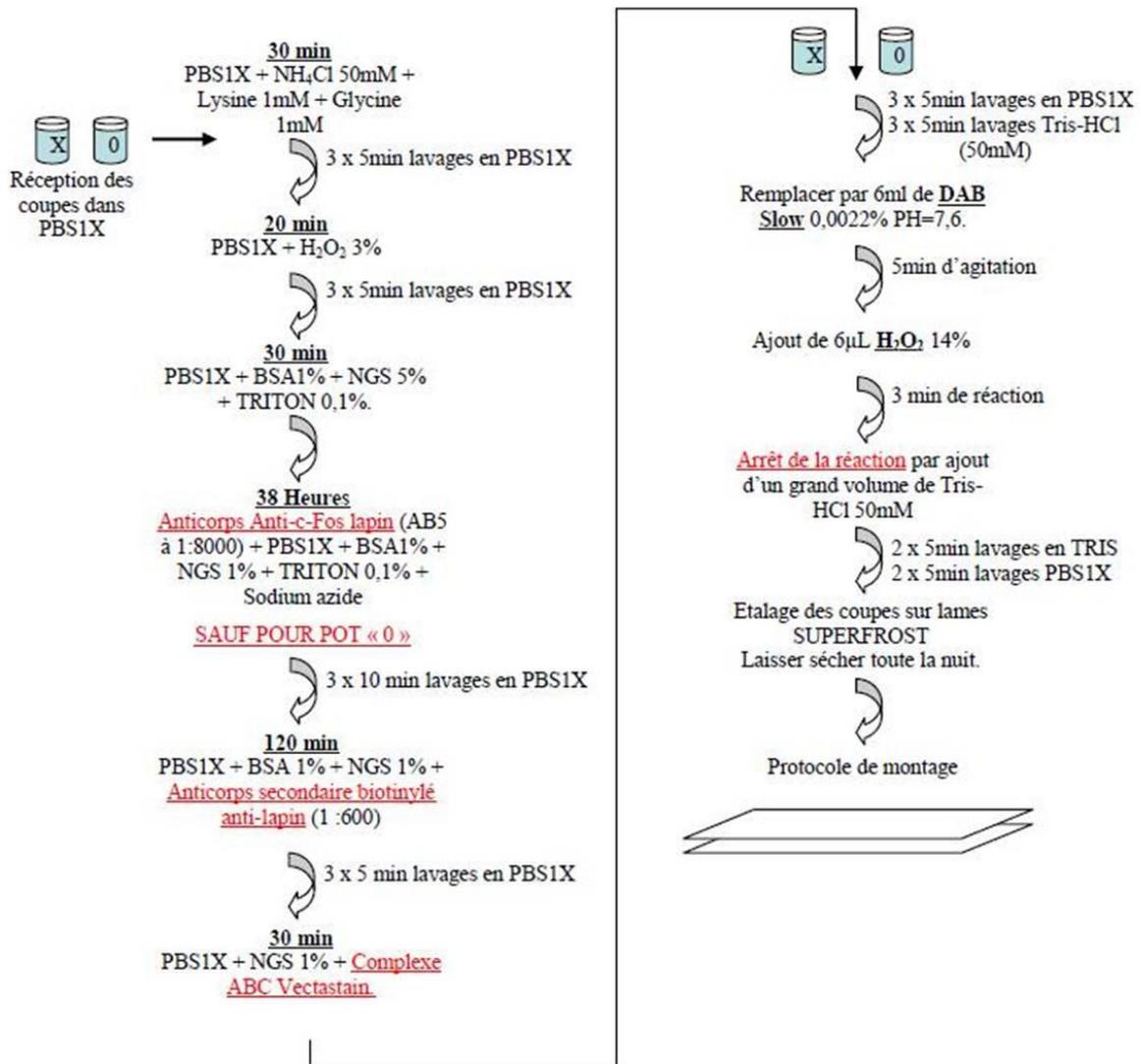


Figure 29: Diagramme chronologique des différentes étapes d'immunohistochimie utilisée pour marquer la protéine c-Fos.

10.5. Structures d'intérêts

Les structures d'intérêts dans lesquelles le marquage Fos a été évalué sont représentées sur la **Figure 30**. Ces structures ont été choisies car elles font partie des réseaux fronto-striataux connus pour être impliqués dans les processus de prise de décision.

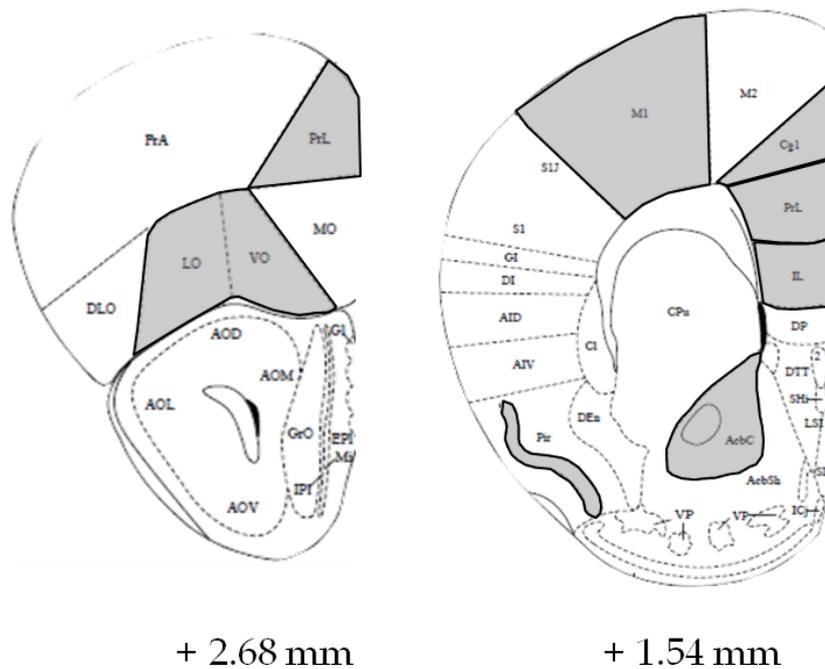


Figure 30: Section coronales schématisques du cerveau de souris représentant les zones d'intérêts (adapté de (Paxinos & Franklin 2001)). Les structures d'intérêt se trouvent à deux niveaux : +2.68mm du Bregma: PrL : cortex prélimbique Rostral, LOVO : cortex orbitofrontal latéral et ventral, et à +1.54 mm du Bregma : M1 : cortex moteur primaire, Cg1 : cortex cingulaire, PrL : cortex prélimbique médian, IL : cortex infralimbique, AcbC : Noyau Accumbens, Pir : cortex piriforme.

10.6. Imagerie quantitative régionale d'expression de c-Fos

Une fois les lames obtenues, des photos au grossissement (x10) ont été prises sur le logiciel Mercator ® grâce à la plateforme d'acquisition d'image du C.N.P.S (Centre de Neurosciences Paris Sud), la plateforme de comptage de point ICY, développée par Fabrice De Chaumont de l'Institut Pasteur (Olivo-Marin 2002) a servi à l'analyse quantitative des images pour quantifier le nombre de neurones marqués par l'anticorps anti-c-Fos dans une région donnée. Ce logiciel détecte la taille des points ainsi que leur niveau de contraste avec

le fond de l'image pris en référence. La détermination du seuil utilisé pour l'ensemble des comptages a été faite empiriquement en choisissant la valeur permettant d'avoir la plus grande différence entre une zone activée et une zone non activée. Ce seuil est fixe pour la totalité des images quantifiées.

11. Analyses statistiques

De manière générale nous avons décidé d'utiliser des tests statistiques non paramétriques lorsque cela a été possible (effectifs <30 animaux/groupe). Les comparaisons *post-hoc* deux à deux ont été faite soit avec un test de rang de Wilcoxon (variables dépendantes), soit avec un test U de Mann-Whitney (variables indépendantes). Pour plus de clarté, l'ensemble des tests utilisés seront détaillés au fur et à mesure lors de la présentation des résultats.

*Partie IV : Résultats expérimentaux &
articles*

Chapitre 1

Résultats & Articles

Chapitre 1: Substrats neurobiologiques impliqués dans la flexibilité comportementale.

Données: dans cette partie la majorité des données sont issues de l'ARTICLE 1, cependant elle inclue également des **données non publiées** (en cours de préparation).

De nombreuses études comportementales sont faites chez la souris pour étudier les substrats neurobiologiques impliqués dans la flexibilité comportementale. Depuis une vingtaine d'année, l'utilisation de modèles souris avec des déficits de flexibilité, comme les souris $\beta 2$ KO (Picciotto et al. 1995), a permis de mettre en évidence l'importance des récepteurs nicotiques à l'Acétylcholine (nAChRs) au sein de ces processus lors de conflits de motivation, et notamment lors d'une interaction sociale (Granon et al. 2003). Il est connu que l'établissement de comportements flexibles implique de nombreuses structures sous-corticales et corticales en particulier le CPF (Granon & Poucet 1995; Vertes 2006; Granon & J-P Changeux 2011). Cependant, la localisation précise des aires corticales impliquées, permettant de répondre à la question de l'implication régionale des récepteurs nicotiques, reste inexplorée.

Ainsi, le but de ce chapitre a été de déterminer **quelles sont les régions spécifiquement impliquées lors de l'interaction sociale avec un nouveau congénère chez les souris C57BL6/J. Et quelle(s) est (sont) l' (les) implication(s) des nAChRs lors de cette tâche.**

1.1. L'interaction sociale : balance fine entre deux motivations

a. Mise en place de la tâche d'interaction sociale

Dans un premier temps nous avons reproduit et codifié de façon plus précise la tâche d'interaction sociale (SIT pour « social interaction task ») permettant d'objectiver la balance (précise et fine) entre deux motivations : l'exploration de l'environnement et l'exploration d'un congénère. Pour cela nous avons testé plusieurs protocoles de SIT en jouant sur les paramètres d'isolement social et d'habituation à l'environnement. Trois conditions ont été testées : **condition 1** (animaux isolés, et non habitués à l'environnement), **condition 2** (animaux non isolés, et habitués à l'environnement pendant 30 minutes), **condition 3** (animaux isolés et habitués).

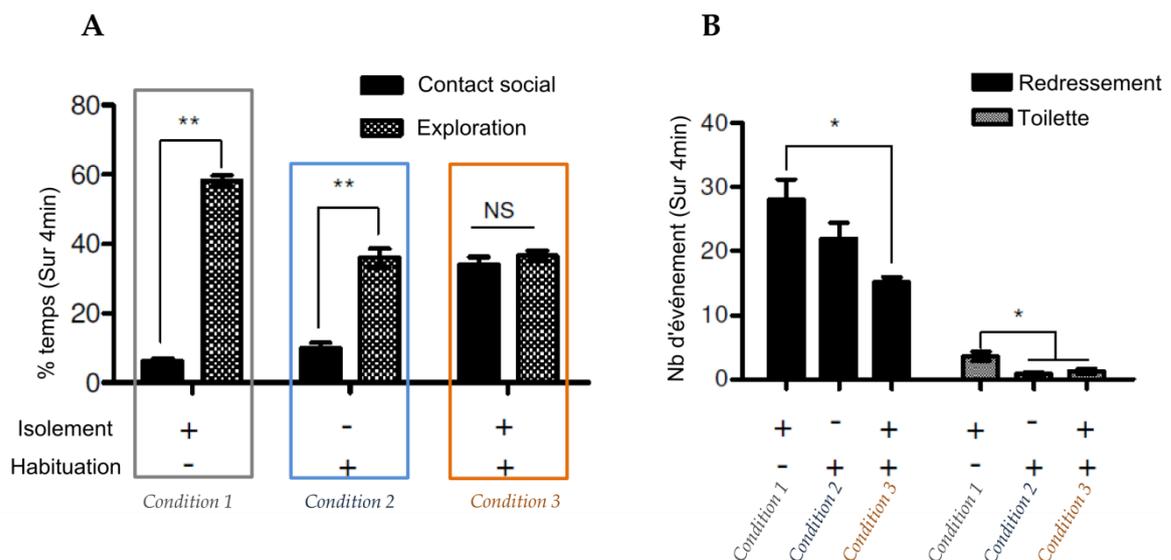


Figure 31: Figure supplémentaire 1 de l'article 1 : Effet de l'isolement et de l'habituation sur le temps de contact social et sur l'exploration. (A) pourcentage de temps passé en contact social ou en exploration de l'environnement dans chacune des trois conditions. (B) Nombre de redressement ou de toilette durant les 4 minutes de test. Condition1, n=7 ; condition 2, n=9, condition 3, n=16. Les données sont présentées en moyenne \pm sem, et *P<0.05, **P<0.01.

Comme présenté dans la **Figure 31**, nous avons observé que pour les animaux de la condition 1 et 2, le temps dédié à l'interaction sociale est beaucoup plus faible que le temps d'exploration (ANOVA interaction $F_{(2,50)} = 78.02$; $p < 0.001$; test de Bonferroni *post-hoc* condition 1 et condition 2: $P < 0.001$). En effet le temps d'interaction sociale représente $6.40 \pm 1.6\%$ en condition 1 et $10 \pm 0.7\%$ en condition 2, alors que le temps d'exploration représente $58 \pm 15\%$ en condition 1 et $35.93 \pm 2.88\%$ en condition 2. Il n'y a que lors de la condition 3, où les animaux sont à la fois isolés et habitués à l'environnement, que les temps d'interaction et d'exploration sont équivalents, respectivement $37.16 \pm 2.90\%$ et $35.42 \pm 1.51\%$ (**Figure 31A**, test de Bonferroni *Post-hoc*, $P = N.S.$). Dans cette condition 3, les nombres de redressement associés à l'exploration d'environnement et de comportement de toilettage sont très diminués vis-à-vis de la condition 1 (ANOVA 1, $p < 0.05$, test de Tukey *post-hoc*: $*p < 0.05$). Aux vues de ces résultats, et de façon à obtenir un bon équilibre entre la mise en place de contact sociaux et l'exploration, la condition d'interaction sociale (dite SIT) « classique » sera représentée par la condition 3 et sera renommée *SIT-isolé*.

b. Interaction sociale et souris $\beta 2KO$

De façon à étudier l'implication des nAChRs* $\beta 2$ lors de l'interaction sociale, des animaux $\beta 2KO$ ont été testés dans cette condition de *SIT-isolé*, et nous avons quantifié plusieurs critères principaux : le temps de contact, le nombre d'approches, le nombre de poursuites (**Figure 32**).

Les animaux $\beta 2KO$ passent plus de temps au contact du congénère que chez les souris contrôles (WT : $37.9 \pm 5.9\%$, $\beta 2KO$: $52 \pm 3.2\%$; $P = 0.01$; **Figure 32A**). Nous avons également observé chez ces animaux, une forte diminution du temps passé à l'exploration de l'environnement (WT : $35.4 \pm 2.8\%$; $\beta 2KO$: $23.5 \pm 2.2\%$; $P = 0.001$), ainsi qu'une diminution du nombre de comportements d'exploration de redressement (données non montrées, WT : 16.14 ± 2 ; $\beta 2KO$: 9 ± 1.8 ; $P = 0.01$). L'analyse détaillée des séquences comportementales (**Figure 32B**) montre que les souris $\beta 2KO$ effectuent plus d'approches (IA, $P = 0.01$), ainsi que plus de poursuites du congénère (IA-VE-IP, $P < 0.001$). A l'inverse, le nombre d'approches initiées par le congénère visiteur est plus élevé chez les WT que chez les $\beta 2KO$ (VA, $P = 0.001$). L'augmentation du temps de contact observé chez les animaux $\beta 2KO$, est probablement due à l'augmentation du nombre d'approche de l'individu isolé.

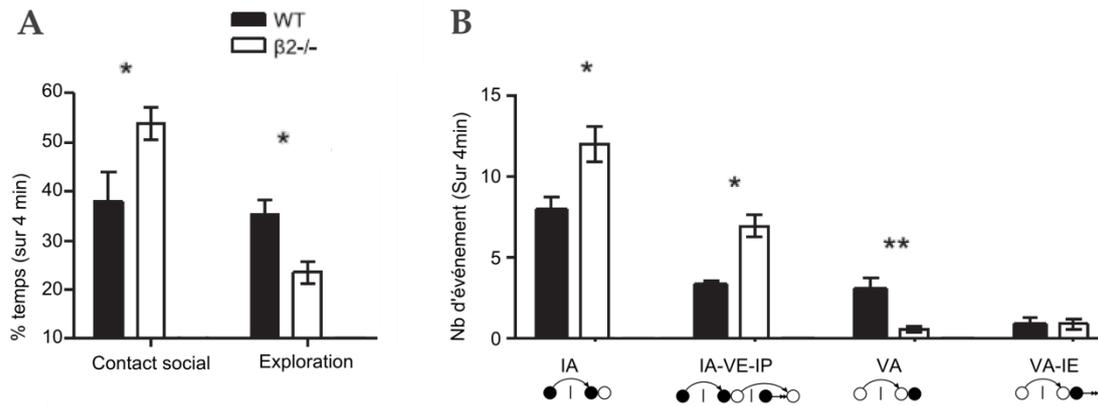


Figure 32: Comportement social des souris $\beta 2$ KO et C57BL6/J (WT) en SIT-isolé (A) Temps de contact social et d'exploration sur les 4 premières minutes d'interaction sociale. **(B)** Nombre d'approches du résident (IA), nombre de poursuites initiées par le résident (IA-VE-IP), nombre d'approches du visiteur (VA), et le nombre d'échappements du résident (VA-IE). WT, n=7 ; $\beta 2^{-/-}$ ($\beta 2$ KO), n=11. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P < 0.05$ pour ANOVA avec test *post-hoc* de Fischer.

Un groupe indépendant d'animaux $\beta 2$ KO a également été testé en condition 2 (SIT-groupé), c'est-à-dire non isolés mais avec habituation. Nous avons donc analysé leur comportement social lorsqu'ils ne sont pas en conflit motivationnel (**Figure 33A**). Les résultats montrent que les animaux passent autant de temps que les WT en contact social (WT : 24.16 ± 3.3 % ; $\beta 2$ KO : 30.6 ± 4.64 % ; test t-student : $t = 1.22$, $P = 0.24$). De même, aucune différence n'est observée pour le taux de poursuites initiées par l'individu résident ($t = 1.20$, $P = 0.24$). Lorsque nous analysons les séquences comportementales associées (**Figure 33B**), aucune différence significative n'est présente entre les animaux WT et $\beta 2$ KO pour le nombre d'approches du résident (IA : $t = 0.17$, $P = 0.86$), le nombre de poursuites initiées par le résident (IA-VE-IP : $t = 1.09$, $P = 0.29$), le nombre d'approches du visiteur (VA : $t = 0.28$, $P = 0.77$), ainsi que le nombre d'échappements du résident (VE : $t = -0.50$, $P = 0.62$).

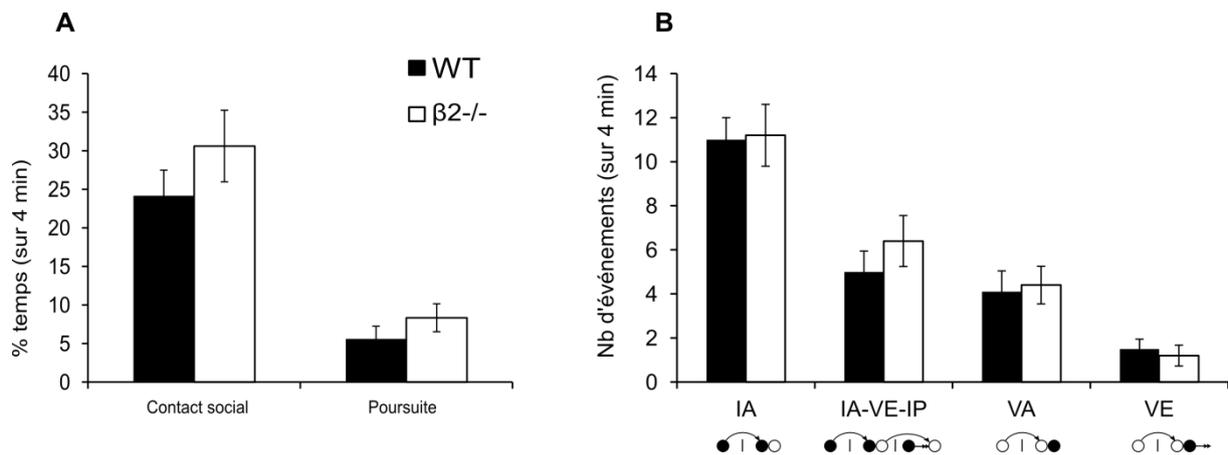


Figure 33: Comportement social des souris $\beta 2$ KO et C57BL6/J (WT) en condition non isolés mais avec habituation (A) Temps de contact social et d'exploration sur les 4 premières minutes d'interaction sociale. **(B)** Nombre d'approches du résident (IA), nombre de poursuites initiées par le résident (IA-VE-IP), nombre d'approches du visiteur (VA), et le nombre d'échappements du résident (VA-IE). WT, n=7 ; $\beta 2^{-/-}$ ($\beta 2$ KO), n=11. Les données sont présentées en moyenne \pm sem.

1.2. Activations spécifiques de substrats neurobiologiques

L'objectif de cette approche a été de déterminer l'étendue du réseau impliqué lors de l'interaction sociale. Pour cela, trois groupes d'animaux ont été formés : les **résidents sociaux** (animaux ayant fait la SIT en tant qu'animal test), les **résidents objets** (animaux qui ont fait une interaction avec un nouvel objet), et les contrôles (animaux ayant été isolés mais ne subissant aucune tâche, cf. **Matériels et méthodes, section 10.3**) ; l'activation de la protéine c-Fos a été quantifiée par immunohistochimie.

a. Activation neuronale après interaction sociale chez WT

Les résultats de la **Figure 34** montrent l'analyse du nombre de cellules marquées pour la protéine c-Fos. Cette activité (en nombre de points marqués par millimètre carré) a été réalisée au sein de plusieurs structures d'intérêts. Ainsi nous avons observé que dans les structures suivantes: Cortex orbitofrontal (LO/VO), le cortex prélimbique rostral (PrL rostral), le cortex infralimbique (IL), le cortex cingulaire (Cing), et le noyau accumbens (NAcc), les animaux des deux groupes « résident social » et « nouvel objet » présentent un niveau d'activation de cellules c-Fos positives nettement supérieur à celui des animaux du

groupe « contrôle » (**Figure 34B** : ANOVA 1 voie pour chaque structure $p < 0.001$ suivie de test *post-hoc* de Bonferroni). De plus, au sein de ces mêmes structures, les groupes « résident social » et « nouvel objet » possèdent un niveau d'activation identique entre eux.

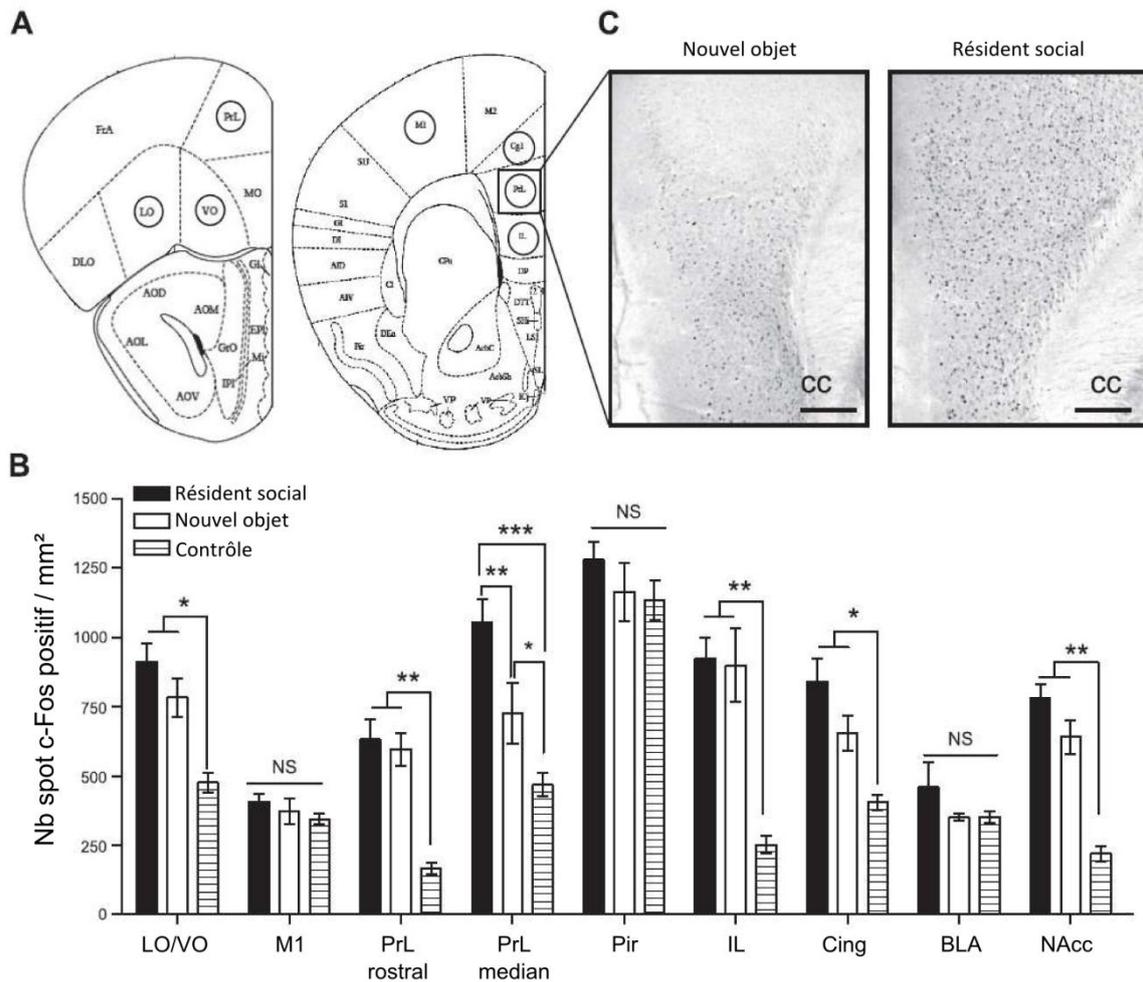


Figure 34: Niveau d'activation c-Fos après interaction sociale chez les animaux WT. (A) représentation schématique des deux niveaux de quantifications utilisés pour les structures (coordonnées antéro postérieures suivantes : gauche AP : +2.8 ; droite : +1.54mm du Bregma). Pour le cortex prélimbique, c-Fos a été quantifié à la fois au niveau rostral (gauche) et médian (droite). (B) Quantification du marquage c-Fos au sein des différentes aires. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm sem., avec résident social (n=10) ; nouvel objet (n=7) ; contrôles (n=10). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ pour les tests *post-hoc* de Bonferroni. (C) Photos représentatives des marquages obtenus au sein des deux groupes. CC, corps calleux. Barre d'échelle = 150 μ m.

En revanche, au sein du cortex prélimbique médian (PrL médian), nous avons observé que les souris en contact avec un congénère (groupe résident social) montrent une activation plus importante d'environ 45%, que les souris en présence d'un nouvel objet ($F_{(2,24)} = 16.27$, $p < 0.0001$, post-hoc test congénère social x nouvel objet, $p < 0.001$). Cette différence spécifique entre les groupes « résident social » et « nouvel objet » n'est observé qu'au sein de cette structure. Les autres structures d'intérêt, comme le cortex moteur primaire (M1), le cortex piriforme (Pir), ou encore l'amygdale (BLA), ne montrent aucune différence significative entre les groupes.

b. Activation neuronale après interaction sociale chez $\beta 2KO$

La même approche a été conduite chez des animaux $\beta 2KO$, de façon à étudier le profil d'activation de ces structures, à la fois corticales et sous corticales, dans l'interaction sociale. Pour cela les trois mêmes groupes sont étudiés : résident social, nouvel objet, et contrôle.

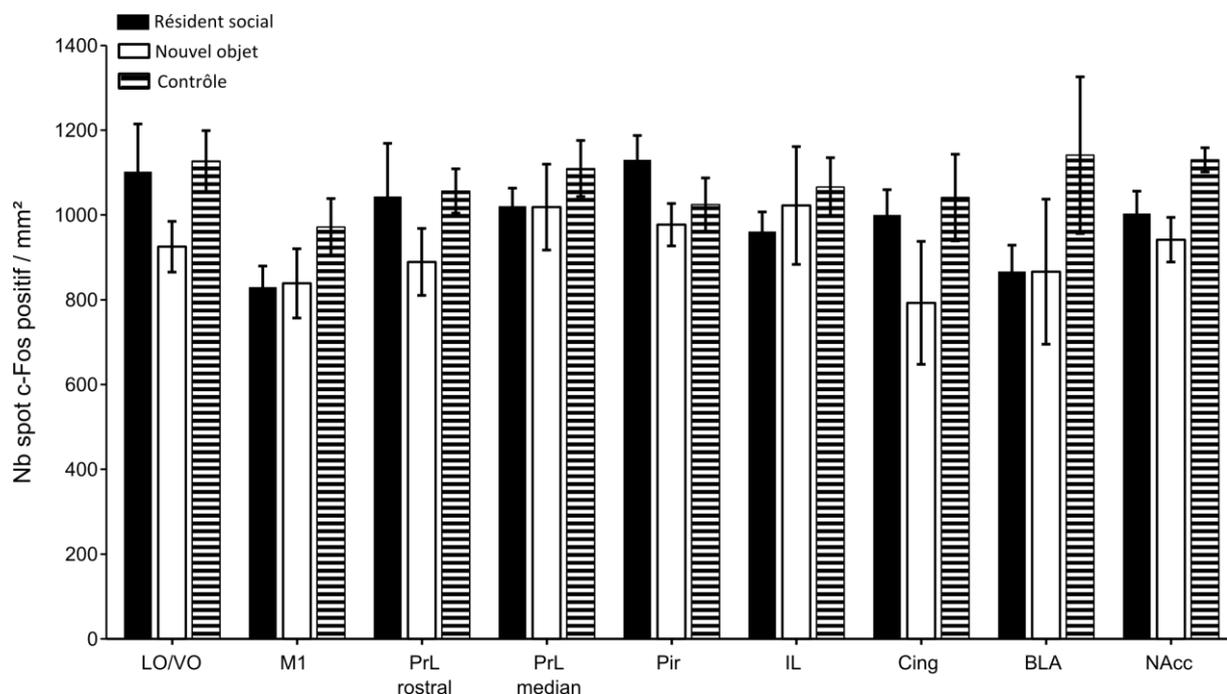


Figure 35: Niveau d'activation c-Fos après interaction sociale chez les animaux $\beta 2KO$. Quantification du marquage c-Fos au sein de différentes aires. Les valeurs sont représentées en moyenne \pm sem., avec résident social (n=8) ; nouvel objet (n=8) ; contrôles (n=6).

Nous avons observé qu'à l'inverse de ce que nous avons pu montrer chez les animaux WT, l'activation de cellules c-Fos positives chez les souris β 2KO ne montre aucune différence significative entre les groupes pour les différentes structures étudiées (LO/VO : $F_{(2,18)}=1.79$, $P=0.19$; M1: $F_{(2,18)}=1.24$, $P=0.31$; PrL rostral: $F_{(2,18)}=1.01$, $P=0.38$; PrL médian : $F_{(2,18)}=0.42$, $P=0.66$; Pir : $F_{(2,18)}=2.52$, $P=0.10$; IL : $F_{(2,18)}=0.28$, $P=0.75$; Cing : $F_{(2,18)}=1.65$, $P=0.21$; BLA : $F_{(2,18)}=1.19$, $P=0.32$; NAcc : $F_{(2,18)}=3.46$, $P=0.053$). Cette absence d'activation est probablement due à un niveau d'activation très élevé des animaux du groupe contrôle, mais malgré cela, il n'existe aucune différence entre les animaux du groupe « résident social » et ceux du groupe « nouvel objet ».

1.3. Phénotype « prélimbique » des souris β 2KO

Pour préciser le rôle des structures préfrontales dans la SIT, nous avons effectué des lésions spécifiques de deux régions avec une neurotoxine (NMDA), le PrL et le COF chez des animaux C57BL6/J.

a. Lésion du cortex prélimbique chez la souris

Les lésions spécifiques du cortex prélimbique n'affectent pas les régions adjacentes (**Figure 36A**). De plus les animaux contrôles (« sham ») ayant subi une injection de solution saline, ne montrent pas de traces de lésion contrairement aux animaux lésés. Nous pouvons observer la présence de noyaux cellulaires picnotiques, plus petits que ceux présents chez les contrôles au même niveau, synonymes d'une dégénérescence des neurones après injections de la neurotoxine.

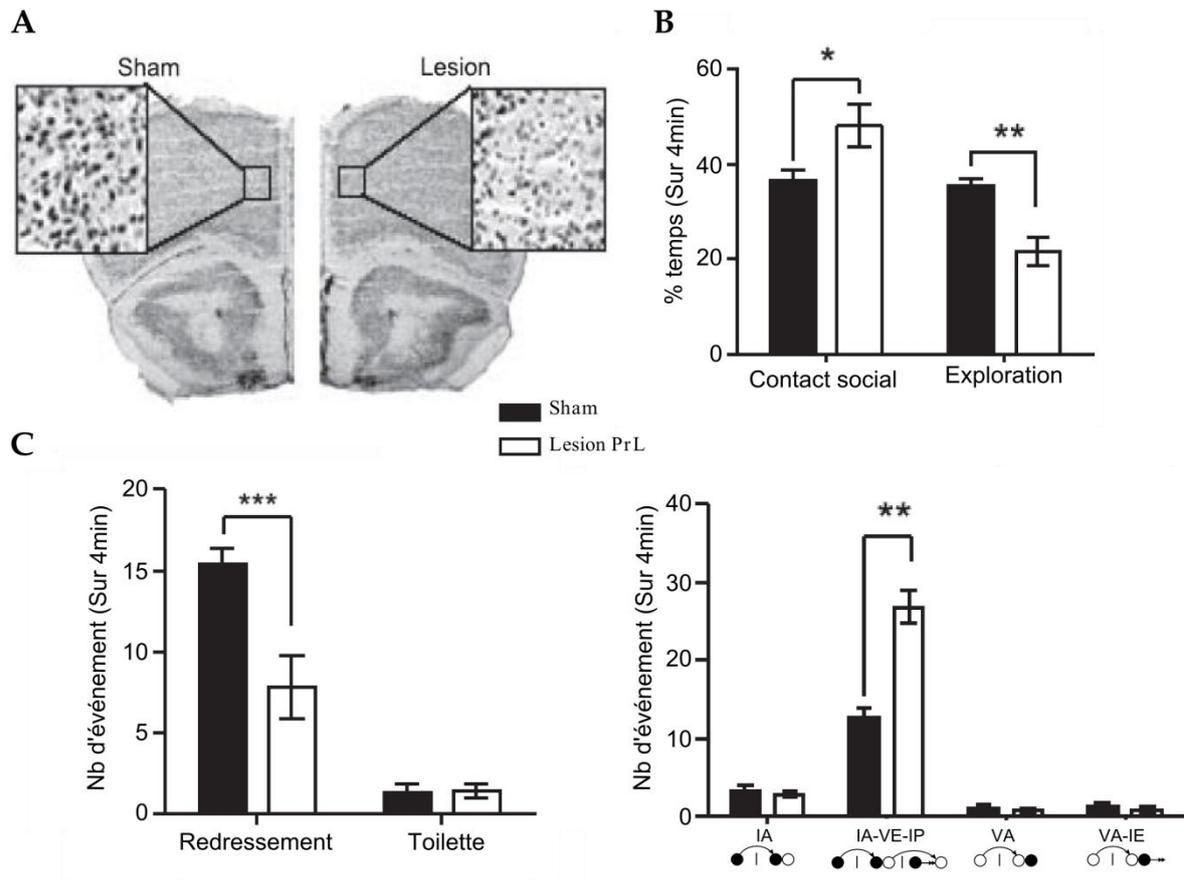


Figure 36: Les lésions du cortex prélimbique affectent le comportement flexible lors de l'interaction sociale. (A) Représentation des sections hémi-coronales (+2.10mm du bregma) montrant l'effet de la lésion (droite) comparée aux souris contrôles (gauche) en coloration crésyl violet. (B) pourcentage du temps de contact et du temps d'exploration. (C) Mesures comportementales, à gauche, nombre de redressement et de toilette pendant la SIT. A droite, séquences comportementales réalisées par les souris pendant la SIT (nombre d'approches du résident (IA), de poursuites (IA-VE-IP), d'approches du visiteur (VA), et d'échappements du résident (VA-IE)). Sham, n=8 ; lésion, n=7. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Après 3 semaines de récupération, durant lesquelles les animaux lésés ont été isolés, ils sont testés dans la tâche SIT. Tout d'abord les animaux lésés montrent un comportement social affecté. En effet, ils passent plus de temps au contact de l'animal visiteur ($51.2 \pm 4.1\%$) comparés aux animaux contrôles ($36.7 \pm 2.7\%$; test t-student, $t=3.22$, $df=12$, $P<0.01$; **Figure 36B**). A l'inverse, les animaux lésés consacrent moins de temps à l'exploration de l'environnement ($21.54 \pm 2.8\%$) que leurs homologues contrôles ($35.42 \pm 1.53\%$; test t-student, $t=4.54$, $df=14$, $P<0.01$; **Figure 36B**). De même les animaux lésés au PrL effectuent moins de

comportements de redressements (7.85 ± 2.11) que les animaux contrôles (15.44 ± 0.92 ; test t-student, $t=3.84$, $df=14$, $P<0.001$; **Figure 36C gauche**).

Pour affiner ce comportement particulier d'augmentation du temps de contact et mieux comprendre à quoi il est dû, nous avons également quantifié les quatre séquences comportementales (**Figure 36C**, à droite). Les souris lésées présentent une augmentation significative du nombre de poursuite du visiteur (26 ± 2.4) par rapport aux individus contrôles (12 ± 2.4 ; effet de la lésion, ANOVA $F(1,48)=21.87$, $P<0.001$, test de Bonferroni *post-hoc* pour poursuite, $t=10.09$, $P<0.001$). L'ensemble des autres séquences comportementales ne diffèrent pas entre les individus lésés et les contrôles, suggérant donc que l'augmentation du temps de contact observée est principalement due à une augmentation des poursuites initiées par le résident.

De façon à s'assurer que l'augmentation du nombre de poursuites rendant compte du temps de contact plus important n'était pas liée à une hyperactivité chez les souris lésées, nous avons testé leurs activités locomotrices en « *open field* ». Aucune différence significative n'a été relevée entre les animaux lésés et les contrôles (Figure supplémentaire S4, ARTICLE1, test t-student, $P=N.S$).

Ces données montrent qu'il existe une ressemblance entre les comportements des animaux $\beta 2KO$ et des animaux lésés pour le cortex prélimbique. En effet, ces deux groupes d'animaux présentent une augmentation considérable du temps dédié au contact social lors des 4 premières minutes d'interaction sociale. De même, cette augmentation du temps de contact, concomitante avec une diminution franche de la part d'exploration, est liée à une augmentation des séquences comportementales initiées par le résident. Les approches et les poursuites initiées par le résident augmentent chez les $\beta 2KO$ (**Figure 32B**), tandis que seules les poursuites augmentent chez les animaux lésés au prélimbique (**Figure 36C droite**).

b. Lésion du cortex orbitofrontal chez la souris

Parallèlement aux lésions du cortex prélimbique, nous avons effectué des lésions du cortex orbitofrontal (OFC). Comme pour les lésions PrL, les lésions sont spécifiques de l'OFC, et n'atteignent pas les régions adjacentes.

Sur la première période de l'interaction sociale, de 0 à 4 minutes, nous observons que le temps dédié au contact social (ANOVA mesures répétées pour effet lésion ; $F(1,19)=0.976$, $P=N.S$) et le temps d'exploration (ANOVA mesures répétées pour effet lésion ; $F(1,19)=0.977$, $P=N.S$) ne diffèrent pas entre les animaux lésés OFC et les contrôles (**Figure 37A & B**). En effet, ils consacrent respectivement $39.61\pm 3.83\%$ pour les contrôles, et $39.76\pm 5.77\%$ pour les lésés au contact social, contre $60.39\pm 3.84\%$ et $60.24\pm 5.77\%$ à l'exploration de l'environnement. En revanche, lors de la seconde partie de l'expérience, de 4 à 8 minutes, les animaux lésés OFC conservent un taux de contact social élevé ($26.97\pm 3.86\%$) alors que celui-ci diminue chez les animaux contrôles ($18.64\pm 2.21\%$). En effet les lésions OFC affectent le temps de contact, mais seulement dans la seconde partie de l'interaction sociale (ANOVA mesures répétées pour effet période; $F(1,19)=37.064$, $P<0.0001$, suivi d'un test t-student *post-hoc* ; Sham, $t=6.19$, $df=13$, $P<0.001$; OFC, $t=2.14$, $df=6$, $P=NS$). Cette faible diminution du temps de contact social affecte donc le temps consacré à l'exploration que font ces individus. Les animaux lésés n'augmentent que légèrement leurs temps d'exploration vis-à-vis des contrôles (ANOVA mesures répétées pour effet période; $F(1,19)=37.069$, $P<0.0001$, suivi d'un test t-student *post-hoc* ; Sham, $t=-6.19$, $df=13$, $P<0.001$; OFC, $t=-2.14$, $df=6$, $P=NS$).

L'étude des séquences comportementales révèle qu'il n'y a aucune différence significative notable entre les animaux lésés et les contrôles sur les 4 premières minutes (**Figure 37C**). En revanche, sur la seconde partie de l'expérience on observe un plus grand nombre d'approches initiées par le visiteur chez les animaux contrôles que chez les lésés OFC (test t-student, $t=3.15$, $df=19$, $P=0.005$). Lorsque l'on s'intéresse à l'évolution de ces séquences comportementales entre les 2 périodes, on remarque que le nombre de poursuites initiées par la souris résident diminue chez les animaux contrôles, mais pas chez les animaux lésés OFC (ANOVA mesures répétées pour effet période; $F(1,19)=18.24$, $P=0.0004$, suivi d'un test t-student *post-hoc* ; Sham, $t=3.61$, $df=13$, $P=0.003$; OFC, $t=2.29$, $df=6$, $P=NS$). Ce maintien du nombre de poursuites expliquerait pourquoi le temps de contact des animaux OFC ne diminue pas au cours de l'interaction sociale.

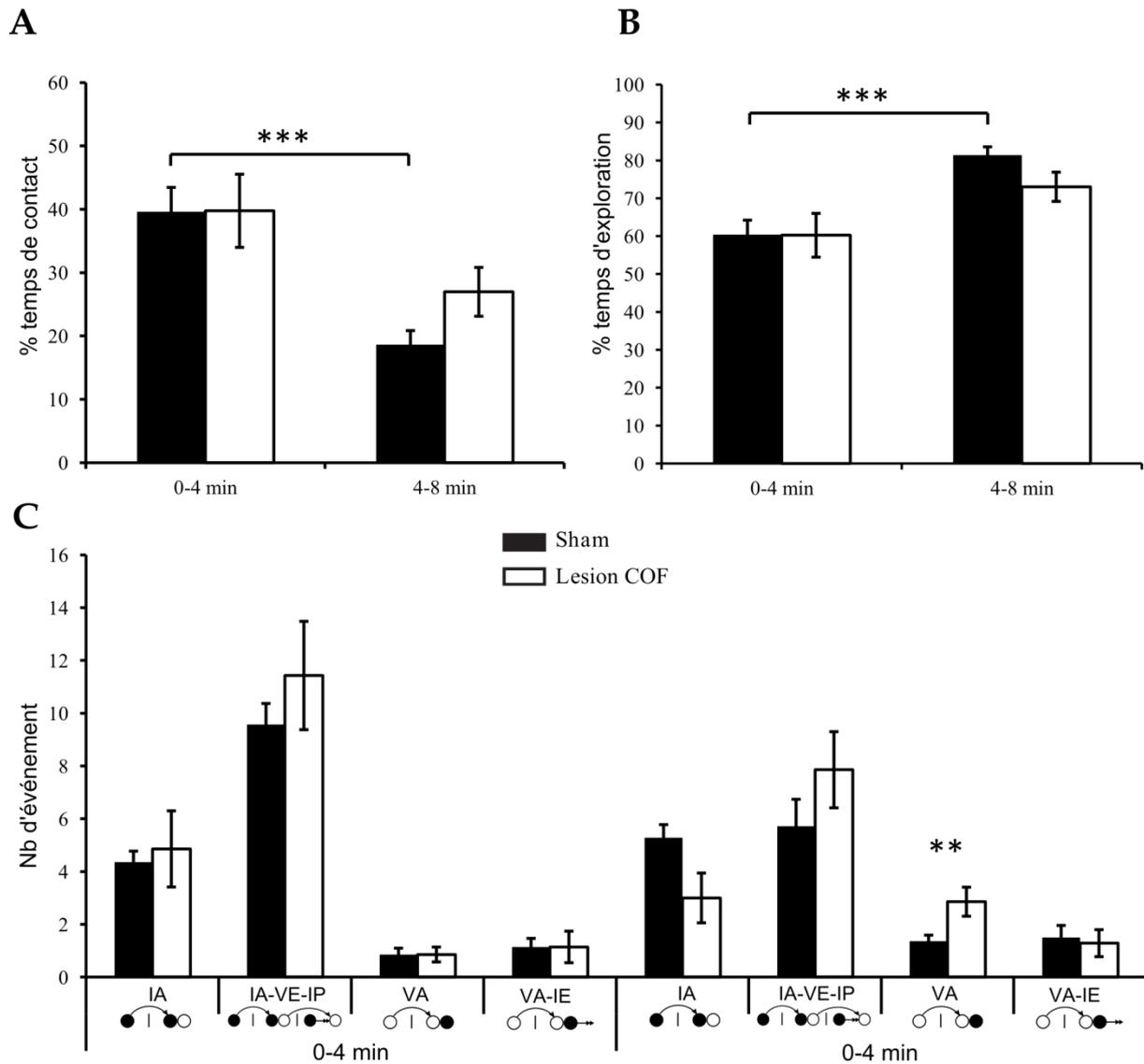


Figure 37: Impact des lésions du cortex orbitofrontal sur le comportement social. (A) Pourcentage du temps de contact sur les 4 premières (0 à 4 min) et les 4 dernières minutes (4 à 8 min) du test d'interaction sociale. (B) Pourcentage du temps d'exploration de l'environnement sur les 4 premières (0 à 4 min) et les 4 dernières minutes (4 à 8 min) du test d'interaction sociale. (C) Mesures comportementales (nombre d'approches du résident (IA), de poursuites (IA-VE-IP), d'approches du visiteur (VA), et d'échappements du résident (VA-IE)). Sham, n=14 ; lésion OFC, n=7. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

Ainsi, grâce aux lésions des deux aires préfrontales que sont le PrL et le COF, nous pouvons montrer deux choses. D'une part montrer une dissociation fonctionnelle entre ces deux aires préfrontales, et d'autre part faire un rapprochement entre le phénotype des animaux lésés au PrL, et les souris $\beta 2$ KO au comportement social atypique. En effet, nous

avons vu que les animaux $\beta 2$ KO présentait une interaction sociale élevée comparée à l'exploration d'objets lors de la première partie de la tâche. Ce qui est également le cas chez les individus ayant subi des lésions PrL. Nous allons donc par la suite éclaircir le rôle du PrL.

c. Réexpression de la sous-unité $\beta 2^*nAChRs$

De façon à préciser le rôle du PrL, ainsi que le rôle des récepteurs nicotiques contenant la sous-unité $\beta 2$ ($\beta 2^*nAChRs$) au sein de ce PrL, nous avons effectué des réexpressions de la sous-unité $\beta 2$ KO chez des animaux $\beta 2$ KO spécifiquement au PrL (**Figure 38**). Pour cela nous avons utilisé des vecteurs lentiviraux contenant la séquence de la sous-unité $\beta 2$ ($\beta 2$ -IRES-eGFP) ou un vecteur lentiviral contrôle, c'est-à-dire ne contenant pas la séquence de la sous-unité $\beta 2$ mais uniquement la séquence eGFP. Ces deux vecteurs sont sous la tutelle du promoteur PGK (cf. Matériels & méthodes ARTICLE 1).

Après réexpression, le taux ainsi que la localisation de la réexpression a été analysée grâce à la liaison de l'épibatidine- $[^{125}I]$, ligand radioactif spécifique aux récepteurs contenant la sous-unité $\beta 2$. Dans la **Figure 38A**, nous observons que les animaux $\beta 2$ KO ne présentent aucun marquage à l'épibatidine- $[^{125}I]$ contrairement aux animaux WT. Chez les animaux ayant reçu l'injection de vecteur lentiviral au sein du PrL (PrL-RESC), nous observons bien une réexpression localisée des récepteurs nicotiques dans le PrL (**Figure 38A**).

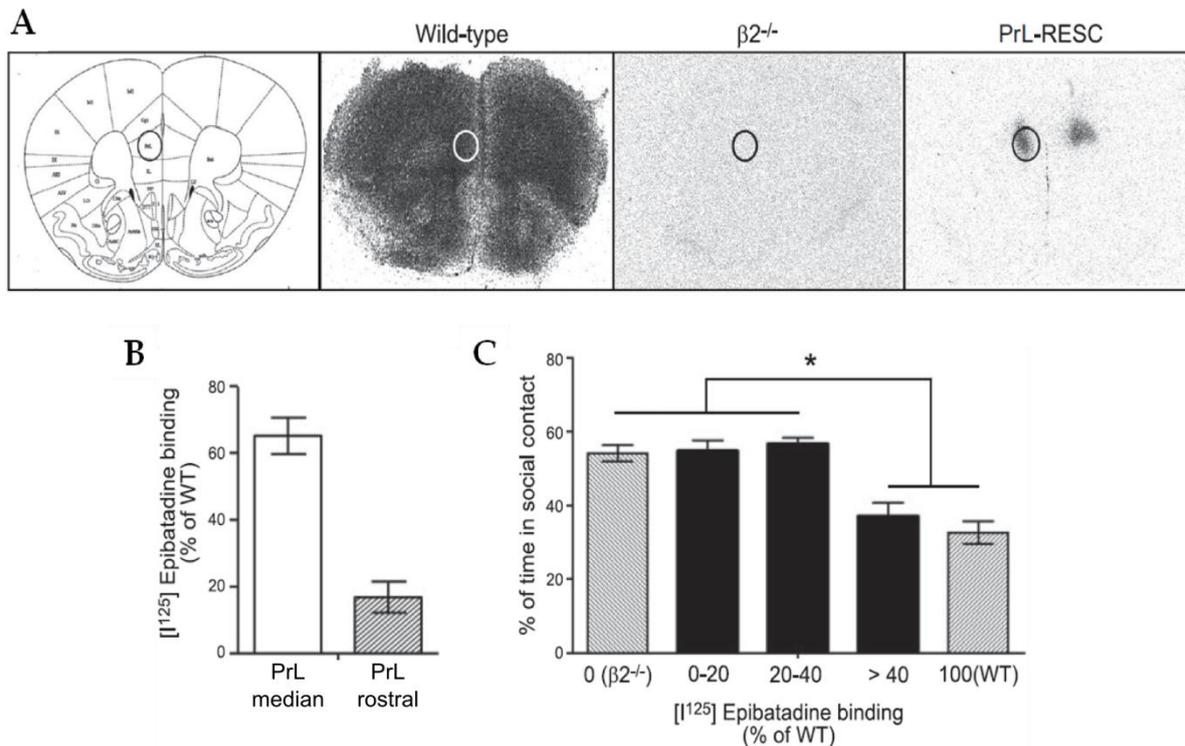


Figure 38: Réexpression lentivirale de la sous-unité $\beta 2^*$ nAChRs au niveau prélimbique chez des animaux $\beta 2^{-/-}$. (A) Représentations des sections coronales montrant les sites de restauration de la sous-unité $\beta 2$ au sein du PrL (cercle noir). La réexpression a été effectuée chez des individus $\beta 2^{-/-}$ (PrL-RESC) comparés aux contrôles (WT), et aux souris $\beta 2^{-/-}$ injectées avec un lentivirus contrôle. L'injection du vecteur lentiviral a été faite aux coordonnées suivantes : AP : +2.80mm du Bregma, L : ± 0.6 mm, DV : -2.3mm du crâne. Les récepteurs exprimant la sous-unité $\beta 2$ sont détectés avec de l'épibatidine- $[^{125}\text{I}]$ par autoradiographie. (B) Valeur du taux de marquage de l'épibatidine- $[^{125}\text{I}]$ quantifié sur 4 coupes ; 2 coronales rostrales (entre AP +2.8mm et +2.34 mm du Bregma) et 2 médiales plus caudales (entre AP +2.34mm et +1.54 mm du Bregma) d'animaux PrL-RESC (n=9). (C) Pourcentage de récupération comportementale des $\beta 2^{-/-}$ en fonction des seuils de réexpression de la sous-unité. Le taux d'épibatidine- $[^{125}\text{I}]$ par autoradiographie a été quantifié sur 4 sections médiales du PrL de façon bilatérale. Le pourcentage de temps de contact a été déterminé pour chaque groupe de souris, et exprimé en pourcentage du niveau WT. ($\beta 2^{-/-}$, n=9 ; PrL-RESC : 0-20%, n=4 ; PrL-RESC : 20-40%, n=3 ; PrL-RESC : $\geq 40\%$, n=9 ; WT, n=6). Les données sont présentées comme moyenne \pm sem., et *P<0.05.

Cette réexpression montre que la sous-unité $\beta 2$ réinjectée interagit avec les sous-unités α présentes de façon endogène pour reconstituer des récepteurs nicotiques hétéromériques fonctionnels.

Pour quantifier cette réexpression, une limite arbitraire entre PrL rostral et PrL plus caudal (PrL médian) a été fixée à +2.34mm du bregma. Ainsi, on observe que malgré une injection du vecteur lentiviral à des coordonnées plutôt « rostrales » (+2.80mm du Bregma), le taux de réexpression est plus élevé dans le PrL médian (60%) que dans le PrL rostral (20%) comparé au taux d'expression WT. Les animaux $\beta 2$ KO injectés avec le vecteur lentiviral contrôle ne présentent pas de marquage à l'épipatidine-[125 I] (données non montrées). Parmi les 16 souris $\beta 2$ KO injectées par le vecteur lentiviral contenant la sous-unité $\beta 2$, neuf souris injectées montrent une restauration des $\beta 2$ *nAChRs supérieure à 40% comparés aux WT, trois souris entre 20 et 40 %, et quatre montrent un taux de restauration inférieur à 20%. En quantifiant les temps dédiés au contact social pour chacune de ces souris, nous avons observé que les souris présentant un taux de restauration inférieur à 40% passent autant de temps au contact social que des animaux $\beta 2$ KO. A l'inverse les animaux avec un taux de restauration supérieur à 40%, montrent un comportement social tout à fait similaire aux WT. Finalement, seuls les animaux avec un taux de restauration d'épipatidine-[125 I] supérieur ou égal à 40% seront considérés comme réinjectés correctement et incorporés au groupe PrL-RESC (**Figure 38C**; ANOVA 1 voie : $F_{(4,26)} = 11.65$, $P < 0.001$, suivit de tests *post-hoc* de Tukey, $*P < 0.05$).

L'analyse comportementale consécutive à la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ apporte plusieurs informations : tout d'abord nous observons que les animaux $\beta 2$ KO, comme décrit dans la première section de ce chapitre, effectuent plus de contacts sociaux ($52 \pm 3.2\%$) et moins d'explorations de l'environnement ($23.5 \pm 2.2\%$) que les WT. Cette augmentation du temps de contact étant principalement liée à une augmentation de certaines séquences comportementales, comme les approches et les poursuites. Les animaux PrL-RESC montrent un profil comportemental très similaire aux WT (**Figure 39A**). Ils passent statistiquement autant de temps que les WT et moins de temps que les $\beta 2$ KO au contact social (PrL-RESC : $37.1 \pm 3.9\%$; $\beta 2$ KO : $52 \pm 3.2\%$; WT : $37.9 \pm 5.9\%$; ANOVA 1 voie : $F_{(2,28)} = 5.96$, $P = 0.007$ suivit d'un test *post-hoc* de Tukey : WT*PrL-RESC : $P = \text{NS}$; WT* $\beta 2$ KO : $P < 0.05$; $\beta 2$ KO*PrL-RESC : $P < 0.01$).

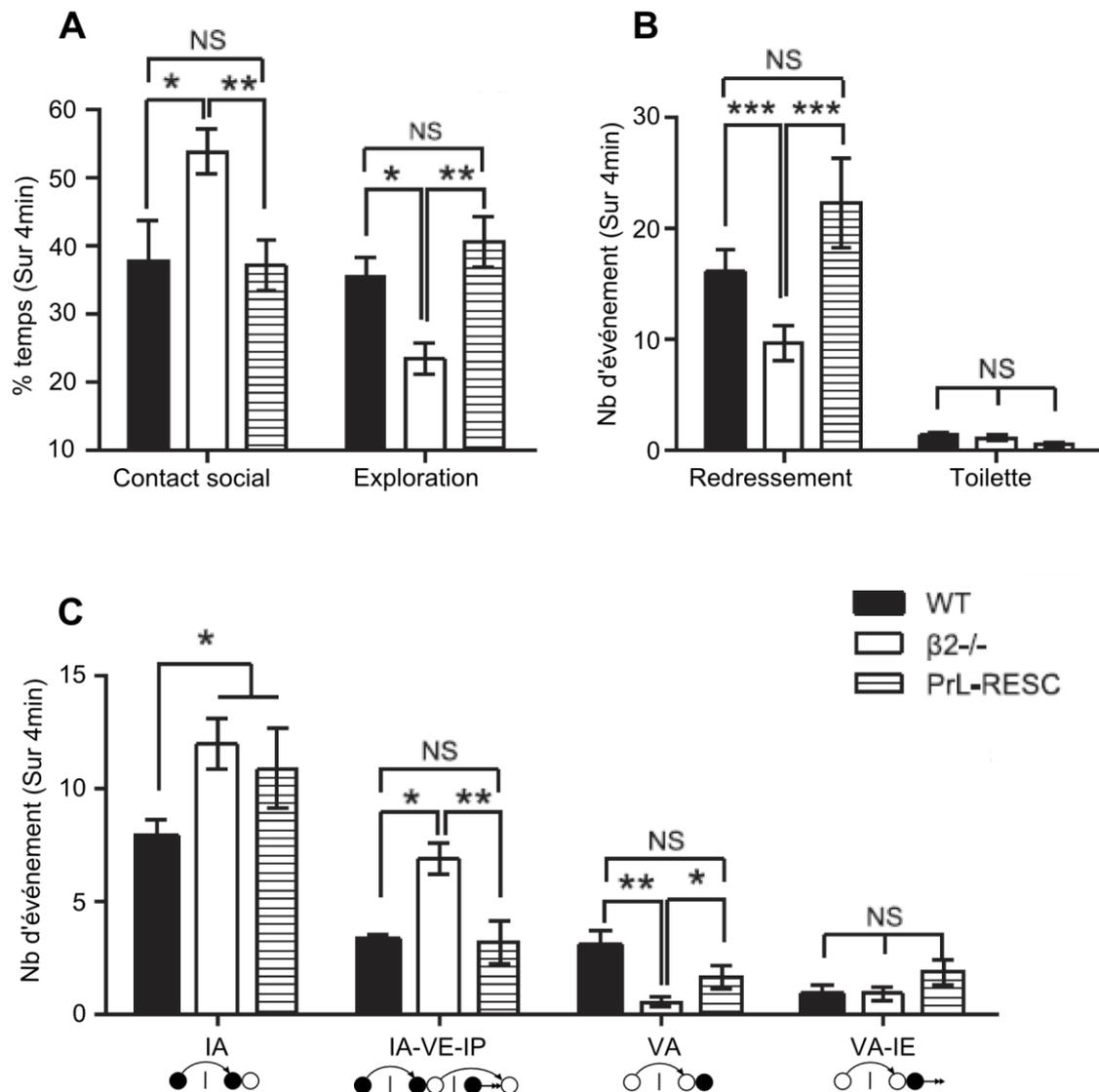


Figure 39: Données comportementales des animaux réexprimés comparées aux WT et aux $\beta 2$ KO. (A) Pourcentage du temps passé au contact social et du temps passé à l'exploration de l'environnement. (B) Comportement de redressement et de toilettage durant les 4 premières minutes du test. (C) Séquences comportementales des WT, $\beta 2^{-/-}$, et PrL-RESC (nombre d'approches du résident (IA), de poursuites (IA-VE-IP), d'approches du visiteur (VA), et d'échappements du résident (VA-IE)). WT, n=7 ; $\beta 2$ KO, n=11 ; PrL-RESC, n=9. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. WT, n=7 ; $\beta 2^{-/-}$, n=11 ; et PrL-RESC, n=9.

De la même façon les animaux PrL-RESC montrent une augmentation du temps d'exploration par rapport au β 2KO (PrL-RESC : $40.6 \pm 3.8\%$; β 2KO : $23.5 \pm 2.2\%$), et donc un temps d'exploration quasi similaire aux WT ($35.4 \pm 2.8\%$; ANOVA 1 voie : $F_{(2,28)} = 6.51$, $P = 0.005$, suivi d'un test *post-hoc* de Tukey : WT*PrL-RESC : $P = \text{NS}$; WT* β 2KO : $P < 0.05$; β 2KO*PrL-RESC : $P < 0.01$). Ce rétablissement du comportement d'exploration est également visible par la restauration des comportements de redressement initiés par les animaux PrL-RESC à un niveau semblable aux WT (**Figure 38B**; PrL-RESC : 22.3 ± 4 ; WT : 16.1 ± 1.9 ; $P = \text{NS}$).

Nous avons ensuite analysé et comparé les séquences comportementales mises en place lors de la tâche d'interaction sociale chez les souris PrL-RESC, WT et β 2KO (**Figure 39C**). L'analyse statistique révèle une différence significative des nombres de chaque séquence comportementale entre les groupes (ANOVA 2 voies, interaction : $F_{(6,96)} = 4.39$, $P = 0.006$ suivi de test *post-hoc* de Bonferroni). Comparés aux WT, les animaux PrL-RESC ne montrent pas un nombre d'approches restauré ($t = 2.42$, $P < 0.05$), et effectuent un nombre d'approches quasi identique au β 2KO ($t = 0.99$, $P = \text{NS}$). Par contre, les animaux PrL-RESC montrent une diminution et donc une restauration du nombre de poursuites au niveau des WT (PrL-RESC*WT : $t = 0.05$, $P = \text{NS}$; β 2KO*PrL-RESC : $t = 3.3$, $P < 0.01$). Le nombre d'approches du visiteur ainsi que le nombre d'échappements du résident sont identiques entre les animaux PrL-RESC et les WT. Malgré quelques différences avec les animaux WT, les souris réexprimées montrent un temps de contact rétablit. Ceci s'explique par le fait que ce temps de contact est en grande partie dû aux évènements de poursuite.

La réexpression de la sous-unité β 2 au niveau du PrL chez des animaux β 2KO restaure un comportement social quasiment normal. En effet **les animaux réexprimant la sous-unité β 2 au sein du PrL montrent un taux d'interaction sociale, d'exploration, ainsi que des séquences comportementales rétablies**, similaires aux WT.

Discussion:

Interaction sociale, gestion des motivations naturelles et cortex préfrontal

Synthèse des résultats:

Les résultats obtenus grâce aux différentes expériences présentées précédemment permettent, dans un premier temps, de montrer la mise en place d'une tâche d'interaction sociale mettant en conflit plusieurs motivations naturelles. Durant cette tâche nous avons pu montrer que les souris $\beta 2$ KO présentent une interaction sociale supérieure en termes de temps de contact par rapport aux souris WT. Les expériences de marquage régional d'expression de la protéine c-Fos après interaction sociale chez les animaux WT ont permis de démontrer l'implication spécifique d'une sous-partie du cortex préfrontal, le cortex prélimbique médian, dans la motivation sociale.

Ensuite, les résultats de lésions du cortex prélimbique soutiennent également l'hypothèse du rôle prédominant du PrL dans la flexibilité comportementale en situation d'interaction sociale. Ces animaux présentent en effet le même profil comportemental que les animaux $\beta 2$ KO, à savoir un temps de contact et un nombre de poursuite très élevés lors de l'interaction sociale. Nous avons pu affiner le rôle de cette structure en y réexprimant la sous-unité $\beta 2$ des récepteurs nicotiques chez des souris qui en étaient dépourvues (les souris $\beta 2$ KO). Ces résultats suggèrent un rôle important des récepteurs nicotiques localisés dans le cortex prélimbique dans la flexibilité comportementale lors de la SIT.

Pour finir, des lésions du cortex orbitofrontal ont été réalisées. Les souris lésées tendent à avoir un temps de contact élevé tout au long de la tâche par rapport aux souris témoins. Ces résultats renforcent l'idée d'une différence fonctionnelle au sein des sous-parties du CPF (ici PrL et COF). Ils sembleraient indiquer un rôle du COF dans l'organisation temporelle des interactions sociales et dans la gestion à long terme de la motivation sociale.

1. Implication du cortex préfrontal dans la gestion du comportement social

L'interaction sociale entre les individus a un but primordial dans la survie des animaux. C'est par l'interaction sociale que les comportements d'accouplements sont initiés, assurant la pérennité de l'individu et de l'espèce. La mise en place de ces interactions sociales nécessitent de prendre en compte rapidement et de manière efficace, non seulement les comportements initiés par le congénère, mais également de pouvoir adapter son propre comportement à ceux-ci. Des prises de décisions rapides, efficaces, et surtout adaptées, ainsi qu'une flexibilité comportementale solide permettant la réorientation du comportement, sont indispensables. Ces fonctions principales sont majoritairement prises en charge par le cortex préfrontal chez la quasi-totalité des espèces mammifères. Cependant toutes les parties de l'organisation d'un comportement flexible ne sont pas gérées par un seul et même réseau, mais plusieurs régions spécifiques du cortex préfrontal sont impliquées.

Nous avons donc dans un premier temps mis en place une tâche d'interaction sociale en choisissant avec soin les paramètres d'isolement et d'habituation à l'environnement de façon à obtenir une interaction sociale dénuée de toute agressivité. Nous avons choisi un paradigme expérimental permettant un bon équilibre entre le taux d'interaction sociale avec un nouveau congénère et l'exploration de l'environnement nouveau. Cet équilibre n'est obtenu que lorsque l'on isole l'animal test avant de le placer en habituation dans l'environnement. Ce protocole nécessite donc que l'individu test adapte son comportement à ses propres motivations mais également aux comportements du congénère auquel il est confronté. Cette tâche implique donc une grande part de prise de décision dans un contexte où les motivations naturelles et l'incertitude sont mêlées.

De façon à préciser le rôle de certaines sous-parties du CPF lors des processus de prise de décision, plus précisément lors de la tâche d'interaction sociale, nous avons réalisé plusieurs expériences de lésions spécifiques de régions, et de quantifications d'activation du gène précoce *c-fos*, et de sa protéine chez des souris adultes mâles lors d'une tâche d'interaction sociale.

Le cortex prélimbique et la flexibilité comportementale lors de l'exposition à des motivations concurrentes

Comme nous l'avons décrit, l'analyse de l'activation de la protéine c-Fos chez les animaux WT montre tout d'abord que certaines structures cérébrales, telles que le cortex orbitofrontal (LO/VO), le cortex prélimbique (PrL), le cortex infralimbique (IL), le cortex cingulaire (Cing), et le noyau accumbens (NAcc), présentent une activation similaire chez les animaux en interaction sociale ou en interaction avec un nouvel objet. Cette activation est supérieure à celle observée chez les animaux contrôles. Ces résultats suggèrent donc que ces structures cérébrales sont activées par la nouveauté elle-même et ne sont pas spécifiques de l'une ou l'autre des tâches. Ces résultats semblent appuyer de récentes données montrant que l'exploration d'un nouvel environnement chez des animaux WT peut entraîner une augmentation spécifique de l'activation de ces mêmes structures corticales et sous-corticales (Bourgeois et al. 2011). En contre partie, nos données montrent également une activation différentielle du PrL. La partie rostrale du PrL est en effet activée de façon identique chez les animaux en exploration d'objet et chez les animaux en interaction sociale, mais la partie médiale montre une plus forte activation lors de la tâche d'interaction sociale que lors de l'exploration d'un nouvel objet.

Ainsi, le PrL médian semble spécifiquement activé lors de l'interaction avec un nouveau congénère. Ces observations nous ont conduit à l'hypothèse que cette partie du cortex préfrontal, bien que jouant un rôle dans l'exploration de la nouveauté, joue également un rôle particulièrement important durant l'interaction sociale chez ces individus. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour valider et déterminer avec précision le rôle différentiel de ces deux régions dans d'autres tâches comportementales sociales. Cependant plusieurs données de la littérature rapportent le fait que les différentes parties du PrL (rostrale, médiale et caudale) présentent des connexions, afférentes et efférentes, différentes avec le noyau accumbens notamment. En effet, grâce à un marqueur rétrograde les auteurs ont mis en évidence des connexions entre le PrL rostral et la partie « core » du NAcc, tandis que la partie médiale du PrL semble être connectée avec la partie « shell » du NAcc (Gorelova & Yang 1997; Vertes 2004). Cette différence fonctionnelle entre les deux régions du cortex prélimbique mises en valeur dans nos données est donc renforcée par les différences anatomiques de connexion.

Pour tester plus précisément l'implication du PrL dans cette tâche d'interaction, notre premier objectif était de réaliser des lésions à la fois rostrales et médianes, de façon à

caractériser comportementalement l'implication différentielle de ces deux sous-parties du PrL. Cependant, Après de nombreux essais, nous n'avons pas été capables d'obtenir des lésions localisées à l'une ou l'autre des sous-parties. Les lésions étaient trop étendues, probablement à cause d'un effet de diffusion du PrL rostral vers le PrL médian et inversement. Nous avons donc opté pour une lésion plus générale du PrL dans sa totalité. Les résultats montrent un temps passé au contact du congénère plus important chez les animaux lésés que chez les sujets contrôles, avec une augmentation des comportements d'approches et de poursuites surtout. Les sujets lésés présentent également une diminution du temps passé à l'exploration de l'environnement (qui représente la deuxième motivation de cette tâche). De précédentes études de lésions ont montré que l'exploration de la nouveauté n'était pas altérée lors de lésions du cortex prélimbique chez le rat (Granon et al. 1996; Mogensen et al. 2004). Ces données suggèrent que la propension à favoriser l'interaction sociale n'est probablement pas due à une diminution de l'intérêt envers l'exploration d'environnement. Ceci nous menant donc à l'hypothèse que les animaux lésés au PrL sont incapables de se désengager du comportement de contact social et d'alterner entre des comportements sociaux et d'exploration de l'environnement. Cette interprétation est soutenue par de nombreux travaux, montrant entre autre que la région prélimbique est impliquée dans les processus de changement entre différentes stratégies, récompenses ou actions (Ragozzino et al. 1999; Birrell & Brown 2000; Rich & Shapiro 2009). Ainsi la lésion du cortex prélimbique ne semble pas affecter la motivation d'exploration de la nouveauté, mais plutôt la flexibilité comportementale des animaux.

De récentes données d'optogénétique ont brillamment montré l'implication du cortex prélimbique dans la motivation pour l'interaction sociale avec un nouveau congénère (Yizhar et al. 2011). Plus précisément, les auteurs ont montré qu'en injectant des récepteurs canaux sensibles à un flash lumineux dans les neurones pyramidaux et les interneurons GABA du cortex prélimbique et infralimbique, la balance excitation / inhibition peut être modulée. L'augmentation de cette balance, par l'activation des canaux présents sur l'un ou l'autre des types cellulaires, provoque comportementalement une diminution des contacts sociaux ainsi qu'une baisse du temps passé au contact d'un congénère social. De plus il semblerait également que le cortex prélimbique soit aussi impliqué dans le contrôle de la hiérarchie sociale au sein d'un groupe de rongeur. Les premières études à ce sujet ont été réalisées chez le rat (Holson 1986). Les auteurs ont montré que des lésions du CPFm affectaient le rang social des animaux, qui avaient soit tendance à se retrouver dominés, soit

à voir leur rang social abaissé. Récemment, Wang et ses collaborateurs (Wang et al. 2011) ont montré que les souris les plus dominantes présentaient un profil d'activation des afférences excitatrices dans le cortex préfrontal médian (aire prélimbique et infralimbique, au niveau de la couche V) plus important que leurs congénères de plus bas rang. Ainsi, les résultats chez les rongeurs (rat ou souris) viennent étoffer ceux de la littérature chez l'homme, concernant le lien entre les comportements sociaux et le cortex préfrontal médian (Amodio & Frith 2006). Cependant, dans notre tâche, il n'existe pas de corrélation entre l'activation *c-Fos* du PrL médian et le comportement social. Même si les données de la littérature ainsi que les analyses de lésions du PrL semblent être cohérentes entre elles, il est important de noter que l'activation du gène *c-fos* est générale. Elle donne un bon aperçu de l'activation régionale, mais de plus amples expérimentations sont nécessaires afin d'affiner ces résultats. Par exemple, il serait intéressant d'étudier les profils électrophysiologiques de ces deux sous-parties du PrL (rostrale et médiale) lors de la tâche d'interaction sociale, afin de s'assurer du rôle putatif de chacune.

Nos résultats suggèrent également l'implication centrale d'une partie du CPF, le cortex prélimbique, dans l'interaction sociale et la flexibilité comportementale chez l'animal. Cependant il est important de noter que l'intégration d'indices sensoriels (olfactifs, auditifs...etc.) est également importante lors de l'interaction sociale. Cela peut influencer le fonctionnement du cortex préfrontal. En effet, l'intégration de ces signaux en plus des informations relatives à la « récompense » sociale, peut créer un état motivationnel, attentionnel et émotionnel qui peut altérer l'interaction sociale. Cette question sera approfondie dans la suite de la discussion.

Gestion à long terme de l'interaction sociale et cortex orbitofrontal

L'implication du cortex prélimbique dans les processus de flexibilité comportementale lors de la tâche d'interaction sociale nous a conduit à étudier d'autres structures préfrontales de manière à comprendre l'étendue du réseau impliqué.

Nous avons ainsi pu voir que les souris avec des lésions du cortex orbitofrontal montrent une altération de leur comportement social, mais que cette altération est très différente de celle observée lors de lésions prélimbiques. En effet, si l'on observe simplement les 4 premières minutes d'interaction sociale, aucune différence n'apparaît entre les animaux « lésé-OFC » et le groupe contrôle. Seules les 4 dernières minutes (correspondant à la période

de 4 à 8 minutes) montrent un temps de contact plus élevé chez les animaux « lésés-OFC » par rapport aux contrôles. Ce temps de contact plus élevé lors des 4 dernières minutes ne s'accompagne pas d'une augmentation de certaines classes comportementales. En effet, les animaux « lésés-OFC » font le même nombre de contacts que les animaux contrôles mais ces contacts durent plus longtemps. Ces données sont cohérentes avec celle obtenues chez le rat, qui montrent que des lésions spécifiques du cortex orbitofrontal n'affectent en aucun cas le comportement social des animaux sur les 5 minutes de durée du test (Rudebeck et al. 2007).

De nombreuses données montrent que le COF possède un rôle important dans la mise à jour des valeurs associées aux différentes options (Sul et al. 2010), mais également dans la réduction des « interférences » dues aux stimuli non pertinents lorsque plusieurs options sont présentes (Kim & Ragozzino 2005). De plus, des données électrophysiologiques ont montré que les neurones du cortex orbitofrontal possèdent une décharge particulière au cours du temps. En effet, non seulement les neurones déchargent différemment pour une récompense selon la taille espérée et le temps mis pour l'obtenir (Roesch & Olson 2004), mais ils déchargent aussi lors de l'anticipation de la récompense, cette décharge diminuant progressivement au cours du temps (Schoenbaum et al. 2006). Ainsi, nous pouvons supposer que lors de la tâche d'interaction sociale, les animaux « lésés-OFC » ne peuvent plus évaluer dynamiquement la valeur du renforcement. Le contact social n'est ainsi pas dévalué au cours du temps, ce qui conduit les animaux à ne pas diminuer leur temps de contact social au cours de la tâche au profit d'autres motivations.

Les données obtenues et discutées jusque là, renforcent l'idée que la tâche d'interaction sociale impose un comportement flexible et des prises de décision rapides et adaptées, principalement vis-à-vis des comportements du congénère. En effet, nous venons de voir que durant cette tâche, des régions cérébrales décrites comme intervenant dans des processus de choix flexibles entre différentes options, sont impliquées. C'est le cas notamment du cortex prélimbique et du cortex orbitofrontal. Comme montré chez l'humain, nous observons chez le rongeur une dichotomie fonctionnelle entre le COF et le cortex « prélimbique » (inexistant chez l'homme, mais fonctionnellement proche du CPF dorsolatéral). En effet, des études d'imagerie ont montré que le COF de l'homme était particulièrement impliqué dans les processus de traitement des informations concernant les renforcements positifs ou négatifs (Wallis 2007; Amodio & Frith 2006), tandis que le CPF dorsolatéral est impliqué dans les processus de récupération d'informations cognitives et dans les processus attentionnels nécessaires à la prise de décision (Rangel et al. 2008). Nos

résultats renforcent l'idée d'une implication différentielle de sous-parties du CPF, telles que le PrL et le COF. De plus, l'implication du COF lors de la tâche d'interaction sociale chez la souris, conforte l'idée que le comportement social en général, sans but reproductif, peut tout à fait avoir les caractéristiques d'une récompense au même titre que d'autres types de renforcements naturels (Panksepp & Lahvis 2007; Wöhr & Schwarting 2009).

2. Implication des récepteurs nicotiques contenant la sous-unité $\beta 2$ au cortex préfrontal.

Tout d'abord, l'étude de l'activation de la protéine c-Fos au sein du cerveau de souris $\beta 2$ KO ne montre pas d'activation spécifique. En effet, il n'existe aucune différence entre les animaux ayant réalisé une interaction sociale (résident social) et les animaux ayant fait une exploration d'un nouvel objet (nouvel objet). Ce résultat montre que chez les souris $\beta 2$ KO, contrairement aux souris WT, aucune structure n'est particulièrement sollicitée par l'interaction sociale. Mais étrangement, le niveau d'activation des animaux contrôles (animaux amenés dans la pièce d'expérimentation puis anesthésiés) est très élevé. Ainsi, il n'y a aucune différence d'activation entre les groupes. De précédentes études d'activation de la protéine c-Fos chez les souris $\beta 2$ KO ont non seulement montré un niveau d'activation dans des structures corticales et sous-corticales beaucoup plus faible par rapport aux animaux contrôles, mais également que des structures comme le PrL, le M1, le NAcc, et la BLA étaient activées par la nouveauté (Bourgeois et al. 2011). C-Fos étant un gène immédiat précoce activé après une multitude, si ce n'est tous, les comportements, il est fortement envisageable qu'une interférence comportementale ou expérimentale soit venue perturber le niveau d'expression de ce gène et de sa protéine associée chez les individus de ce groupe contrôle. Cette perturbation (observée lors de deux expériences reproduites de manière indépendante) nous empêche de conclure d'un effet de la nouveauté sur l'activation de certaines structures chez les animaux $\beta 2$ KO.

Cependant, les résultats comportementaux obtenus avec les souris $\beta 2$ KO, montrent que ces souris présentent un comportement social altéré. En effet, par rapport aux animaux WT, les animaux $\beta 2$ KO passent beaucoup plus de temps au contact du congénère social. Cette augmentation du temps de contact est concomitante avec une diminution du temps

passé à l'exploration de l'environnement et est principalement due à l'augmentation de certaines classes comportementales, comme les poursuites (IA-VE-IP) ou les approches (IA). Nos résultats renforcent l'idée que ces souris $\beta 2$ KO possèdent un déficit de flexibilité comportementale. En effet, des données obtenues chez ces souris $\beta 2$ KO montrent que ces animaux n'adaptent pas leurs déplacements au cours du temps dans un environnement libre à mesure que celui-ci devient familier. Il a également été montré que les séquences d'approche de ces animaux étaient modifiées par rapport aux WT et que la flexibilité était altérée de façon plus générale (Granon et al. 2003), confirmant ainsi nos résultats. Les données obtenues chez les animaux $\beta 2$ KO non isolés ne montrent aucune différence de comportement social. Dans cette condition où la motivation sociale n'est pas augmentée par l'isolement, les animaux $\beta 2$ KO ont un taux d'interaction sociale et un taux de poursuite au même niveau que celui des WT. Ces données renforcent l'idée que ces animaux ne présentent pas de déficit dans l'évaluation des motivations sociales ou d'exploration, mais montrent plutôt un déficit dans la gestion lorsque ces motivations entrent en conflit après isolement.

En sachant que la sous unité $\beta 2$ KO est présente dans l'ensemble du cerveau (Le Novère et al. 2002), il est d'autant plus surprenant que les résultats obtenus chez les souris $\beta 2$ KO coïncident fortement avec le comportement social atypique des animaux lésés pour le cortex prélimbique. Ceci nous a conduits à supposer que les récepteurs nicotiques contenant la sous-unité $\beta 2$ au sein du cortex prélimbique jouent un rôle clé dans les comportements sociaux.

Les résultats de la réexpression de la sous-unité $\beta 2$ spécifiquement au sein du cortex prélimbique répondent directement à cette question. En effet, la réexpression à ce site spécifique, suffit à restaurer un temps de contact social normal, et des séquences d'approches proches de celles obtenues chez WT. De manière intéressante, un minimum de 40% de restauration est tout de même nécessaire pour l'obtention d'un comportement « normal » au sein des animaux « réexprimés ». Il a été montré que les sous-unités des récepteurs nicotiques s'assemblent selon deux schémas de sensibilité: « haute-sensibilité » et « faible-sensibilité », dépendant du ratio des sous-unités α/β (Moroni et al. 2006). Dans notre système, la sous-unité $\beta 2$ réexprimée s'associe avec les sous-unités α endogènes pour former des $\beta 2^*nAChRs$. De plus, de précédentes données d'électrophysiologie et de microdialyse, montrent l'obtention de $\beta 2^*nAChRs$ fonctionnels grâce à la réexpression via vecteur lentiviral (Maskos et al. 2005; Mameli-Engvall et al. 2006; Avale et al. 2008). Dans notre étude,

nous avons observé que la réexpression se fait principalement (à plus de 60%) au niveau du cortex prélimbique médian, et ce malgré une injection du vecteur lentiviral à des coordonnées correspondant au PrL rostral. Etant donné que les particules virales n'infectent et n'intègrent que les corps cellulaires à proximité de l'injection (Avale et al. 2008), ceci suggère que les sous-unités $\beta 2$ sont transportées ou réexprimées principalement au niveau du CPF médian via des efférences qui iraient du PrL rostral vers le PrL médian. Ces données viennent donc renforcer l'impact du PrL médian *versus* le PrL rostral dans les comportements flexibles et leurs implications différentielles observées lors de l'activation de la protéine c-Fos.

Nos résultats, ainsi que ceux de la littérature renforcent l'hypothèse de la contribution majeure des récepteurs $\beta 2^*nAChRs$ au sein du PrL. D'autant plus que de récentes données montrent également qu'une réexpression de cette sous-unité $\beta 2$ au sein de la ATV ou de la SNpc chez des animaux $\beta 2KO$ restaure le comportement flexible d'adaptation entre comportement d'exploration lent et rapide dans un environnement libre. Cependant cette réexpression ne restaure pas le comportement social (U Maskos et al. 2005; Avale et al. 2008). De plus, les projections du système cholinergique vers le CPF médian jouent un rôle prépondérant dans plusieurs processus cognitifs, tels que l'apprentissage, la mémoire de travail, et l'attention (Granon et al. 1995; Everitt & T W Robbins 1997; M Sarter & Bruno 1997; Ross et al. 2005). Plusieurs auteurs montrent notamment que la sous-unité $\beta 2$ au sein du cortex préfrontal joue un rôle central dans les processus d'attention (Howe et al. 2010; Guillem et al. 2011). Les récepteurs nicotiques contribuent également à la régulation de plusieurs circuits (Mansvelder et al. 2006; Dos Santos Coura & Granon 2012), dont les circuits corticaux-limbiques (Mansvelder et al. 2009; Uwe Maskos 2010). Plus particulièrement, les $\beta 2^*nAChRs$ ont été décrits au sein d'interneurones du cortex préfrontal, mais également au sein de neurones pyramidaux (Dos Santos Coura & Granon 2012). Ces données sont à mettre en parallèle avec l'hypothèse de l'action bimodale de la dopamine au sein du CPF. En effet, nous avons vu en introduction que la dopamine provoquait deux états d'activation en fonction du type de récepteurs (« D1-like » ou « D2-like ») sollicités, mais également en fonction du taux de décharge de la dopamine (tonique ou phasique). Selon l'hypothèse, l'état d'activation « D2 » conduirait à une réduction du réseau d'inhibition permettant l'évaluation des différentes modalités arrivant au CPF, tandis que « l'état D1 » augmenterait l'état d'inhibition, de telle sorte que seuls les signaux les plus forts seraient capables de franchir le seuil nécessaire. Or, les récepteurs $\beta 2^*nAChRs$ sont présents à la fois sur les corps cellulaires

dopaminergiques et leurs projections au niveau du CPF (Dos Santos Coura & Granon 2012), modulant ainsi (via les afférences cholinergiques) la libération de dopamine au préfrontal. Cette modulation participerait donc à la balance entre les états « D1-like » et « D2-like », et pourrait expliquer, en partie en tous cas, l'implication des récepteurs $\beta 2^*nAChRs$ dans les processus d'attention, d'apprentissage et de mémoire de travail. En effet, en l'absence de récepteurs $\beta 2^*nAChRs$, la modulation dopaminergique favorisant la sélection d'un signal préfrontal fort ne se fait plus, ainsi plusieurs signaux se retrouvent en concurrence, entraînant un déficit de sélection et/ou de focalisation. Dans le même registre, en sachant que les $\beta 2^*nAChRs$ postsynaptiques sont abondants sur les neurones GABAergiques du CPF (Porter et al. 1999), leur absence chez les animaux $\beta 2KO$ pourrait provoquer une désinhibition préfrontal. Ainsi, ces récepteurs joueraient un rôle de régulateur dans la balance entre excitation et inhibition au sein du CPF, comme il l'a été démontré dans le cortex visuel (Lucas-Meunier et al. 2009).

De plus, étant donné le profil d'infection des particules virales, seules les efférences au niveau du PrL sont atteintes par la réexpression. En effet, les afférences arrivant au PrL ne peuvent pas être sujettes à la réexpression, puisque le virus n'affecte que les corps cellulaires (Avale et al. 2008). Sachant cela, nos résultats montrent que le rôle de la sous-unité $\beta 2$ au sein des $nAChRs$ est probablement dû aux modulations des connections du CPF vers les structures sous-corticales. En effet, le contrôle du CPF, sur les structures limbiques notamment, implique des projections glutamatergiques susceptibles d'altérer la balance entre l'amygdale, l'hippocampe, et le noyau accumbens (Del Arco & Mora 2009). Chez le rongeur, les projections les plus denses entre le CPF et le noyau accumbens et l'amygdale, proviennent du cortex prélimbique (Vertes 2004). Ainsi, l'absence de $\beta 2^*nAChRs$ au niveau du PrL affecte probablement la balance fine entre les comportements dirigés vers un renforcement (régulation « *top-down* » *via* PrL-NAcc) et l'état motivationnel (*via* le circuit PrL-Amygdale). Ces deux processus étant tous deux requis dans l'adaptation et l'intégration dynamiques des motivations internes et des stimuli externes à l'animal lors de ce comportement d'interaction sociale (Sesack et al. 2003).

Chapitre 2

Chapitre 2: Indices comportementaux associés aux processus de prise de décision.

Données : dans ce chapitre la majorité des données sont issues des **ARTICLE 2 & 4**, cependant certaines données sont **non publiées** (papier en cours de préparation).

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur les indices comportementaux pris en compte par les individus lors de prise de décision. En effet, lors de l'interaction sociale, les souris doivent réagir en fonction des comportements effectués par le congénère. Pour cela ils doivent prendre en compte différentes informations sensorielles (olfactives, auditives, visuelles, contacts) de façon à interagir de la manière la plus adaptée au congénère et au contexte. On sait par exemple depuis plusieurs dizaines d'années déjà, que les rongeurs (et plus particulièrement les souris) sont capables d'émettre des vocalisations ultrasoniques (USVs) dans différents contextes (Portfors 2007). Ces USVs sont émises notamment lors de relations entre les mères et les petits (D'Amato et al. 2005; Ehret 2005), mais également lors de contacts sociaux à vocation sexuelle entre mâles et femelles (Sugimoto et al. 2011; Wang et al. 2008; White et al. 1998). La participation de ces USVs lors de contextes sociaux à caractères non sexuels, comme lors de la tâche d'interaction sociale, reste encore à déterminer.

Hypothétiquement, ces USVs permettraient l'adaptation des comportements par la mise en place d'une « communication » entre les deux individus impliqués dans l'interaction. Ainsi, Le but de ce chapitre a été de déterminer **s'il existe des indices comportementaux associés aux processus de prise de décision chez les animaux WT et β 2KO. Et quel(s) est (sont) le(s) rôle(s) des vocalisations lors de l'interaction sociale.**

2.1. Influence des différents contextes sociaux et production d'USVs

Nous avons été capables d'observer et d'enregistrer une grande variété d'USVs lors de nombreuses tâches de comportement entre deux souris adultes mâles. Ces USVs ont été répertoriées selon les 10 catégories précédemment décrites (matériels & méthodes section 7.2).

a. Différents degrés d'interaction sociale et production d'USVs

Dans cette partie nous avons confronté les animaux à différentes conditions sociales. Ces conditions varient selon le « degré d'information sociale » auquel les animaux sont exposés.

Les souris WT et β 2KO ont été exposées à trois conditions sociales: la tâche SIT classique, une tâche d'interaction sociale indirecte (trois chambres social où le congénère est captif sous un pot), et une présentation d'odeur d'urine issue d'une cage d'individus sociaux mâles. Nous avons montré que le nombre d'USVs par minute varie sensiblement en fonction de la tâche « sociale » à laquelle les animaux sont exposés (**Figure 40A**). En effet, malgré l'absence de différences entre les animaux WT et β 2KO (excepté pour les corrélations), il y a une différence significative entre les conditions pour le nombre d'USVs par minute (effet génotype, $F_{(1,30)} = 0.046$, $P = 0.83$; effet condition, $F_{(2,30)} = 26.26$, $P < 0.0001$, interaction génotype x conditions, $F_{(2,30)} = 0.09$, $P = \text{NS}$). Que ce soit les animaux WT ou les β 2KO, les animaux émettent beaucoup plus d'USVs lorsqu'ils sont en contact direct avec le congénère durant la tâche SIT (WT : 61.9 ± 10.76 , β 2KO : 64.77 ± 22.13 USVs par minute), que lors du contact séparé par une paroi de plexiglas (3 chambres social, WT : 3.11 ± 0.35 , β 2KO : 2.28 ± 0.25 USVs par minute), ou encore lors de la seule présentation d'indices sociaux comme les odeurs de congénère (WT : 1.18 ± 0.36 , β 2KO : 0.61 ± 0.34 USVs par minute).

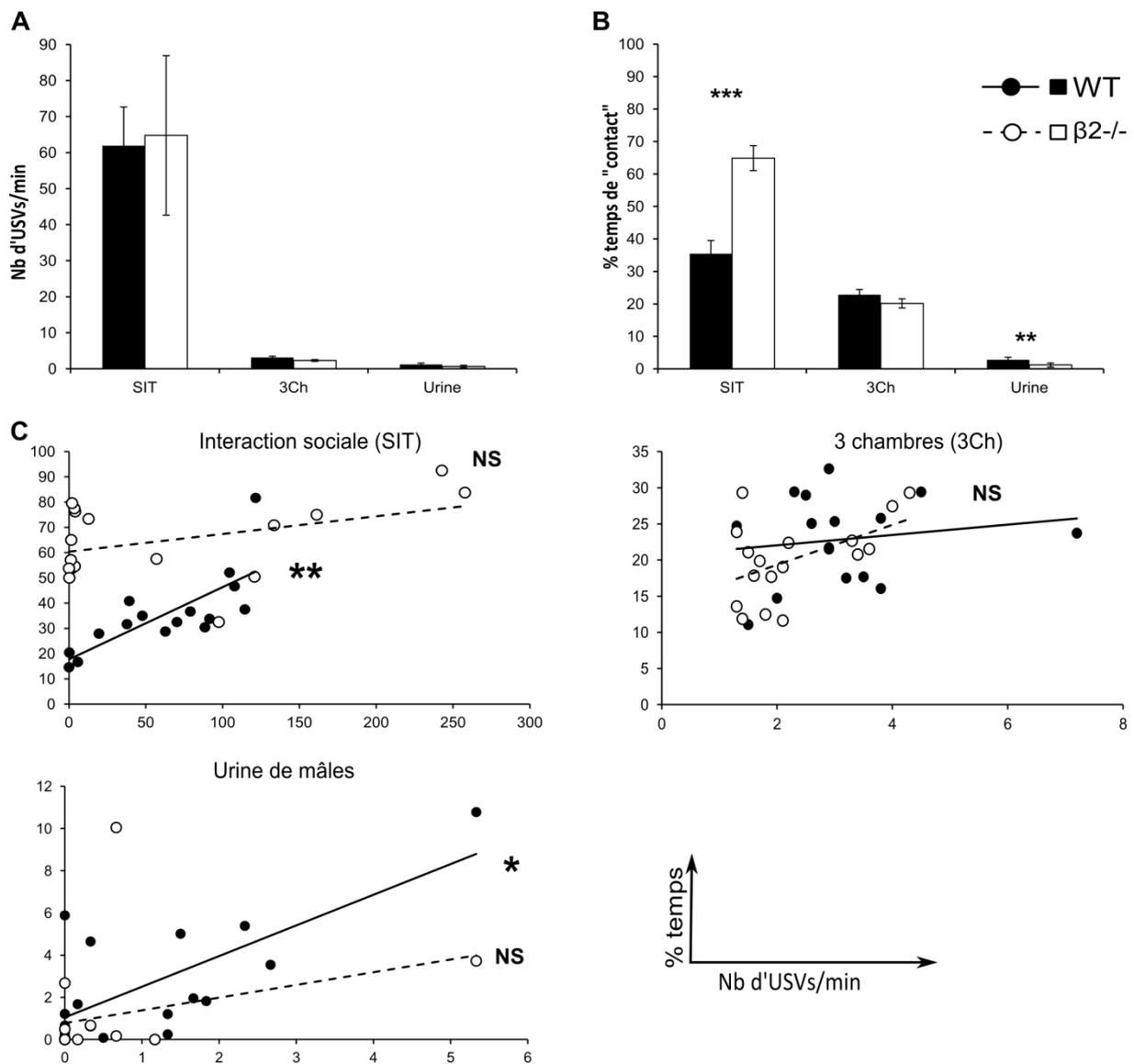


Figure 40: USVs émises lors de trois tâches à caractère social différent. (A) Nombre d'USVs émises par minute en interaction sociale (SIT), 3 chambres social (3ch), et présentation d'urine **(B)** Pourcentage de temps passé au contact du stimulus social **(C)** Courbes de corrélations entre ces deux paramètres pour des animaux WT (n=16) et $\beta 2^{-/-}$ (n=17). Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 pour les tests de Mann-Whitney, et corrélations de Spearman.

De façon intéressante, nous avons quantifié le temps d'exploration sociale dans les trois cas. Donc le temps passé au contact soit du congénère directement, soit à explorer le pot contenant le congénère, ou lors de l'exploration de la pipette contenant le coton imbibé d'urine (**Figure 40B**). Nous avons ainsi mis en évidence qu'il existe une différence significative entre les conditions SIT, 3 chambre et présentation d'urine (ANOVA, effet condition, $F_{(2,31)} = 214.13$, $P < 0.0001$). De plus les animaux $\beta 2^{-/-}$ passent plus de temps que les

animaux WT au contact du congénère en SIT, tandis que les WT explorent plus l'urine. Aucune différence n'est observée en trois chambres (effet génotype, $F_{(1,31)} = 17.51$, $P = 0.0002$; interaction génotype x condition, $F_{(2,31)} = 29.71$, $P < 0.0001$, test *post-hoc* de Mann-Whitney WT Vs $\beta 2KO$, SIT : $P < 0.0001$; 3Ch : $P = NS$; Urine : $P = 0.008$).

L'étude de corrélation entre le nombre d'USVs par minute et le pourcentage de temps passé à l'exploration du congénère social révèle une corrélation positive, et significative pour les animaux WT (**Figure 40C gauche**, $R^2 = 0.82$, $z = 3.17$, $P = 0.001$). A l'inverse, aucune corrélation entre ces deux paramètres n'est observée chez les individus $\beta 2KO$ ($r_s = 0.43$, $z = 1.73$, $P = NS$). Étonnamment, aucune corrélation n'est observée entre le nombre d'USVs émises par minute lors de la tâche de 3 chambres et la proportion de temps passé à cette exploration chez les WT et les $\beta 2KO$ (**Figure 40C centrale**, WT : $r_s = 0.099$, $z = 0.38$, $P = 0.09$; $\beta 2KO$: $r_s = 0.31$, $z = 1.25$, $P = 0.20$). Mais, malgré le faible nombre d'USVs émises, les WT présentent une corrélation entre le nombre d'USVs par minute et le temps d'exploration de la pipette d'urine (**Figure 40C droite**, $r_s = 0.51$, $z = 2$, $P = 0.045$).

Nous avons ensuite étudié le répertoire vocal des souris lors des conditions d'interaction sociale classique et de 3 chambres. L'étude du répertoire lors de l'exploration d'urine n'a pu être réalisée pour cause de nombre d'USVs très faible (WT : 7.125 ± 2.21 ; $\beta 2KO$: 3.68 ± 2.04 USVs sur la totale durée du test). Ainsi, le répertoire d'USVs observé chez les animaux WT et $\beta 2KO$ en interaction sociale est composé majoritairement d'USVs courtes, appelées « short » (**Figure 41A**, détails dans le Tableau 4), en seconde position les USVs avec sauts de fréquences « Jump ». Viennent ensuite pour les WT les USVs présentant des modulations de fréquences « Modulées », les USVs à fréquence montantes « upward », les « composite », et enfin les « downward », « u-shape », « Flat » et « chevron ». Les $\beta 2KO$ présentent une tout autre organisation lors de la SIT, après les « shorts » et les « jumps », viennent les USVs « composite », les « modulées », « upward », « downward », « u-shape », « flat » et « chevron ». Les animaux $\beta 2KO$ émettent significativement plus de « short », et moins de « jump », « modulée » que les WT.

Interaction sociale (SIT)			
Type USVs	WT (en % ± sem.)	B2KO (en % ± sem.)	Statistiques (Mann-Whitney)
Short	40.5±5	56.8±6.8	U=70, P=0.04
Jump	28.2±3.2	14.2±3.3	U=54, P=0.009
Modulée	14.7±2.3	7.2±2	U=61.5, P=0.02
Upward	8.46±1.5	6.76±2	N.S
Composite	5±1.1	11.79±2.9	N.S
Downward	1.7±0.4	2.17±0.8	N.S
U-Shape	0.63±0.17	0.63±0.3	N.S
Flat	0.48±0.13	0.21±0.08	N.S
Chevron	0.20±0.08	0.12±0.08	N.S
3 chambres (3Ch)			
Type USVs	WT (en % ± sem.)	B2KO (en % ± sem.)	Statistiques (Mann-Whitney)
Short	59.8±3	68.9±3	N.S
Jump	3±0.83	1.64±0.7	N.S
Modulée	0	0	N.S
Upward	1.62±0.56	1.4±0.65	N.S
Composite	0.21±0.22	0	N.S
Downward	0	0	N.S
U-Shape	20.4±2.8	18.7±2.6	N.S
Flat	1.16±0.59	1.26±0.9	N.S
Chevron	13.7±2.2	12±2	N.S

Tableau 4: Composition du répertoire vocal chez les animaux WT et β 2KO lors des tâches de SIT (*haut*) et de 3Ch (*bas*).

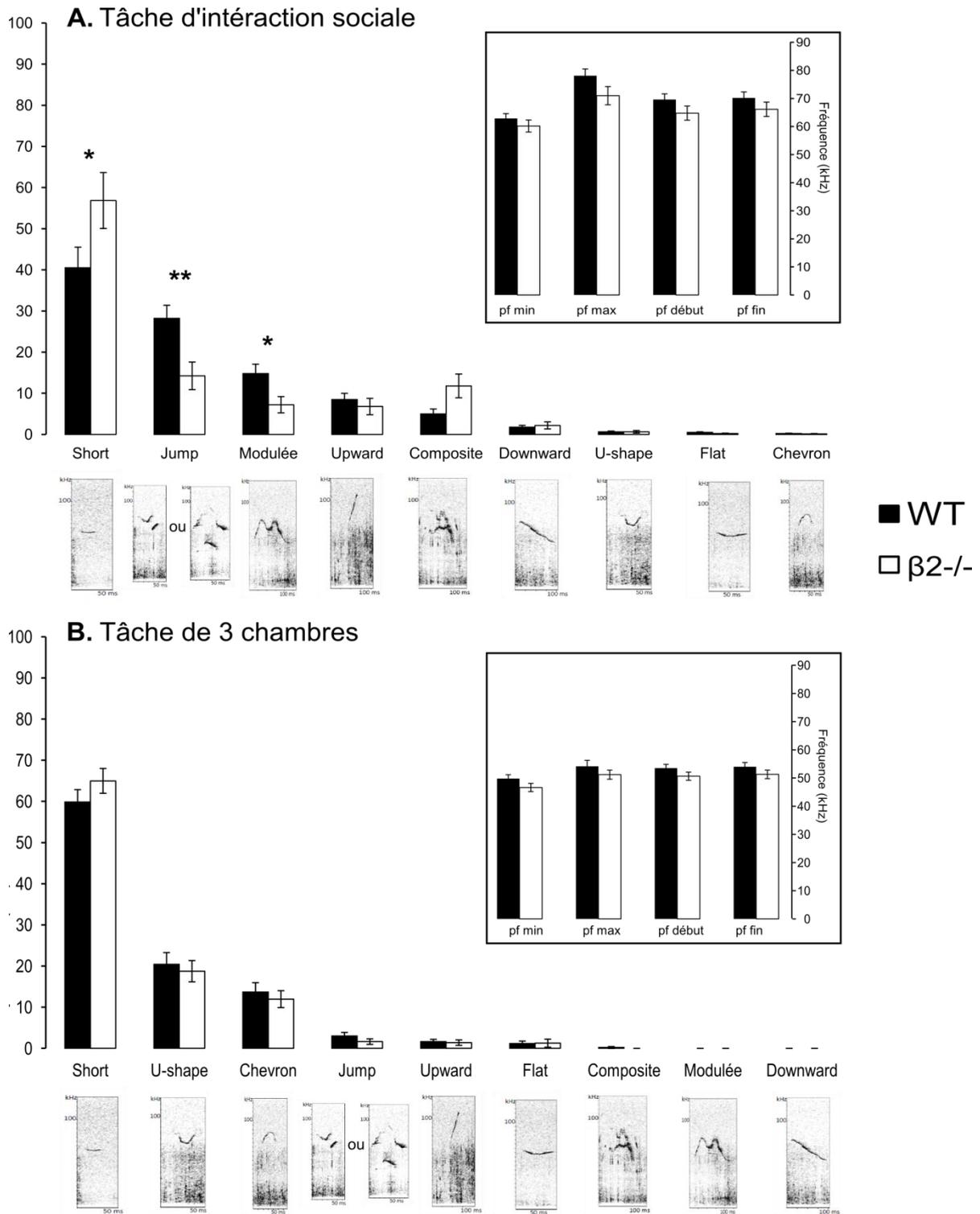


Figure 41: Composition du répertoire vocalisant et (*en encadré*) les fréquences d'émission des USVs lors de la tâche SIT (A) et de 3 chambres (B) chez les animaux WT (n=16) et β2KO (n=17). Les spectrogrammes de chaque classe d'USVs sont visibles sous chaque diagramme. Et pf min : fréquence minimale, pf max : fréquence maximale, pf début : fréquence de départ, pf fin : fréquence de fin. Les données sont présentées en moyenne ± sem., et *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 pour les tests de Mann-Whitney.

Pour l'ensemble des ces USVs, nous avons mesuré les paramètres de fréquences (**Figure 41A encadré**, min, max, début, fin) associés à ces USVs. Il n'existe aucune différence entre les deux génotypes pour ces paramètres. Mais, nous avons remarqué que la fréquence d'émission des USVs lors de la SIT est relativement élevée (WT : pf min = 62.8±1.7 kHz, pf max = 78.12±2.4 kHz, pf début = 69.6±2 kHz, pf fin = 70.2±2.1 kHz ; β 2KO : pf min = 60.1±2.14 kHz, pf max = 70.9±3.2 kHz, pf début = 64.8±2.5 kHz, pf fin = 6.6±2.5 kHz).

La répartition des USVs au sein de la condition de 3 chambres varie légèrement vis-à-vis de celle observé en SIT. Premièrement, aucune différence n'est observée entre les génotypes. Les USVs « *shorts* » restent toujours majoritairement représentées (Tableau 4). Par contre l'organisation des USVs suivantes est différente. Les « u-shape » se placent deuxièmes, viennent ensuite les « chevrons », les « jumps », les « upward », les « flats », « composites », « modulées » et « downward ». Le répertoire vocal est beaucoup plus restreint que lors de la SIT pour les deux génotypes.

L'analyse des fréquences d'émission (**Figure 41B encadré**) nous a permis de mettre en évidence une fréquence moyenne d'émission plus basse que lors de la SIT (WT : pf min = 50±1.3 kHz, pf max = 54.1±2 kHz, pf début = 53.5±1.3 kHz, pf fin = 54±1.5 kHz ; β 2KO : pf min = 46.6±1.4 kHz, pf max = 51.1±1.6 kHz, pf début = 50.64±1.4 kHz, pf fin = 51.3±1.5 kHz, respectivement SIT Vs 3 chambres, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$, $P < 0.0001$).

b. Contrôle de l'audition de ces animaux

La vérification de la bonne audition des animaux utilisés pour l'ensemble de ces tâches à été réalisée en collaboration avec le Dr Edeline J-M. La mesure des potentiels évoqués du tronc cérébral à été réalisée comme décrit lors du matériel et méthodes section 9. Pour chaque stimulus auditif, nous avons enregistré une réponse auditive dans laquelle nous pouvons discerner différentes ondes (de I à IV). A partir de ces traces, nous avons déterminé le seuil d'audition spécifique de chaque fréquence, défini par l'intensité précédant la disparition de toutes les ondes auditives. Le seuil obtenu (**Figure 42**) varie considérablement en fonction de la fréquence du son (ANOVA mesures répétées, effet fréquence, $F_{(1,28)} = 115.13$, $P < 0.0001$), avec une audition optimale pour les sons purs de 8 kHz, et un autre pic d'audition optimale autour de 16 kHz. Le seuil d'audition varie de manière identique dans les deux

groupes de souris (génotype x fréquences : $F_{(8,224)} = 0.889$, $P=0.52$), et aucune différence n'est détectée entre les génotypes (effet génotype, $F_{(1,28)} = 0.139$, $P=0.71$).

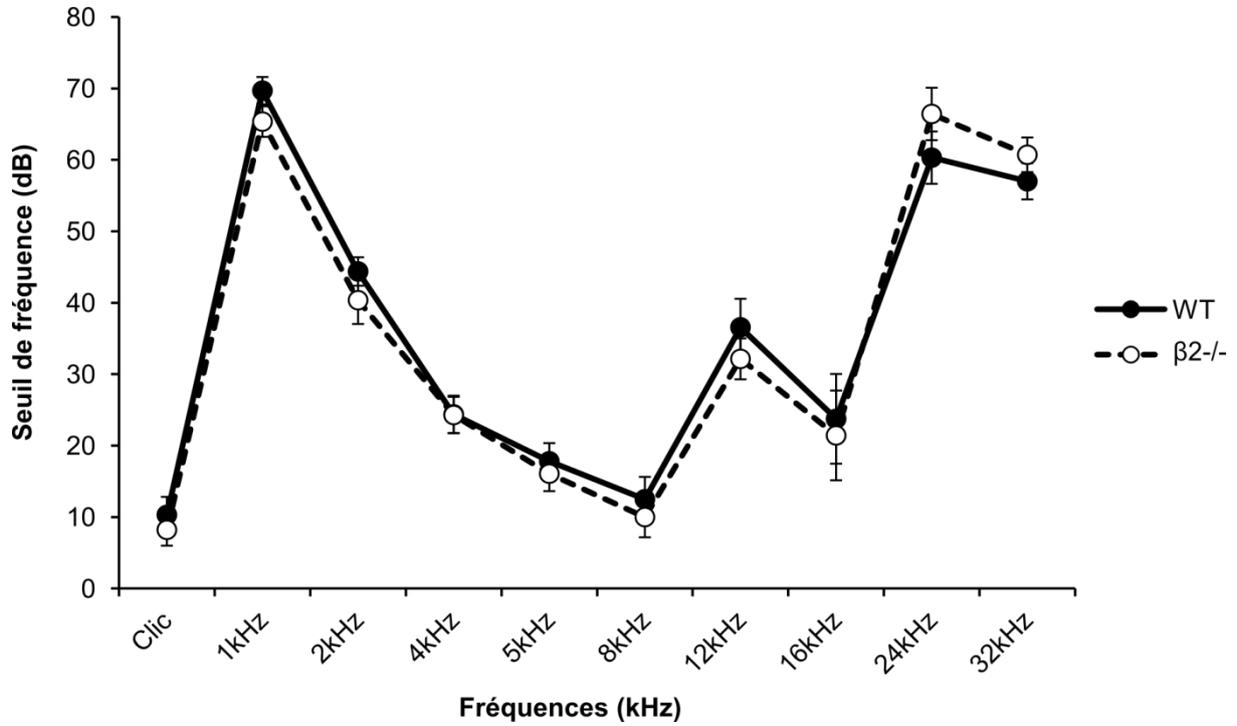


Figure 42: Seuil d'audition à différentes fréquences pour des souris WT (n=16) et $\beta 2$ KO (n=17). Les données sont présentées en moyenne \pm sem.

2.2. Production d'USVs, vers un indice de l'état motivationnel de l'animal.

Dans cette partie, nous nous sommes demandé si les USVs pouvaient être un indice de l'état motivationnel de l'animal. Pour cela nous avons choisi d'enregistrer les vocalisations émises par des individus WT (C57BL6/J) subissant la même tâche d'interaction sociale, mais ayant ou non été isolés avant l'expérience (**Figure 43A**). En isolant les animaux durant les 3 semaines précédant l'expérience, nous émettons l'hypothèse que nous augmentons leur motivation pour l'interaction sociale au dépend de l'exploration de l'environnement. Ainsi lorsque les animaux n'ont pas été isolés, on s'attend à ce que leur motivation pour l'interaction sociale soit moindre que s'ils avaient été isolés.

a. Paramètres acoustiques modulés par la motivation sociale

Dans ce cas de figure, nous avons observé que les dyades d'animaux contenant l'individu précédemment isolés émettent environ deux fois plus d'USVs (318 ± 47.74) que ceux non isolés (135.87 ± 65 ; Test de Mann-Whitney, $U=29.5$, $P=0.024$, **Figure 43B**). Il existe une différence significative entre les deux conditions pour le nombre d'USVs par minute (**Figure 43B**), à savoir que les animaux isolés émettent plus d'USVs par minute (1.32 ± 0.19) que les animaux non isolés (0.56 ± 0.27 , Test de Mann-Whitney, $U=29.5$, $P=0.024$). En plus du nombre de vocalisations, certaines caractéristiques acoustiques différent également. Une analyse détaillée des fréquences d'émissions de ces USVs (fréquence minimale, maximale, de début et de fin, **Figure 43C**) montre que la condition d'élevage précédant l'expérience impacte également les fréquences d'émissions. En effet, les souris isolées ($Pf\ début= 68.2 \pm 1.59$ kHz; $Pf\ min= 62.2 \pm 1.28$ kHz) ne présentent pas de différences significatives pour les fréquences de début et les fréquences minimales par rapport aux souris non-isolées ($Pf\ début= 58.60 \pm 4.85$ kHz, Test de Mann-Whitney $U=37.5$, $P=NS$; $Pf\ min= 54.56 \pm 4.76$ kHz, $U=50$, $P=NS$).

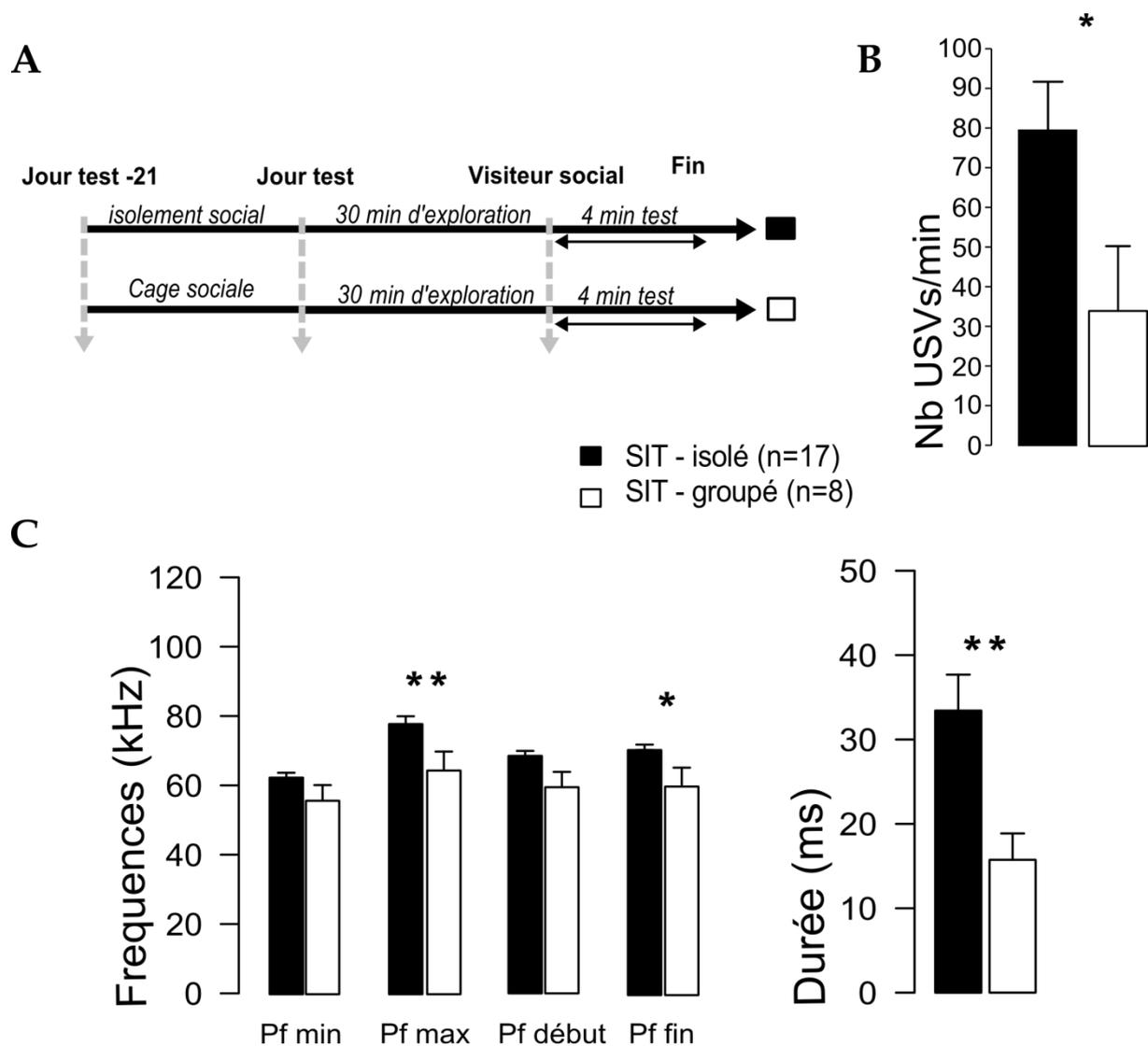


Figure 43: Emissions de vocalisations et motivation sociale. (A) Diagramme temporel schématique des deux conditions expérimentales exposées. D'un côté (en noir) les animaux ayant été isolés précédemment à l'interaction sociale (*SIT-isolé*) et de l'autre un groupe indépendant n'ayant pas été isolé (*SIT-groupé*, en blanc). (B) Nombre d'USVs par minute. (C) Paramètres acoustiques communément observés, de gauche à droite, les paramètres de fréquence minimum (Pf min), maximum (Pf max), de début (Pf début), et de fin (Pf fin), et la durée moyenne de toutes les USVs émises. *SIT-isolé*, n=17 ; *SIT-groupé*, n=8. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ pour les tests de Mann-Whitney.

Par contre malgré le fait que ces deux populations commencent leurs vocalisations approximativement aux mêmes seuils de fréquences, les souris isolées tendent à avoir une fréquence de fin de leurs USVs plus élevée que les animaux non-isolés (SIT-isolés : Pf fin= 70.42±1.7 kHz ; SIT-groupé : Pf fin= 59.58±5.14 kHz, test de Mann-Whitney : U= 32, P=0.03). De plus la fréquence maximale d'émission est également plus élevée en condition isolée qu'en condition non-isolée (SIT-isolé : Pf max= 77.66±2.18 kHz ; SIT-groupé : Pf max= 64.02±5.5 kHz, test de Mann-Whitney : U= 23.5, P<0.01). Les dyades d'animaux dont le résident a été isolé avant l'interaction sociale présente donc des USVs à des fréquences plus élevées que les dyades dont le résident n'a pas été isolé.

Nous avons également montré que les USVs émises par les individus isolés sont plus longues en moyenne que celle des animaux non-isolés (Test de Mann-Whitney, U=112, P<0.01). Ce résultat est probablement dû à la présence de vocalisations plus longues chez les animaux isolés. En effet, la durée moyenne des USVs émises est intimement liée au répertoire vocal des individus et nous avons tenu compte de l'impact de ce répertoire en analysant séparément la durée de chaque type d'USVs (**Figure 44A**).

b. Modification du répertoire vocal

Nous avons observé que les animaux isolés en interaction sociale émettent des vocalisations de type « *Short* », « *composite* », et « *one frequency jump* » plus longues que les animaux non-isolés (*short* : U=104, P=0.03 ; *composite* : U=93.5, P=0.0042 ; *one frequency jump* : U=78, P=0.026). Cette augmentation de durée des principaux types d'USVs au sein du répertoire pourrait expliquer pourquoi les animaux isolés ont une durée moyenne de vocalisations globale plus longue (**Figure 43C**). Tous les autres types d'USVs ont une durée moyenne similaire entre les deux groupes. Nous nous sommes ensuite intéressés au répertoire vocal de ces animaux (**Figure 44B**).

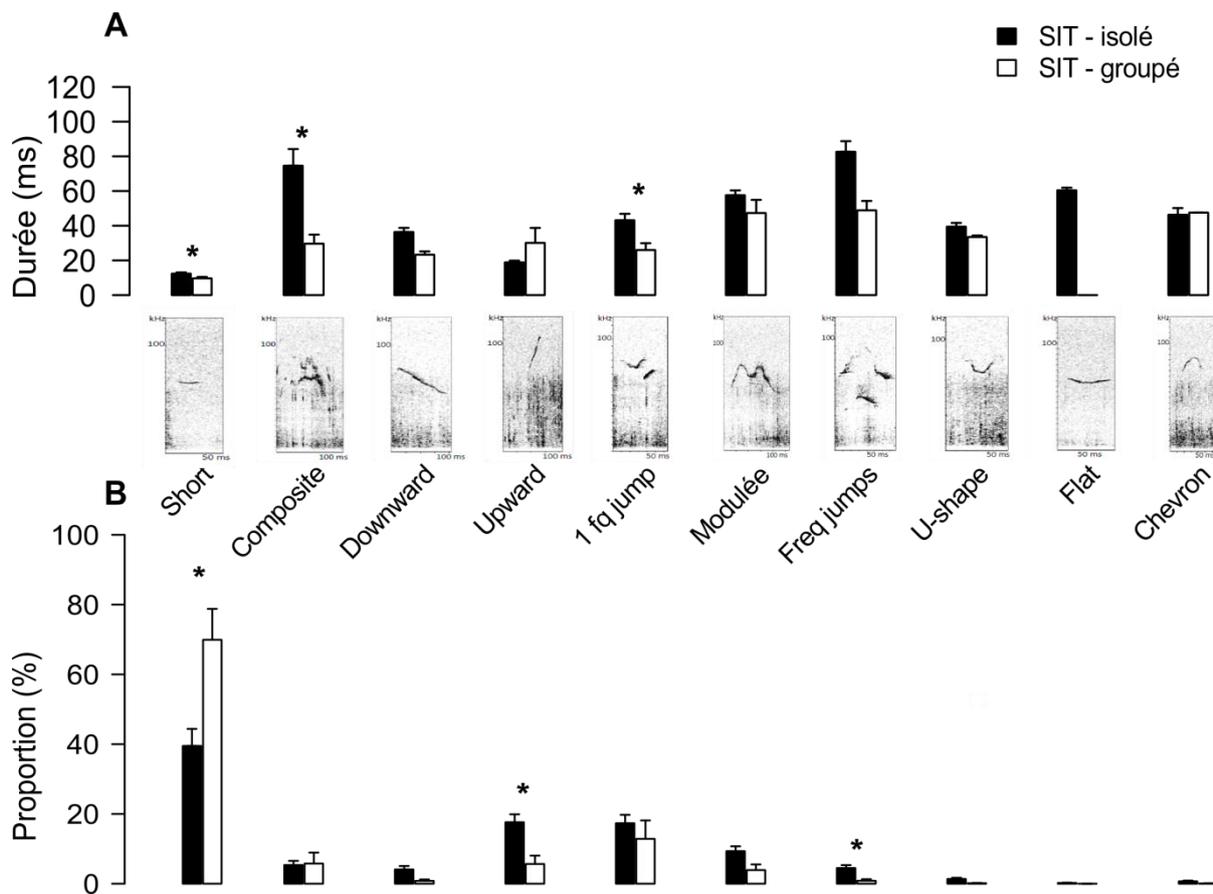


Figure 44: Répertoire vocal et durée des USVs durant l'interaction sociale. (A) Durées moyennes de chaque types d'USVs en millisecondes. (B) Proportion des différentes catégories de vocalisations. SIT-isolé, n=17 ; SIT-goupé, n=8. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05 pour les tests de Mann-Whitney.

De façon générale, l'ensemble des catégories d'USVs sont émises par les animaux isolés et les non-isolés en interaction sociale (**Figure 44B**). Dans les deux cas, la classe majoritairement représentée reste les USVs courtes et sans modulation de fréquence de la catégorie « Short » (SIT-isolé, $39.48 \pm 5.05\%$, SIT-goupé, $69.9 \pm 9.5\%$). Viennent ensuite les USVs ayant un seul saut de fréquence, les « one frequency jump », qui représentent $18.07 \pm 2.54\%$ chez les SIT-isolé et $13.07 \pm 5.68\%$ chez les SIT-goupé. En troisième position des USVs les plus représentées en interaction sociale, nous retrouvons les USVs montantes à fréquence constante, les « Upward » (SIT-isolé, $17.62 \pm 2.34\%$, SIT-goupé, $5.66 \pm 2.56\%$).

Nous avons constaté que les individus non-isolés émettent plus de vocalisations courtes que les individus isolés (Test de Chi², $X^2=8.46$, $P=0.003$). Or nous avons vu que celles-ci sont également relativement plus courtes que chez les SIT-isolé (**Figure 44A**). Comme suggéré précédemment, ceci pourrait expliquer la diminution de la durée moyenne des vocalisations émises par les animaux SIT-goupé. Inversement les animaux ayant été isolés produisent plus de vocalisations de type « *upward* » et contenant plusieurs sauts de fréquences (« *frequency jumps* ») que leurs homologues non-isolés (*upward*, $X^2=6.15$, $P=0.01$; *frequency jumps*, $X^2=4.14$, $P=0.04$). Pour l'ensemble des autres catégories il n'y a aucune différence significative entre les groupes.

c. Production d'USVs et comportement social

Nous avons ensuite analysé les comportements sociaux mis en place lors de l'émission de ces USVs. Nous avons ainsi montré, au sein du groupe d'individus isolés, qu'il existait une corrélation positive et significative entre le nombre d'USVs produites et le temps que les animaux passent au contact social (Corrélation de Spearman, $r_s=0.778$, $P=0.0001$; **Figure 45A**). Aucune corrélation entre ces deux paramètres n'est observable chez les animaux non-isolés ($r_s=0.102$, $P=0.81$; **Figure 45B**). Le même type de corrélation a été effectué pour les trois catégories principales d'USVs émises lors de cette tâche (*Short*, *upward*, *one frequency jump*). Chez les animaux isolés, nous avons observé l'existence d'une corrélation significative, uniquement entre le nombre d'USVs de type « *short* » ($r_s=0.749$, $P=0.0003$), de type « *one frequency jump* » ($r_s=0.60$, $P=0.009$) et le temps dédié au contact social. *A contrario*, aucune corrélation n'est visible entre les nombres d'USVs « *short* », « *upward* » ou « *one frequency jump* » et le temps d'interaction sociale chez les animaux non-isolés (ARTICLE 2, **Figure 3**).

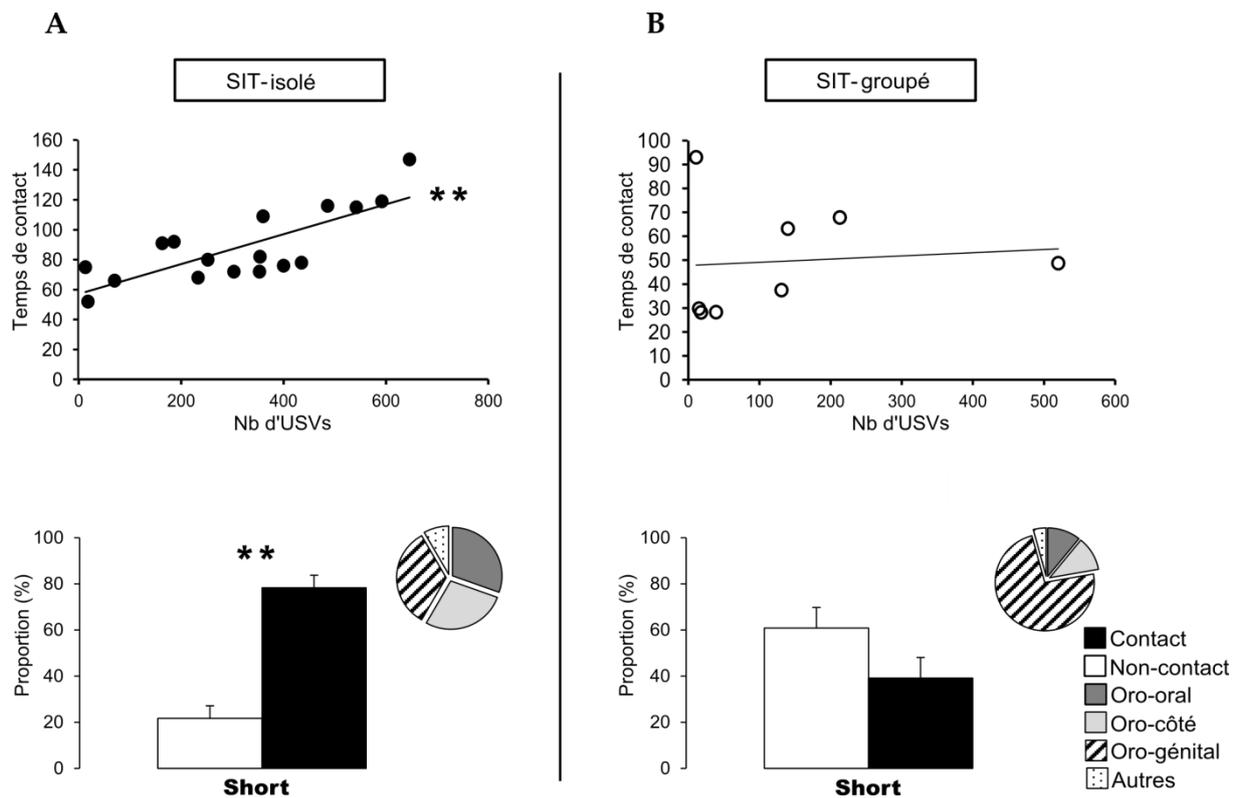


Figure 45: Corrélation entre production de vocalisations et comportement social. (En haut) Relation entre les émissions d’USVs et le contact social pour les animaux isolés (A) et les animaux groupés (B). Répartition des vocalisations majoritaires de type « Short » selon différents types de contacts, Oro-oral, Oro-côté, Oro-génital, et autres (en bas). SIT-isolé, n=17 ; SIT-groupé, n=8. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ pour les corrélations de Spearman et test U de Wilcoxon.

Pour continuer, nous avons déterminé avec précisions quels types de contacts (ou non contact) sont effectués lors de l’émission des grandes catégories d’USVs représentées. Nous avons ainsi pu montrer que les animaux précédemment isolés émettent la majorité de leur USVs durant les phases de contact social, à l’inverse des animaux non-isolés (**Figure 45A & B, bas**). Approximativement 80% des USVs de type « short » sont émises par les individus isolés durant le contact, contre 20% émises quand les souris ne se touchent pas (test de rang de Wilcoxon, $z = -3.24$, $P = 0.0012$; **Figure 45A, bas**). Nous avons observé la même répartition au sein des deux autres classes les plus représentatives (**ARTICLE 2 Figure 4**), à savoir les «upward» ($z = -2.82$, $P = 0.0048$) et les «one frequency jump» ($z = -2.84$, $P = 0.0045$). A l’inverse, chez les souris non-isolées, la majorité des USVs de type short sont émises lors de périodes de non-contact ($60.8 \pm 8.9\%$ en non-contact, contre $39.2 \pm 8.9\%$ en contact ; $z = -1.09$, $P = 0.271$). Il en va de même pour les deux autres catégories (upward, $z = -0.73$, $P = 0.46$; one frequency jump, $z = -$

1.36, $P=0.173$). Une analyse plus approfondie des types de contacts engendrés montre que les souris isolées émettent leurs vocalisations de façon équitable entre les trois types de contacts, oro-oral, oro-génital, oro-côté, et très minoritairement durant les contacts « autres » (**Figure 45A**, bas). A l'inverse, les animaux non-isolés semblent privilégier à plus de 50% les contacts de types oro-génitaux lors de l'émission de leurs vocalisations (**Figure 45B**, bas).

2.3. Une production d'USVs non restreinte aux contextes sociaux

Contrairement à ce qui est suggéré par les données de la littérature, l'émission de vocalisation par les souris n'est pas restreinte à des contextes sociaux. En effet, nous avons au cours de nos travaux mis en évidence l'émission d'USVs au cours de différents contextes non sociaux chez les souris C57BL6/J. Par ailleurs, l'étude approfondie de ces USVs pose la question du rôle de ces USVs lors de tâche non social. Et quelle est la différence avec les USVs émises lors de l'interaction sociale.

a. Paramètres acoustiques lors de tâches non sociales

Nous avons ainsi enregistré des USVs lors de l'exploration d'environnement (EXPLO) et durant un stress de contention (Contention). Comme précédemment décrit pour l'exploration d'environnements (matériels & méthodes sections 4 & 6) deux groupes d'animaux ont été utilisés, un groupe isolé durant trois semaines avant l'exploration (EXPLO-isolé), et l'autre non isolé (EXPLO-Groupé ; **Figure 46A**).

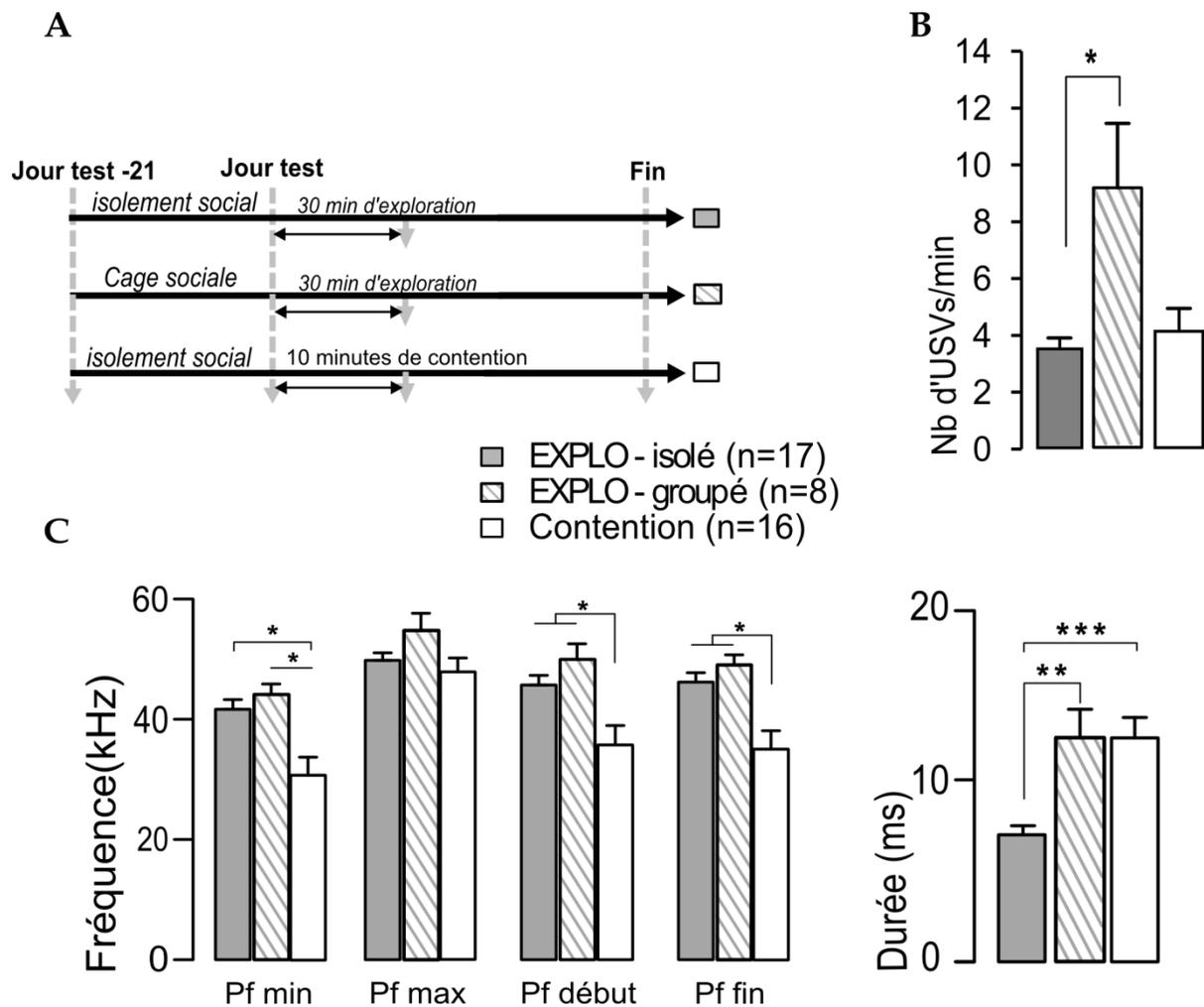


Figure 46: Emissions de vocalisations lors de l'exploration et de la contention. (A) Diagramme temporel schématisant des trois conditions expérimentales exposées. (Barres grises) les animaux ayant été isolés précédemment à l'exploration d'environnement (*EXPLO-isolé*), les animaux n'ayant pas été isolés (*EXPLO-goupé*, barres rayées), et enfin les animaux ayant subi un stress de contention (*Contention*, barres blanches). (B) Nombre de vocalisations par minute. (C) Paramètres acoustiques communément observés, de gauche à droite, les paramètres de fréquence minimum (Pf min), maximum (Pf max), de début (Pf début), et de fin (Pf end), et la durée moyenne de toutes les vocalisations émises. *EXPLO-isolé*, n=17; *EXPLO-goupé*, n=8, *Contention*, n=16. Les données sont présentées en moyenne \pm sem. Effet groupe testé avec un test de Kruskal-Wallis, et * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ pour test *post-hoc* de Mann-Whitney après correction du seuil (Bonferroni).

Au cours de ces différentes tâches, nous avons montré que le nombre de vocalisations émises était très amoindri par rapport aux contextes sociaux. En effet le nombre total de vocalisation ne dépasse pas 50 USVs lors de l'exploration des animaux non-isolés, alors qu'en interaction sociale dans les mêmes conditions, il était de 100 vocalisations environ. Pour ces trois conditions expérimentales une analyse de variance réalisée grâce à un test non paramétrique montre un effet de la condition expérimentale sur le nombre d'USVs émises par minute (test des variances 1 voie Kruskal-Wallis, $H_2=7.64$, $P=0.02$; **Figure 46B**). En effet les animaux préalablement isolés émettent significativement moins d'USVs que leurs homologues non-isolés en exploration d'environnement (comparaison 2 à 2 test de Mann-Whitney, $U=17.5$, $P=0.006$).

Les animaux en contention émettent autant d'USVs que les animaux isolés en exploration d'environnement ((Kruskal-Wallis effet groupe, $H_2=7.64$, $P=0.02$; contention*EXPLO-isolé : $U=117$, $P=0.90$; **Figure 46B**). De même, les animaux non isolés en exploration émettent plus de vocalisations à la minute que les autres groupes (EXPLO-goupé*EXPLO-isolé, $U=17.5$, $P=0.006$; EXPLO-goupé*Contention, $U=27$, $P=0.02$; EXPLO-isolé*Contention, $U=117$, $P=0.90$).

Comme pour les vocalisations émises en interaction sociale, nous avons réalisé des mesures de fréquences sur les USVs émises lors de ces tâches non sociales (**Figure 46C**). Nous avons montré qu'il existe un effet groupe pour les mesures de fréquences minimales (Pf min, Kruskal-Wallis effet groupe, $H_2=13.48$, $P=0.001$), fréquences de début (Pf Début, Kruskal-Wallis effet groupe, $H_2=12.92$, $P=0.001$), et fréquences de fin (Pf end, Kruskal-Wallis effet groupe, $H_2=14.42$, $P=0.0007$). En effet les souris en contention émettent des USVs à plus basses fréquences que lors de l'exploration d'environnement isolé ou non (**Pf Début**, Contention : 35.7 ± 2.9 kHz ; EXPLO-isolé : 45 ± 1.6 kHz ; EXPLO-goupé : 50.8 ± 3.3 kHz, **Pf end**, Contention : 35.3 ± 2.8 kHz ; EXPLO-isolé : 45.7 ± 1.5 kHz ; EXPLO-goupé : $49.3.8\pm 2.2$ kHz). Les fréquences de début, et de fin des USVs en contention sont significativement plus basses que celles des individus EXPLO-isolés (respectivement Pf Début, $U=52$, $P=0.007$; Pf end, $U=39$, $P=0.001$), ou EXPLO-goupés (Pf Début, $U=13$, $P=0.001$; Pf end, $U=16$, $P=0.003$). De même, les souris en contention émettent des USVs dont la fréquence minimale est beaucoup plus basse (30 ± 2.7 kHz) que les souris EXPLO-goupé (43.9 ± 1.6 kHz, test *post-hoc* de Mann-Whitney, $U=16$, $P=0.003$), ou les souris EXPLO-isolé (40.5 ± 2.4 kHz, $U=43$, $P=0.002$).

De manière intéressante, l'analyse de la durée moyenne des vocalisations émises (**Figure 46C**) révèle une différence significative entre les groupes. Cette différence est due au fait que les animaux isolés en exploration émettent les USVs les plus courtes. En effet, en condition EXPL0-isolé, les animaux émettent des USVs qui sont plus courtes que celle émisent par les animaux EXPL0-goupé ($U=10$, $P<0.001$), ou encore par les animaux en contention (Contention, $U=18$, $P<0.0001$). Cette différence de durée moyenne des USVs est fortement liée à la composition du répertoire vocalisant des animaux. Nous avons tenu compte de cela dans notre analyse en séparant les durées moyennes pour chaque catégorie d'USVs au sein de ces trois groupes (**Figure 47A**).

b. Répertoire vocal et situations non sociales

Nous avons observé que les animaux isolés en exploration émettent des vocalisations de type « *short* » plus courtes que les animaux non-isolés ($U=16$, $P=0.003$), et que les animaux en contention ($U=6$, $P<0.0001$). Il en va de même pour les vocalisations de type « *composite* » (EXPL0-isolé*EXPL0-goupé, $U=10$, $P<0.001$; EXPL0-isolé*Contention, $U=26$, $P<0.0001$). Nous avons ensuite étudié le répertoire vocal de ces animaux (**Figure 47B**). Nous avons ainsi pu montrer que les proportions d'USVs de type « *short* », « *downward* », « *upward* », « *modulated* », ou encore « *frequency jumps* » ne varient pas entre les groupes. A l'inverse, il y a un effet groupe majeur pour les USVs de type « *composite* » (Kruskall-Wallis, $H_2=12.13$, $P=0.002$) et « *one frequency jump* » ($H_2=14.91$, $P=0.0006$). En effet les animaux EXPL0-goupé émettent moins de « *composite* » que les EXPL0-isolé ($X^2=8.85$, $P=0.003$), et que les animaux en contention ($X^2=17.22$, $P<0.0001$). Par contre, ils émettent plus d'USVs avec un seul saut de fréquence, « *one frequency jump* » (EXPL0-goupé*EXPL0-isolé, $X^2=4.86$, $P=0.02$; EXPL0-goupé*Contention, $X^2=11.85$, $P<0.001$).

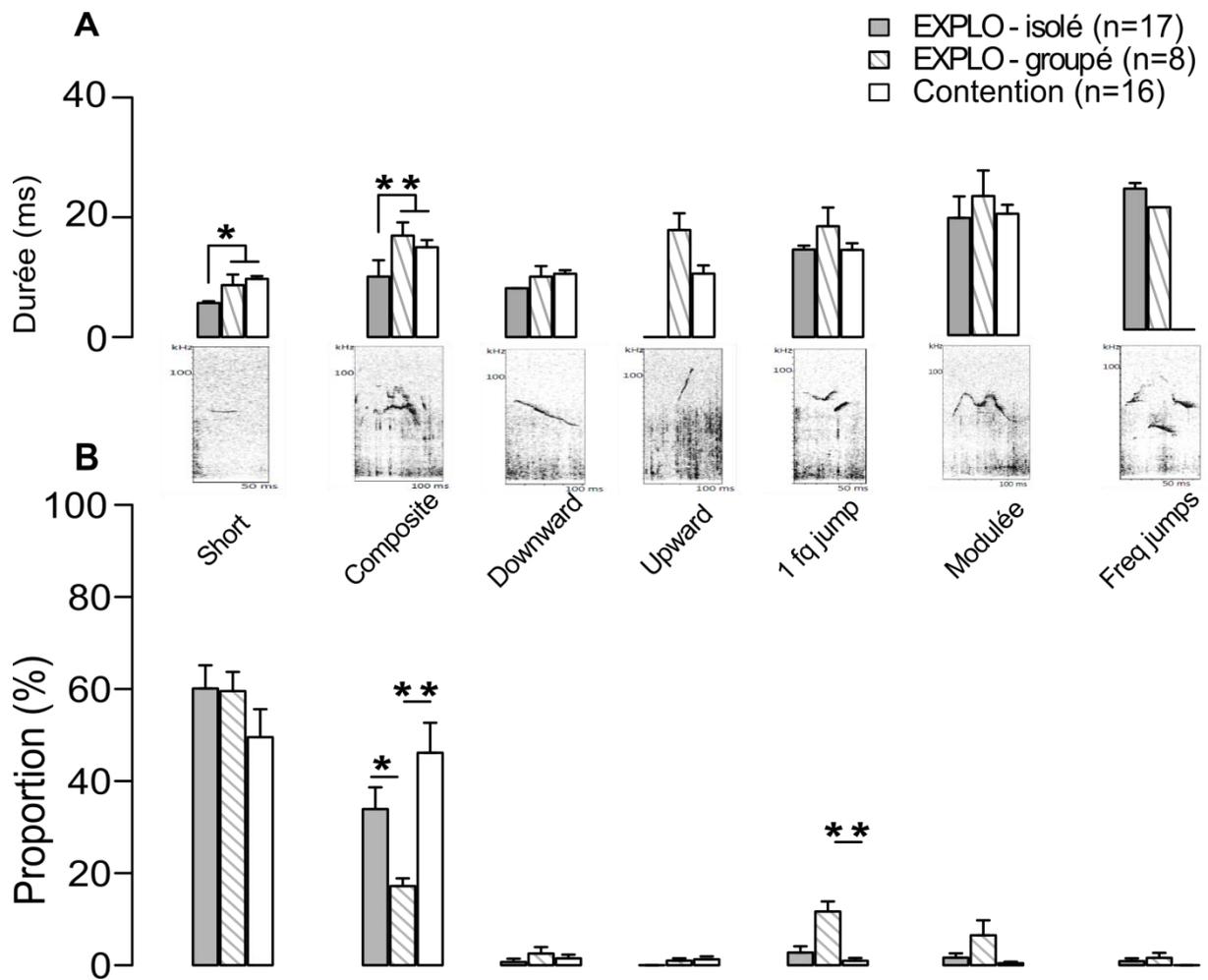


Figure 47: Répertoire vocal et durée des USVs durant les tâches non sociales d'exploration et de contention. (A) Durée moyennes de chacune des USVs en millisecondes. (B) Proportion des différentes catégories de vocalisations. EXPLO-isolé, n=17; EXPLO-goupé, n=8, Contention, n=16. Les données sont présentées en moyenne \pm sem. Effet groupe testé avec un test de Kruskal-Wallis, et * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ pour les tests *post-hoc* Chi-deux (A) et Mann-Whitney (B) après correction du seuil (Bonferroni).

Comme précédemment suggéré la composition du répertoire influence de manière non négligeable la durée moyenne des USVs émises. En effet, les données de la **Figure 47** confirment que les animaux du groupe EXPLO-isolé émettent autant d'USVs « *short* » que les autres groupes, mais que celles-ci sont plus courtes. De même, ils tendent à émettre autant de « *composite* » que les animaux en contention, mais celles-ci sont également plus courtes chez les animaux EXPLO-isolé. Alors que pour la même catégorie, les animaux du groupe EXPLO-goupé en émettent moins mais les leurs sont plus longues.

Tableau 5: Récapitulatif des résultats principaux concernant les émissions d'USVs au sein des différentes conditions expérimentales

	Nombre d'USVs	Fréquences d'émissions	Corrélation au comportement social
SIT	Isolé>groupé	Isolé>groupé	Isolé : oui Groupé : non
EXPLO	Groupé>Isolé = Contention	Groupé>Isolé>Contention	

Discussion :

Production de vocalisations ultrasonores, motivation sociale et contexte d'étude comportemental

Synthèse des résultats:

Les données obtenues dans différentes conditions sociales, en faisant varier le niveau d'indice social délivré aux l'animaux, montrent l'importance du « feedback » social. Le niveau d'émission, le répertoire, ainsi que la fréquence d'émission des vocalisations est d'autant plus important que la situation permet une interaction sociale directe. Grâce à une étude comparée nous avons également pu comparer les profils d'émissions d'USVs entre les souris WT et β 2KO lors de ces différents contextes sociaux. Nous avons ainsi pu montrer que les USVs des souris β 2KO ne sont jamais corrélées au comportement social, contrairement aux WT. De plus, des données non encore publiées de l'équipe montrent que lors de l'interaction sociale entre deux animaux β 2KO n'entraîne pas la production d'USVs.

Par ailleurs, nous avons comparé les émissions de vocalisations d'animaux WT préalablement isolés ou non pendant la tâche de SIT. Nous avons montré que lorsque les animaux sont motivés pour l'interaction sociale (en isolant les animaux), ils émettent un plus grand nombre d'USVs, à des fréquences plus élevées (75kHz environ), avec un répertoire différent par rapport aux animaux non isolés. De plus, contrairement aux animaux non isolés, l'isolement social entraîne une émission d'USVs directement corrélée au comportement de contact social, avec plus de 80% des USVs émises durant ces phases de contact. Ces résultats suggèrent donc un rôle primordial des USVs, elles pourraient être le reflet du « plaisir » éprouvé par le contact social. En effet, une des hypothèses alternatives à l'isolement social est qu'en isolant les animaux, non seulement ils sont plus motivés, mais leur état émotionnel change. Entraînant ainsi une modification de leurs émissions d'USVs vis-à-vis des animaux non isolés.

Pour finir, de façon intéressante et totalement nouvelle, nous avons observé que des USVs peuvent être émises dans de multiples situations non sociales. Ces résultats nous ont permis d'apprendre que le nombre d'USVs, le répertoire vocal ainsi que les paramètres acoustiques (fréquence, durée des USVs, occurrence d'émission...etc.) varient en fonction des conditions comportementales. La condition plus stressante (contention) présentant un profil d'émission particulier, avec un nombre d'USVs restreint et des fréquences d'émission très basses (35kHz environ).

1. La production d'USVs contexte-dépendante

Nos présents résultats détaillent le comportement vocal des souris adultes lors de tâche d'interaction entre deux souris de même sexe, ou lors d'autres contextes, sociaux ou non. Cette étude montre que le nombre total d'USVs émises, le nombre d'USVs par minute, le répertoire vocal, la fréquence d'émission, ainsi que la durée moyenne des USVs peuvent varier en fonction des contextes.

Les contextes de production de vocalisations ultrasonores

Depuis près de 50 ans, il est très bien connu que les rongeurs émettent des USVs particulièrement en présence de congénère (Yajima & Hayashi 1983a; Panksepp & Lahvis 2007; Scattoni, Gandhi, et al. 2008; Burgdorf et al. 2008; Scattoni et al. 2010; Panksepp et al. 2007; Holy & Guo 2005; Brudzynski 2007). Notamment lors d'interactions directes entre mâles et femelles (White et al. 1998; Hammerschmidt et al. 2009; Scattoni et al. 2010), entre femelles et juvéniles (D'Amato et al. 2005; Wöhr et al. 2008), ou lors d'interaction entre individus de même sexe (Scattoni et al. 2010; Panksepp et al. 2007). Toutefois, ces USVs peuvent également être associées à la présentation d'indices indirects, tels que la présentation d'urine ou encore l'émission de playback en bande sons (Wöhr & Schwarting 2007; Hoffmann et al. 2009).

Malgré la diversité des conditions d'enregistrement, il flotte une idée dans la littérature que les souris ne vocalisent pas lors de conditions aversives telle que la contention physique ou lors de chocs électriques (Portfors 2007). Cependant, chez le rat et contrairement aux souris, de nombreuses données existent sur la production de d'USVs lors de situations

aversive et/ou d'agressivité (Brudzynski & Ociepa 1992; Brudzynski & Chiu 1995; Brudzynski & Pniak 2002; Borta et al. 2006; Hegoburu et al. 2011). Nos résultats montrent donc pour la première fois, que nous sommes capables d'enregistrer des USVs dans diverses conditions sociales mais aussi lors de conditions non sociales, ou lors de conditions aversives comme la contention. En effet, nous avons observé que les animaux étaient capables d'émettre des vocalisations lors de la tâche de contention, mais aussi lors de l'exploration de l'environnement peu importe si ils avaient été isolés ou non avant l'expérience. Cependant le nombre moyen d'USVs émises lors de l'exploration est très largement inférieur à celui observé lors de l'interaction sociale (diminution de 88 %). La fonction de ces USVs en exploration d'environnement reste encore à définir. Il serait en effet intéressant de comparer les émissions d'USVs lors de tels contextes entre des animaux WT et des souris mutantes modèles de l'autisme (Ey et al. 2011; Schmeisser et al. 2012). En effet, la comparaison de telles USVs non sociales, entre des WT et des mutants, pourrait nous permettre de distinguer les déficits généraux de l'émission des USVs et les déficits spécifiques dans l'émission de signaux à caractère social. Il serait également intéressant d'étudier l'émission d'USVs chez des animaux hypo ou hyper anxieux lors de ces tâches d'exploration d'environnement. Ces études nous permettraient d'éclaircir les relations entre état émotionnels et émissions d'USVs dans un contexte non social.

L'expression vocale de l'état émotionnel chez la souris

L'utilisation de plusieurs tâches (sociales et non) nous a surtout permis de renforcer l'idée que l'expression vocale chez les mammifères est étroitement liée à l'état émotionnel et motivationnel de l'individu produisant les vocalisations (Briefer 2012). En effet, nos résultats montrent une nette différence de niveau de vocalisations entre les conditions sociales (SIT) et les conditions non sociales (EXPLO et Contention). Lors de l'interaction sociale, les animaux émettent un grand nombre d'USVs, qui représentent bien plus du double de ce que l'on observe lors de l'exploration d'environnement ou lors de la contention. Cette observation suggère que lors de la SIT, l'enregistrement d'un grand nombre d'USVs n'est pas seulement dû à la présence de deux animaux dans la cage. Bien qu'aujourd'hui nous sommes encore incapables de différencier quel individu vocalise à quel moment, il reste bien évidemment possible que les deux animaux (le résident test et le visiteur social) sont susceptibles de vocaliser lors de cette tâche. Néanmoins, lors de la contention nous enregistrons un nombre d'USVs extrêmement bas (4 USVs/min), alors que lors de l'exploration, ce niveau est plutôt

intermédiaire (EXPLO-isolated : 4 USVs/min, EXPLO-grouped : 9 USVs/min). En SIT ce taux d'émission est relativement élevé (entre 35 et 80 USVs / min). Cette augmentation du nombre d'USVs reflète probablement la différence d'état émotionnel dans lequel se trouvent les animaux selon qu'ils se trouvent en situation plaisante (SIT : état émotionnel positif), en situation non sociale à caractère légèrement stressant (EXPLO : état émotionnel neutre) ou lors de situations aversives (contention ; état émotionnel plutôt négatif). Nos données vont dans le même sens que le concept de « règle structurelle de motivation » émit par Morton en 1977 (Morton 1977). En effet, selon Morton, les vocalisations produites dans un contexte « hostile » doivent être structurellement différentes de celles émises dans un contexte « amical » ou de « peur ». Cette théorie est basée sur l'observation de vocalisations émises par de nombreuses espèces d'oiseaux mais aussi de mammifères. Elle suppose que dans un contexte hostile, les animaux ont tendance à émettre des sons de basse fréquence (imitant ainsi le son d'un animal plus gros, trompant le receveur quand à la taille réelle de l'émetteur), et émettent des sons de haute fréquence lors de contextes plaisants ou de peur (reproduisant les sons produits par les enfants, censé apaiser le receveur). Chez l'humain, il est maintenant bien décrit que les émotions affectent profondément la prosodie (House et al. 1987; Briefer 2012). Les émotions induisent en effet un changement dans les systèmes nerveux somatique (SNS) et autonome (SNA), qui modifient aussi bien l'action et la tension des muscles utilisés pour la production de la voix (phonation, résonance et articulation, contrôlées par le SNS), que le rythme respiratoire et la salivation (sous contrôle du SNA). Toutes ces modifications de l'appareil vocal induisent des changements particuliers dans les caractéristiques de la voix (Scherer 2003).

Tout au long de ce chapitre, les données obtenues nous montrent que la fréquence d'émission des USVs diffère selon les conditions d'expérimentations. Les USVs associées aux conditions sociales sont émises à des

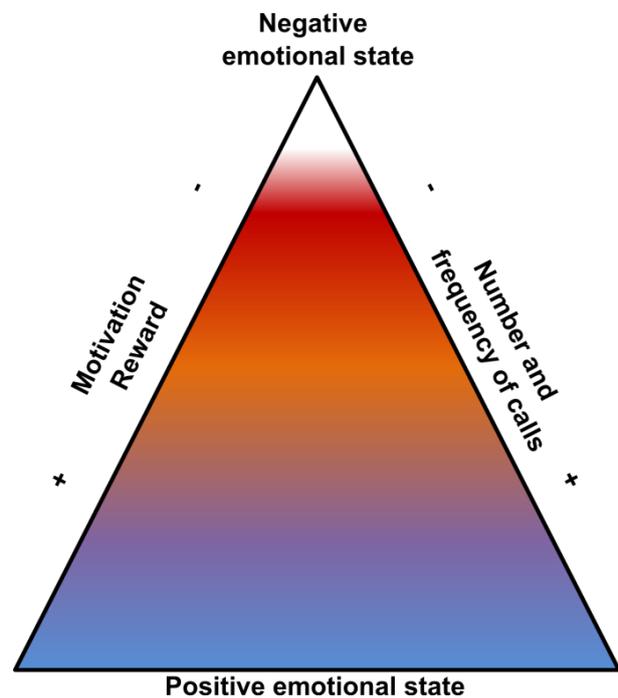


Figure 48: interprétation de la relation entre USVs et état motivationnel.

fréquences très hautes (environ 75 kHz), tandis que les USVs à fréquences plus basses (environ 35kHz) sont enregistrées lors de la contention. Ces changements au sein de la fréquence d'émission en fonction du contexte semblent être retrouvés chez de très nombreuses espèces (e.g., rat, chien, humain, primate non-humain, oiseaux) au sein desquelles l'état émotionnel et motivationnel induit un changement de prosodie (Bollen et al. 2007; Burgdorf et al. 2008; Brudzynski 2007; Brudzynski & Ociepa 1992; Hegoburu et al. 2011; Litvin et al. 2007; Fendt et al. 2006; Scherer & Zei 1988; Briefer 2012). La plupart des études montrent, en accord avec le concept de Morton, que les vocalisations émises lors de rencontres agonistiques sont de longues durées, de basses fréquences, et de faibles modulations de fréquence. A l'inverse les vocalisations produites durant des contacts non-agressifs, sont souvent courtes, hautes et modulées en fréquences. Nos résultats concernant les différences de fréquences tendent à renforcer ces données (**Figure 48**), mais nous observons à l'inverse que les USVs émises lors de la tâche d'interaction sociale sont plus longues que les USVs des autres conditions non sociales. Cette différence est principalement due au fait que le répertoire vocal chez les animaux en SIT est beaucoup plus large que celui des animaux en exploration ou même lors de la contention. En effet, les souris émettent des USVs de type « short » et « composite » dans toutes les conditions. Cependant, les souris émettent plus de vocalisations à durée plus longue, telles que les « upward », « modulée », « multiple frequency jump », « U-Shape », « chevron », et « flat » en SIT que lors des conditions non sociales. Les « short » et les « composite » pourraient alors représenter des vocalisations plus « **basiques** » retrouvées dans n'importe quelles conditions, tandis que les autres types seraient plus « **informatifs** » du contenu comportemental, émotionnel, ou motivationnel. Au cours de l'évolution de la transmission des signaux, différentes pressions sont survenues dans la conception des signaux en fonction du type d'information, **publique** ou **privée**, que l'on souhaite faire passer (Mc Gregor & Dabelsteen 1996). De cette façon, les USVs émises durant l'interaction sociale pourraient être assimilées à de l'information « **privée** », transmise à faible portée, sachant que les hautes fréquences diffusent moins dans l'environnement et sont plus vite absorbées que les basses fréquences. Inversement les USVs émises lors de la contention seraient plus « **publiques** », destinées à une audience plus lointaine en guise d'avertissement ou de signaux de détresse. Ainsi les USVs plus « **basiques** » émises en contention seraient similaires aux cris de 22-kHz émis chez le rat en tant que cris d'alarme lors de tâches aversives (Borta et al. 2006; Litvin et al. 2007; Brudzynski 2007). Notons toutefois que les cris d'alarmes émis chez le rat possèdent des caractéristiques précises (fréquence moyenne à 22 kHz, et longue durée) que ne possèdent pas les USVs

enregistrées lors de notre tâche de contention. Cette différence souligne un peu plus les divergences qui existent entre les études chez le rat et celles chez la souris.

Importance des USVs dans les relations sociales

Chez l'humain comme chez l'animal, les indices sur l'état émotionnel distillés par l'individu vocalisant jouent un rôle important dans la régulation des comportements sociaux. Ils informent l'individu receveur des possibles intentions comportementales de l'autre (Panksepp 2009; Briefer 2012). Par exemple, un signal émis dans contexte amical implique que l'émetteur est dans un état émotionnel positif, et qu'il ne risque pas d'attaquer. Pour ces raisons, et selon Brudzynski S. (Brudzynski 2007), la corrélation entre la production vocale et l'état émotionnel revêt une importance toute particulière au sein des espèces sociales. De plus, le réseau cérébral à l'origine de la production d'USVs chez les mammifères est aujourd'hui bien détaillé (Arriaga & Jarvis 2011; Jürgens 1994; Jürgens 2002; Jürgens 2009). Il a notamment été montré que, chez le primate non-humain, le cortex antérieur cingulaire (ACC) joue un rôle dans l'initiation volontaire des vocalisations, tandis que la substance périaqueducale (PAG) joue un rôle dans les mécanismes de production de vocalisations élémentaires (Jürgens 1994; Jürgens 2009) et est activé durant le langage chez l'homme (L. a O'Connell & H. a Hofmann 2011; Schulz et al. 2005). En effet, chez l'Homme comme chez le primate, des lésions de l'aire PAG entraînent un mutisme complet (Jürgens 1994; Esposito et al. 1999). De plus, il semblerait que la PAG ne participe pas à la coordination motrice des vocalisations elles-mêmes, mais plutôt au couplage entre motivations spécifiques (issues de différents états internes et externes) et expression vocale correspondante (Ploog 1988; Jürgens 1994). Très récemment, une étude phylogénique à grande échelle a mis en évidence la conservation d'un réseau cérébral dédié au comportement social (O'Connell & Hofmann 2012). Dans ce réseau, la PAG tient un rôle central et possède une interconnexion forte avec de nombreuses structures cérébrales, notamment avec le système de récompense (**Figure 49**). Il est intéressant de noter la présence et l'implication de la PAG dans deux processus aussi différents que sont la production de vocalisations et le comportement social, mais qui, semble-t-il, sont intimement liés. Nous verrons plus tard dans cette discussion que lors de l'interaction sociale, les USVs émises par la souris sont fortement corrélées aux contacts sociaux et possèdent probablement un rôle dans l'établissement et le maintien des contacts sociaux affiliatifs entre les individus.

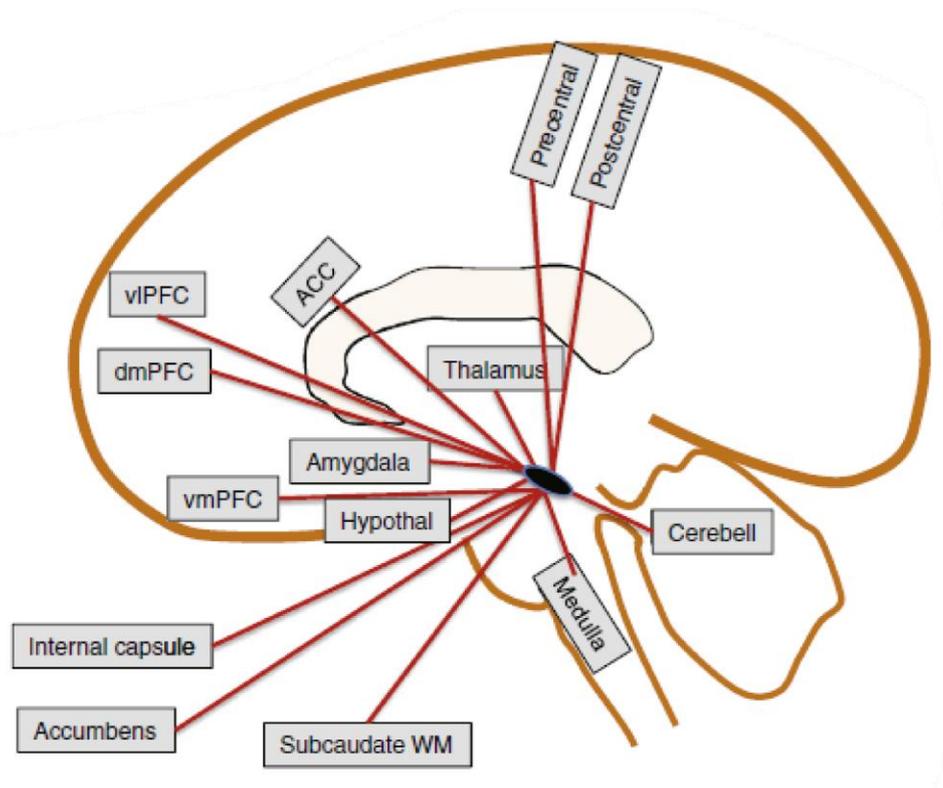


Figure 49: Représentation schématique des régions connectées à PAG chez l'homme basée sur la mesure du tenseur de diffusion. Abréviation : ACC : cortex cingulaire antérieur ; Cerebell : cervelet ; dmPFC : CPF dorsomédian ; vmPFC : CPF ventromédian ; vIPFC : CPF ventrolatéral ; WM : matière blanche (adaptée de Linnman et al. 2012).

2. L'expérience sociale influence le comportement vocal

Comme abordé dans le chapitre 1, nous avons vu que lors de la SIT, il fallait opter pour une balance fine entre motivation sociale et motivation pour l'exploration d'environnement en jouant sur l'isolement et l'habituation des animaux avant la tâche. De manière simple nous avons vu que lorsque les animaux WT ne sont pas isolés, le temps qu'ils passent au contact du congénère est très faible par rapport au temps passé à l'exploration. Nos résultats sur l'émission de vocalisations montrent comment ces USVs sont justement influencées par les conditions d'élevage avant expérimentation. En effet, partant du fait que l'isolement joue le rôle de modulateur de l'état motivationnel de l'animal, les souris en condition isolées seraient plus motivées pour l'interaction sociale que les souris non isolées et élevées en groupes. Cette modulation entraîne une modification considérable de l'émission d'USVs. Notamment, les souris en condition isolées (SIT-isolé) émettent plus d'USVs, plus longues, à

un taux plus élevé, et à des fréquences plus hautes, que leurs homologues non isolées. Ces résultats renforcent les résultats montrant que la modulation du renforcement social module fortement l'émission d'USVs chez le rongeurs (Panksepp & Lahvis 2007; Fendt et al. 2006; Moles et al. 2007; Wöhr & Schwarting 2009), comme cela a été montré chez le primate (Schehka et al. 2007). Nos résultats montrant que les individus élevés en groupe émettent moins d'USVs, sont cohérents avec des résultats précédents montrant que des individus mâles socialement expérimentés (ayant déjà rencontré un congénère de même sexe) émettent moins d'USVs que les individus inexpérimentés, n'ayant jamais rencontré de congénère (Hoffmann et al. 2009). Les animaux doivent être motivés pour l'interaction sociale, par l'isolement social, pour émettre plus d'USVs. De récentes données exposent que les contacts sociaux (autres qu'à but reproductif, ou dans les relations mère-petit) peuvent être motivant pour l'animal, démontrant ainsi l'intérêt de la motivation sociale dans l'établissement des contacts sociaux (Panksepp & Lahvis 2007). A notre connaissance, nos résultats sont les premiers montrant que cette motivation sociale impacte le nombre ainsi que les caractéristiques acoustiques des USVs. De la même façon, nous avons montré que les animaux isolés émettent des USVs à des fréquences plus élevées que les souris non isolées en SIT, renforçant l'hypothèse abordée précédemment, d'une relation étroite entre l'état motivationnel de l'animal et la fréquence d'émission des USVs (Brudzynski 2007). En effet, chez le rat la distinction nette entre deux types d'USVs obtenues dans des conditions positives ou négatives, a permis de soulever cette question. Brudzynski S. a alors suggéré que l'activation d'une portion précise du système ascendant cholinergique induit invariablement un état émotionnel négatif et l'émission d'USVs de basses fréquences (exemple : 22 kHz), tandis que l'activation du système dopaminergique induit un état positif et donc l'émission d'USVs de haute fréquences (exemple : 50 kHz). Ces données sont largement appuyées par des études pharmacologiques d'une part (Brudzynski 2001; Burgdorf et al. 2001; Wintink & Brudzynski 2001; B. Thompson et al. 2006), et d'immunohistochimie d'autre part (Sadananda et al. 2008). Cependant de nombreuses études reportent également l'implication du système glutamatergique (Wintink & Brudzynski 2001; Brudzynski & Pniak 2002). Dans notre cas, les USVs émises lors de la tâche d'interaction sociale sont pour la plupart à des seuils de fréquences élevés (au dessus de 60 kHz). Ainsi, et selon cette dichotomie basée sur des critères de fréquences entre deux types d'USVs, il semblerait que lors du contact social, l'activation du système dopaminergique entraîne l'émission d'USVs à haute fréquence. Chez le diamant mandarin, il a récemment été montré que le système dopaminergique (l'ATV et la SNpc plus précisément) jouait un rôle

dans la modulation de l'activation des aires impliquées dans la production du chant lors de différents contextes sociaux (Hara et al. 2007). Ainsi, une différence dans la valeur du renforcement social, selon que les animaux sont peu ou très motivés pour l'interaction sociale, pourrait expliquer la variation de fréquence des USVs observée dans nos résultats entre SIT-isolé et SIT-groupé.

Un fort taux de motivation sociale semble également générer une forte corrélation entre les émissions d'USVs et le comportement social. En effet, en condition d'interaction sociale où les animaux tests ont été isolés, et seulement dans celle-ci, nous observons une corrélation positive significative entre le temps passé au contact du congénère et le nombre d'USVs : en condition SIT-isolé, plus de 80% des USVs sont émises lors d'épisode de contact, contre à peine 40% en condition SIT-groupé. Ces résultats suggèrent que la motivation d'un seul des deux animaux engagé dans l'interaction sociale est un modulateur de l'émission d'USVs. De plus, nos résultats étendent ce qui a déjà été trouvé chez les souris juvéniles et femelles, pour lesquelles le nombre d'USVs est fortement lié au temps passé à l'investigation sociale (J B Panksepp et al. 2007; Moles et al. 2007). Par ailleurs, lors de la SIT, les souris précédemment isolées émettent des USVs plus longues que leurs homologues maintenues en groupes. Cette différence tient également au fait que la composition du répertoire vocal varie entre les deux groupes. Les animaux en SIT-isolé émettent moins d'USVs « short » (donc courtes) et plus d'USVs « modulées » et autres USVs plus longues (telles que les « jump »). L'effet inverse est observé en exploration d'environnement. En effet, en EXPLO, les animaux précédemment isolés, émettent des USVs globalement plus courtes que les souris maintenues en groupe. Les raisons et mécanismes de l'influence de la motivation sociale durant l'exploration d'un nouvel environnement restent à déterminer. Mais lors de la SIT, les USVs émises par une souris adulte mâle lors des contacts, et avec des caractéristiques acoustiques spécifiques semblent avoir une certaine utilité sociale, indépendante de l'aspect reproductif ou agressif.

3. Renforcement social et USVs chez WT et β 2KO

Une motivation sociale suffisante pour l'établissement de certains types de comportements semble être cruciale pour la production de vocalisations. En effet, le degré de motivation est fortement influencé par la probabilité de recevoir le renforcement, mais aussi, et surtout, par la force de ce renforcement (Berridge & Robinson 1998; Berridge 2004;

Burgdorf & Panksepp 2006; Robinson & Berridge 2008). Nous avons donc étudié l'importance du renforcement social direct ou indirect dans l'émission de vocalisation chez les animaux WT et β 2KO. Nous avons montré que chez les souris β 2KO, le comportement social était altéré. Etant donnée la relation qui existe entre la production d'USVs et le contact social, qu'en est-il de la production d'USVs en contexte social ? Pour cela nous avons choisi l'étude en parallèle de trois conditions sociales variant en fonction du degré d'information sociale disponible : une interaction sociale directe, une interaction sociale à travers une paroi de plexiglas, et une présentation d'urine de mâle.

Renforcement social et impact sur le comportement

Nos résultats, chez les souris WT et β 2KO, montrent une nette différence à la fois sur les niveaux de production d'USVs, et sur le comportement (proportion du temps passé au contact) en fonction de la condition. En effet, il y a une gradation relative à la valeur du renforcement social fournie aux animaux lors des différentes tâches. L'hypothèse soutenue ici est que les animaux en interaction sociale sont plus fortement récompensés par une interaction sociale directe que lors d'un contact non direct (trois chambres), ou lors de la seule présentation d'urine de mâles. Quel que soit le génotype des animaux, nous observons en effet que le pourcentage de temps passé au contact du stimulus social est toujours plus élevé en SIT (plus de 35 % du temps), qu'en test de trois chambres (20% du temps) ou en présentation d'urine (moins de 10% du temps). Ces données sont consistantes avec la littérature où les cadres basiques de la théorie de la récompense semblent s'appliquer aux contacts sociaux avec un congénère (Panksepp & Lahvis 2007). En effet, les concepts classiques de la motivation (Glickman & Schiff 1967; Young 1959; Ferguson et al. 2002) proposent que le comportement d'approche vers la récompense soit un indicateur de l'état, de la « force » d'une récompense (Berridge & Robinson 1998). Certains auteurs proposent même que l'une des fonctions les plus basiques du système de récompense serait de servir de médiateur à des comportements d'approches en fonction d'événements biologiques significatifs (Kelley & Berridge 2002). Chez le rongeur, il a été montré que plusieurs acteurs (comme le système dopaminergique, ou les opioïdes endogènes) particulièrement impliqués dans la motivation et les propriétés hédoniques des drogues ou de la motivation alimentaire, étaient également impliqués dans les interactions sociales (Trezza, Damsteegt, et al. 2011; Trezza, Campolongo, et al. 2011a), mais aussi dans l'émission de vocalisations lors de contextes appétitifs (Brudzynski 2007; Wang et al. 2008).

Dans nos présents résultats, nous montrons que les souris WT et β 2KO sont particulièrement motivées pour l'approche d'un congénère, et émettent durant ces approches/contacts un grand nombre d'USVs. De plus, le retour social (« feedback ») semble revêtir une importance dans le maintien d'un comportement social significatif, mais également dans le niveau de production d'USVs.

Parallèlement à cela, nous avons montré que les niveaux de fréquences utilisées lors de la SIT et lors de la tâche de 3 chambres sociale sont différents. Aucune différence n'est observée entre les animaux WT et les animaux β 2KO, en SIT, les animaux émettent des USVs à des fréquences très élevées (Pf min \approx 65 kHz, Pf max \approx 75 kHz), tandis que lors de la tâche de 3 chambres sociale ils émettent à des fréquences beaucoup plus basses (Pf min \approx 50 kHz, Pf max \approx 55 kHz). Ceci va dans le même sens que les données de la littérature suggérant que l'émission d'USVs reflète le niveau d'approche sociale chez le rat (Knutson et al. 2002). Cependant, étant donné que nous ne sommes pas en mesure de déterminer quelle souris vocalise lors de ces tâches, il est aussi probable que nous enregistrons aussi les USVs émises par l'individu enfermé sous le pot lors de la tâche de 3 chambres. Vu la condition inconfortable dans laquelle il se trouve, les USVs qu'il produit pourraient, comme chez le rat (Blanchard et al. 1991; Litvin et al. 2007), ou comme précédemment discuté chez la souris lors de la contention, être émises à des fréquences plus basses. Ainsi, lors de l'analyse, le mélange entre les USVs issues de l'animal test et « l'animal récompense » diminuerait le niveau de fréquence moyenne observé lors de la tâche de 3 chambres. Dans ce cas, soit les deux animaux ont le même état motivationnel, et l'observation du comportement vocal reflète l'état « général » de la dyade, soit les deux animaux sont dans des états motivationnels différents. Ainsi, nous observons une fréquence plus faible car l'état motivationnel de l'animal test ne suffit pas à masquer les émissions du visiteur, ou l'individu test ne partage pas son état motivationnel et/ou ne modifie pas l'état motivationnel du visiteur. Cela suggère qu'il y ait une sorte de « contagion émotionnelle » entre les deux individus, et que la modification de l'état motivationnel d'un seul des deux animaux suffit à placer la dyade dans le même état motivationnel. Pour l'heure quelques données sporadiques suggèrent une sorte « d'empathie » entre les rongeurs (Jordan 2006; Chen et al. 2009). En effet, un rat observant un congénère subissant des chocs électriques se trouve dans un état émotionnel négatif, et émet des USVs à basses fréquences, quand bien même il ne subit aucun traitement négatif (Langford et al. 2006).

A l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de répondre à ces questions. Pouvoir identifier avec certitude les USVs produites par l'un ou l'autre des animaux est l'une des clés à la compréhension complète de nos données.

Production d'USV indépendantes du comportement chez les β 2KO

La comparaison entre les émissions des animaux WT et β 2KO montre que les deux groupes d'individus vocalisent de la même façon dans chacune des trois tâches. Ainsi, malgré un comportement social différent chez les β 2KO (temps de contact plus élevé que chez les WT), ces animaux ne présentent pas de déficit ou d'augmentation des USVs lors de la SIT. De la même façon nous avons remarqué que les animaux WT passent plus de temps au contact de l'urine sociale que les β 2KO sans que le niveau d'USVs ne soit différent. Dans la littérature, il est montré qu'il y a une forte corrélation entre le temps d'investigation sociale et le nombre d'USVs émises chez des souris adolescentes mâles (Panksepp et al. 2007). Nos résultats appuient et complètent ces données, en montrant que chez les animaux adultes WT, nous observons une corrélation positive et significative entre le nombre d'USVs émises et la proportion de temps passé au contact de la motivation sociale dans les trois conditions (contact social, exploration de la pipette d'urine). Chez les animaux β 2KO cependant, aucune corrélation n'est observée. L'absence de corrélation lors de la SIT chez les animaux déficitaires pour la sous-unité β 2 des nAChRs et chez les animaux en SIT-groupé est particulièrement intéressante. En effet, les premières (souris β 2KO) présentent un déficit certain de flexibilité lors de cette tâche, tandis que les secondes (souris SIT-groupé) effectuent moins de contact social que les animaux en SIT-isolé. Il semblerait que l'émission de vocalisations chez la souris soit d'une part liée à la motivation pour l'interaction sociale, mais que ces USVs soient aussi corrélées à la flexibilité comportementale. Le rôle joué par l'émission d'USVs lors de l'interaction sociale chez les animaux β 2KO reste encore à élucider. Etant donné le fait qu'ils ne semblent pas avoir de déficit d'audition dans les premières fréquences des ultrasons (maximum testé 32 kHz), nous pouvons exclure l'implication d'un déficit de réception des USVs. Cependant, comme nous n'avons pu le tester, un possible déficit dans la réception de vocalisations à plus haute fréquence (au-delà de 32kHz) est possible. De même, il n'est pas à exclure que ces animaux β 2KO aient un déficit dans le traitement cognitif de ces USVs. Comme précédemment exposé, durant la SIT nous sommes actuellement dans l'impossibilité de savoir qui vocalise. Il est tout à fait probable que la quasi-totalité des USVs enregistrées lors de la tâche soient imputables à l'animal visiteur. De

plus, étant donné l'implication du système dopaminergique dans l'émission d'USVs dans des conditions appétitives (telle que l'interaction sociale), et connaissant le rôle modulateur du système cholinergique sur le système dopaminergique via les récepteurs nicotiques (Lester et al. 2010; Maskos 2010), la possibilité d'un déficit d'émission d'USVs lors de l'interaction sociale par l'animal test pourrait également expliquer le déficit de flexibilité observé lors de la SIT ou inversement. Cette hypothèse est appuyée par de récentes données obtenues dans notre laboratoire (**données non publiées et non montrées**) qui montrent qu'une dyade composée seulement d'individus $\beta 2$ KO en interaction sociale n'émet quasiment pas de vocalisations. Cependant lors de la mise en contention, la totalité de ces animaux émettent des USVs à faibles fréquences. Ceci montre que ces souris ne possèdent pas de problèmes physiques empêchant l'émission. Ainsi, seul le système permettant l'émission d'USVs associées à des conditions appétitives telles que l'interaction sociale est affecté par l'absence de récepteurs nicotiques fonctionnels.

Limites du travail sur les vocalisations en contexte social

La principale limite de notre travail sur les vocalisations repose sur le fait que nous ne sommes pas actuellement capables de discriminer l'individu qui vocalise lors de l'interaction sociale, ou si les deux individus participent aux USVs, lequel est-ce à un l'instant « *t* » ? Nous avons écarté volontairement l'utilisation d'une dévocalisation d'un des deux individus pour plusieurs raisons. Bien qu'à ce jour, plusieurs techniques de dévocalisation semblent coexister, le rendement (animaux opérés / animaux réellement dévocalisés incapable d'émettre des USVs) reste obscur. En effet, la dévocalisation repose soit sur une section bilatérale du nerf laryngé récurrent innervant les cordes vocales de l'animal (White, Cagiano & Barfield 1990; Wright et al. 2010), soit sur une lésion unilatérale des cordes vocales (Yamashita et al. 2009). Cependant, dans les deux cas les auteurs rapportent une récupération quasi-totale de la capacité à émettre des sons après environ 8 jours. De plus, une telle opération ainsi que le temps de récupération perturbera certainement l'interaction sociale. Actuellement, nous n'enregistrons que très peu de vocalisations qui se superposent (seulement la classe composite). Ces USVs pourraient nous indiquer avec certitude que les deux animaux vocalisent en même temps. Cependant, les souris peuvent émettre des USVs à des moments différents, décalés dans le temps. Ainsi, sans signature vocale individuelle, ou un moyen d'estimer (visuellement ou mathématiquement) qui vocalise, nous devons considérer les deux individus comme faisant partie d'une dyade, comme le font beaucoup

d'autres auteurs (Scattoni et al. 2010; Menuet et al. 2011; Grimsley et al. 2011; Takahashi et al. 2010; Hamilton et al. 2011). Seules de récentes études se sont focalisées sur l'expression de spécificités parentales et individuelles au sein d'USVs (Hoffmann et al. 2012; Arriaga & Jarvis 2011). En effet, Hoffmann et ses collègues ont mis en évidence la présence d'une signature vocale individuelle seulement pour certaines catégories d'USVs lors de comportements d'approches sexuelles chez la souris sauvage (Hoffmann et al. 2012). Malgré ces résultats prometteurs, l'utilisation d'une telle méthode dans notre paradigme risque de poser plusieurs problèmes. A commencer par le fait que l'identification d'une signature vocale individuelle risque d'être plus difficile chez les souris de laboratoire telle que les C57BL6/J, à cause de leur relative homogénéité génétique. De plus l'identification d'une signature vocale est limitée à certains types d'USVs. Enfin, cette individualité peut être différente selon la condition expérimentale (dans l'étude de Hoffmann, il est question d'un comportement de recherche de partenaire sexuel). Ainsi, l'identification de l'individu vocalisant devra (dans nos conditions) s'orienter vers d'autres types de méthodes.

Nous avons proposé ici un premier aperçu de l'implication de la motivation sociale, de l'état motivationnel et émotionnel sur l'émission d'USVs chez la souris adulte mâle lors de l'interaction sociale. Bien que l'importance de l'émission des USVs concomitante avec les comportements sociaux reste encore à approfondir, nous avons également tenté de comprendre comment ces USVs peuvent être liées au comportement social. Cette relation est très importante dans l'étude des souris modèles de pathologies comme l'autisme, qui dans certains cas souffrent d'une diminution du comportement social et de l'émission d'USVs (Scattoni et al. 2010; Jamain et al. 2008; Moy et al. 2006; Ey et al. 2011; Schmeisser et al. 2012).

Chapitre 3

Chapitre 3: L'effet de la modulation de motivation sur la flexibilité comportementale et la hiérarchie des motivations naturelles.

Données: dans cette partie la majorité des données sont issues de l'ARTICLE 5, cependant elle inclue également des **données non publiées** (papier en préparation).

Plusieurs facteurs (internes ou externes) interviennent lors de l'interaction sociale. Les animaux doivent intégrer et réagir en fonction de ces différentes informations, qui peuvent être sensorielles ou issues d'échanges avec le congénère, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 avec les USVs. Ils doivent également agir en fonction de leurs états émotionnels et motivationnels interne, et prendre en compte leurs motivations pour les différents aspects qui composent l'interaction sociale. Comme nous l'avons montré précédemment, le PrL ainsi que les $\beta 2^*nAChRs$ jouent un rôle primordial dans les processus de flexibilité comportementale (Chapitre 1, (Granon et al. 2003)). En effet l'étude de l'interaction sociale nous a permis de mettre en évidence des comportements qualifiés de « non-adaptés » ou « non-flexibles » chez des animaux $\beta 2KO$. Ainsi l'objectif de ce chapitre est triple. Dans un premier temps, nous avons défini grâce à une méthode d'analyse précise des marqueurs comportementaux de flexibilité lors de l'interaction sociale (ARTICLE 5). Ensuite, nous avons étudié l'apparition et l'évolution de ces marqueurs lorsque la motivation pour l'interaction sociale avec un congénère est modifiée (résultats non publiés). Une partie de ce chapitre sera également consacrée à l'organisation des motivations naturelles chez l'animal. Selon la littérature, les animaux $\beta 2KO$ présentent des troubles de l'état motivationnel (Picciotto et al. 1998; U Maskos et al. 2005) influençant notamment l'interaction sociale chez ces individus. En effet si une motivation alimentaire est ajoutée aux motivations d'exploration d'environnement et du nouveau congénère, les animaux $\beta 2KO$ présentent un déficit d'organisation de leurs motivations comparé aux animaux WT (Serreau et al. 2011). Ainsi, pour mieux comprendre l'origine du trouble de flexibilité chez les souris $\beta 2KO$, nous avons mis en place une tâche qui nous permet d'étudier la hiérarchie des motivations naturelles de l'animal (nourriture, exploration d'objet et exploration de congénère) dans un environnement sécurisé et sans contraintes (ARTICLE 4).

3.1. Définition de marqueurs comportementaux de flexibilité

Lors de l'interaction sociale, les souris présentent un répertoire comportemental riche et varié qui rend compte d'informations issues des motivations et émotions internes à l'individu test, mais également d'informations comportementales fournies par le congénère. Jusqu'à aujourd'hui l'analyse de telles séquences reposait sur une analyse manuelle sur bande vidéo. En effet, aucune solution logicielle ne permet l'analyse automatique de ce genre de tâche sans avoir à marquer physiquement les individus, ce qui, peut, modifier leur comportement social. Cependant l'analyse manuelle relève certaines limites, et l'observation de séquences comportementales complexes est impossible. Nous avons donc très rapidement, et en collaboration avec une équipe de l'Institut Pasteur à Paris, développé un logiciel d'analyse automatisé (*MiceProfiler*⁹) répondant à nos principales attentes lors de notre tâche d'interaction sociale.

a. L'analyse automatisée du comportement social

La mise en place d'un modèle physique de traçage comportementale des souris lors de l'interaction sociale a pu être validé grâce à une comparaison entre les résultats obtenus en analyse manuelle et ceux obtenus par le logiciel (**Figure 50**). Nous avons utilisés dans cette analyse comparative des souris C57BL6/J ainsi que des souris β 2KO, mais également des souches de souris présentant des comportements sociaux plus (129SV) ou moins (DBA2) agressifs que les C57BL6/J afin de valider au mieux le système. Globalement, nous avons observé que les temps de contact entre les deux utilisateurs indépendants et ceux obtenus avec le *MiceProfiler* ne varient pas entre eux pour les quatre lignées de souris étudiées.

⁹ Par soucis de clarté, et parce qu'ils ne relèvent pas de mon travail personnel, les détails concernant les modèles physiques et mathématiques employés dans le logiciel «*MiceProfiler*» ne seront pas détaillés dans ce manuscrit. Pour de plus amples informations voir (de Chaumont et al. 2012).

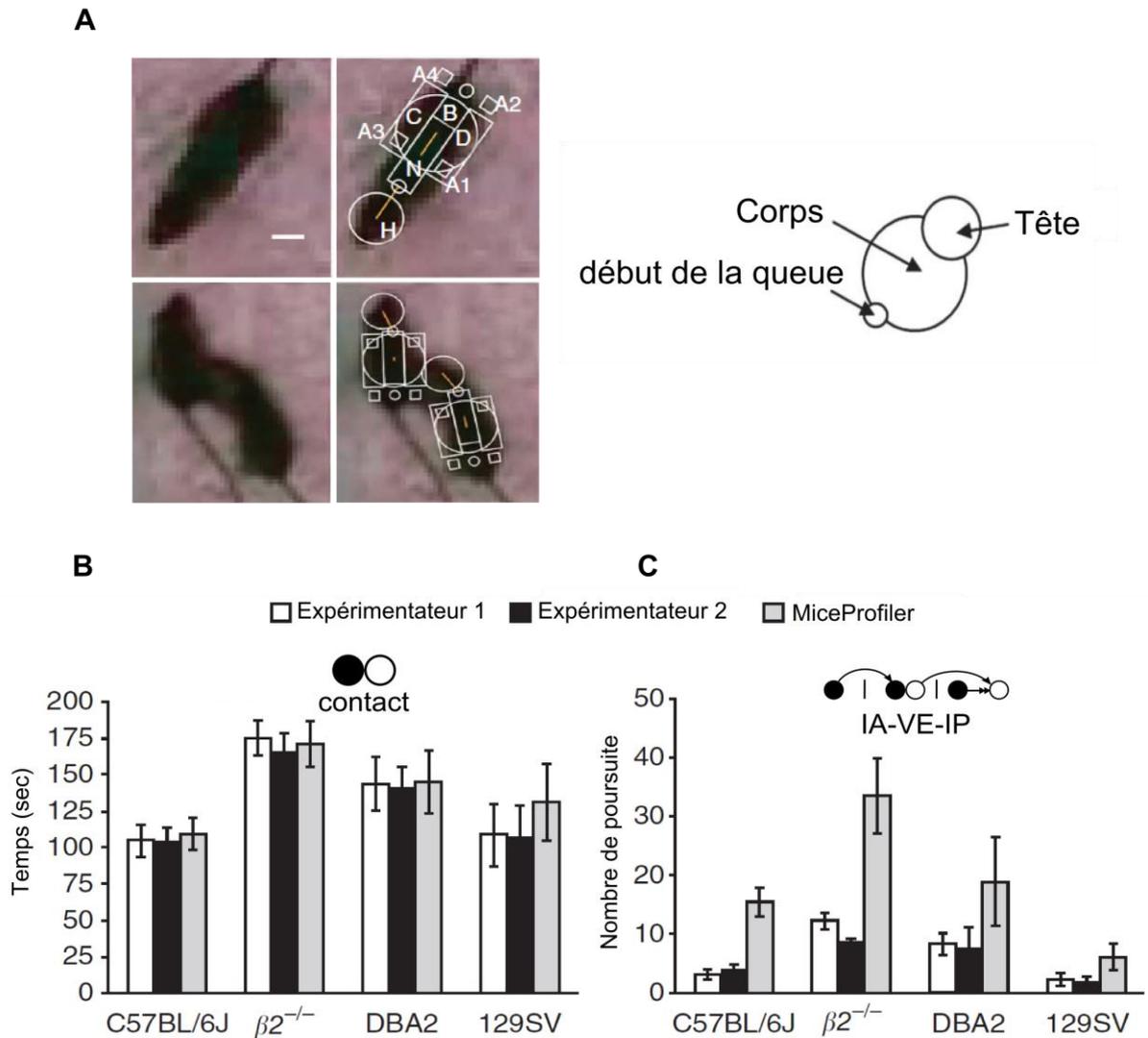


Figure 50: Comparaison entre l'analyse manuelle et l'analyse automatisée par MiceProfiler. (A) Apposition du modèle physique sur l'image d'une puis deux souris en interaction sociale (*gauche*). Représentation des éléments pris en compte lors de l'analyse par MiceProfiler : la tête, le corps et le début de la queue de l'animal (B) Temps de contact social et (C) Nombre de poursuite comptabilisés par 2 expérimentateurs différents et par MiceProfiler chez des souris C57BL6/J (n=9), $\beta 2$ KO (n=7), DBA2 (n=5), et 129SV (n=6). Les données sont présentées en moyennes \pm sem.

De plus on retrouve le trait spécifique aux souris $\beta 2$ KO ; c'est à dire un temps de contact plus élevé que chez les souris C57BL6/J. En ce qui concerne les nombres de poursuite, alors que les nombres obtenus entre les deux expérimentateurs sont sensiblement identiques pour toutes les souches, nous observons que chez les souches C57BL6/J, $\beta 2$ KO, et

DBA2 le nombre de poursuite (IA-VE-IP) obtenus par analyse automatique est plus élevé que celui obtenu manuellement.

Chez les animaux 129SV, cette différence est relativement minime et peu être simplement du au fait de la variation des critères de « fin » et de « début » de poursuite entre les expérimentateurs et le logiciel. Ce dernier utilise des seuils précis de distance (en pixels) alors que l'estimation d'une poursuite par les expérimentateurs reste relativement subjective.

b. Interaction sociale et marqueurs comportementaux

L'utilisation de *MiceProfiler* lors de l'interaction sociale chez des animaux WT et β 2KO nous a permis de préciser le déficit comportemental observé chez les animaux β 2KO. Pour cela, nous avons analysé et comparé les événements de contact, certaines séquences comportementales (en positions relatives et dynamiques) lors de l'interaction sociale chez des animaux C57BL6/J (WT) et β 2KO. Nous avons pu quantifier leurs nombres, leurs durées, et leurs évolutions temporelles. Nous avons choisis d'étudier deux périodes de la tâche SIT (0 à 4 minutes et 4 à 8 minutes), de façon à étudier comment les comportements évoluent au cours du temps. Cette étude nous a permis de valider t'autant plus *MiceProfiler*, que nous avons observé que le comportement social des animaux analysé de cette façon n'est pas différents de celui abordé dans le chapitre 1 de ce manuscrit. C'est-à-dire que les différences observées entre les animaux WT et β 2KO (nombre de poursuite, temps de contact, classes comportementales, etc...) ne varient pas entre l'analyse manuelle et automatique. Par contre cette dernière nous permet d'avoir plus de critères, et de mettre en évidence, avec plus de précision, de nouveaux comportements.

- Evolution temporelle des contacts sociaux chez les β 2KO

En effet, en accord avec nos précédents résultats, l'analyse du contact social lors de l'interaction sociale révèle que le nombre de contact ne diffère pas entre les WT et les β 2KO peu importe la période ($F=0.65$, $P=0.43$; **Figure 51A**). Mais, les souris β 2KO passent plus de temps au contact du visiteur social et effectuent donc des contacts plus longs sur les quatre premières (0 à 4 minutes ; effet génotype : $F_{(1,14)} = 27.6$, $P=0.0001$ test t-student *post-hoc*, $t=3.24$, $P=0.005$) et sur les quatre dernières minutes ($t=5.47$, $P<0.0001$; **Figure 51B**).

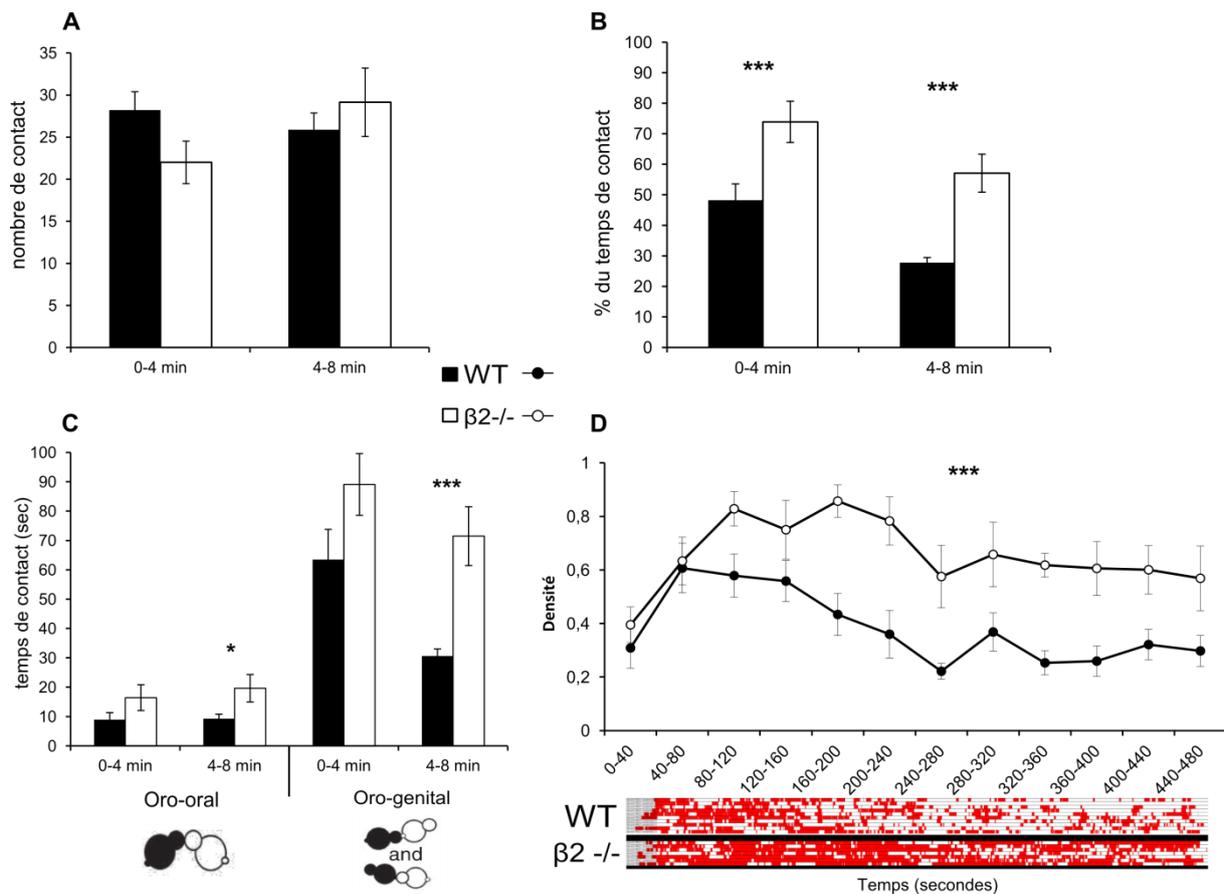


Figure 51: Analyse de la séquence de contact social par *MiceProfiler*. (A) nombre de contact (B) Proportion du temps de contact (C) Durée des différents types de contacts (D) Evolution temporelle par tranches de 40 secondes du temps de contact. En dessous, les chronographes correspondant. Mesures réalisées chez des animaux WT (n=9) et β2KO (n=7) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne ± sem., et *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

En analysant plus précisément les types de contact effectués lors de ces épisodes de contacts sociaux, nous avons trouvé que les β2KO présentent des durées de contacts de types Oro-oral et Oro-génital plus longues que les WT, spécifiquement lors de la seconde partie de la tâche (**Figure 51C**; 0-4 minutes : Oro-oral, P=0.1 ; Oro-génital, P=0.09 ; 4-8 minutes : Oro-oral, P=0.02 ; Oro-génital, P=0.0003).

Nous avons ensuite représenté l'évolution de tous les types de contacts sociaux au cours du temps en regroupant, ces contacts par tranches de 40 secondes et en chronographes pour les deux groupes d'animaux (**Figure 51D**). Ce que nous avons pu montrer, c'est que le temps passé au contact social évolue de façon différente entre les WT et les $\beta 2\text{KO}$ (effet génotype, $F_{(1,14)} = 27066$, $P=0.0001$; effet temps, $F_{(11,154)} = 5.95$, $P<0.0001$; interaction génotype x temps, $F_{(11,154)} = 1.64$, $P=0.009$). En effet, chez les WT nous observons une diminution progressive du temps de contact social au cours du temps, reflétant l'extinction spontanée naturelle ou habitude observée couramment chez les animaux WT. A l'inverse les $\beta 2\text{KO}$ montrent un profil tout à fait différent. Ces animaux présentent un temps de contact très élevé dès le départ, et le garde tout au cours du temps.

- Evolution temporelle des séquences comportementales

Outre l'analyse temporelle du temps de contact et du nombre de contact, *MiceProfiler* permet d'identifier une série de plus de 25 comportements ou postures (**ARTICLE 5 Figure 1**). Nous avons ainsi, à chaque instant, les positions relatives des animaux, le nombre et la durée d'événements de premier ordre (mouvement d'un animal par rapport à l'autre), et de second et de troisième ordre (séquences combinant les positions relatives et les événements de premier ordre). Parmi ces comportements nous nous sommes intéressés à deux séquences précédemment étudiées, ainsi qu'à deux nouveaux comportements intéressants.

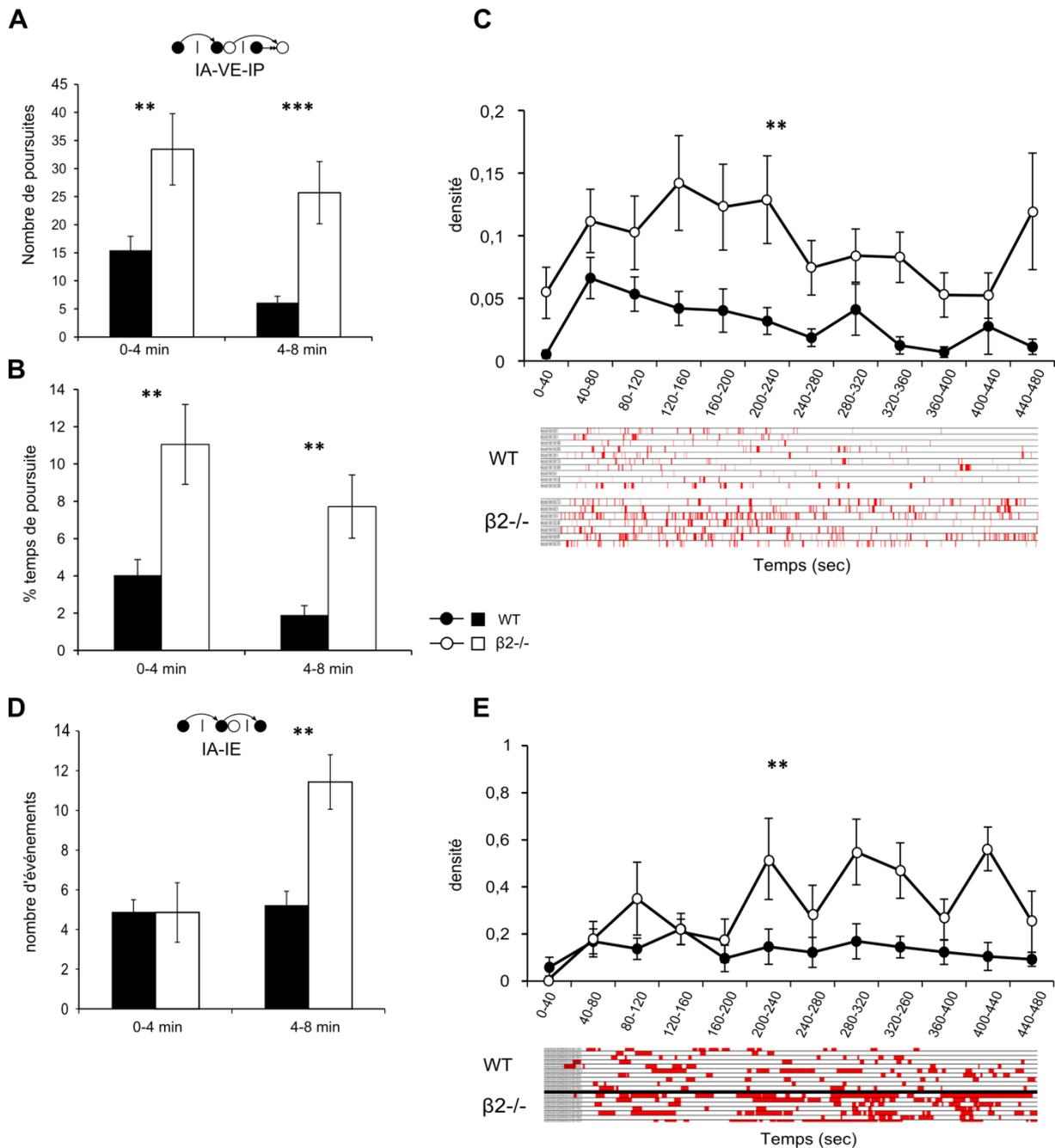


Figure 52: Analyse des séquences « isolé approche, visiteur échappe, isolé poursuite » ou poursuite (IA-VE-IP) et « isolé approche, et part » (IA-IE) par *MiceProfiler*. (A) Nombre de poursuite (B) Pourcentage du temps total passé en poursuite. (C) Evolutions temporelles par tranches de 40 secondes des événements de poursuite. En dessous, les chronographes correspondant aux événements de poursuite. (D) Nombre d'événements IA-IE. (E) Evolution temporelle par tranches de 40 secondes des événements IA-IE. En dessous, les chronographes correspondant. Mesures réalisées chez des animaux WT (n=9) et $\beta 2$ KO (n=7) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et **P<0.01, ***P<0.001.

En effet, l'analyse des séquences de poursuites (isolé approche, visiteur échappe, isolé poursuit, ou IA-VE-IP ; **Figure 52**) révèle que les souris β 2KO montrent une nette différence pour le nombre de poursuite engagées envers le visiteur (0-4 minutes, $P=0.008$; 4-8 minutes, $P=0.0009$; **Figure 52A**), ainsi que pour la proportion de temps passé en poursuite (0-4 minutes, $P=0.002$; 4-8 minutes, $P=0.001$; **Figure 52B**).

De la même façon, l'évolution temporelle de ces poursuites initiées par l'animal isolé décroît au bout de deux minutes pour les animaux WT, mais pas pour les souris β 2KO (effet génotype, $F_{(1,14)} = 22.4$, $P=0.0003$; effet temps, $F_{(11,154)} = 3.1$, $P=0.0007$; interaction génotype x temps, $F_{(11,154)} = 1.2$, NS ; **Figure 52C**). Etant donné la forte proportion de contacts oro-génitaux observés chez les individus β 2KO, il semblerait que la majorité du temps de contact soit dû à des comportements de poursuite initié par les congénères résidents isolés lors de la tâche d'interaction sociale.

En plus des séquences de poursuites, nous avons aussi analysé les comportements d'approches de l'individu isolé suivis d'échappements (IA-IE ; **Figure 52D-E**). Cette classe comportementale, IA-IE, ne diffère pas entre les animaux WT et β 2KO sur les 4 premières minutes ($P=0.98$), mais se trouve fortement augmentée chez les β 2KO de 4 à 8 minutes à la fois en nombre (effet génotype, $F_{(1,14)} = 15.6$, $P=0.001$; effet temps, $F_{(1,14)} = 7.3$, $P=0.02$; interaction génotype x temps, $F_{(1,14)} = 7.5$, $P=0.02$; **Figure 52D**), qu'en durée (effet génotype, $F_{(1,14)} = 8.2$, $P=0.01$; effet temps, $F_{(1,14)} = 3$, $P=0.02$; interaction génotype x temps, $F_{(1,14)} = 7.4$, $P=0.02$; données non montrées). De la même façon, les β 2KO présentent une évolution temporelle différente des WT pour ce comportement (effet génotype, $F_{(1,14)} = 8.7$, $P=0.01$; effet temps, $F_{(11,154)} = 3.5$, $P=0.0004$; interaction génotype x temps, $F_{(11,154)} = 3.4$, $P=0.0006$; **Figure 52E**).

De manière générale, et en accord avec les données déjà décrites dans le chapitre 1 de ce manuscrit, les souris β 2KO présentent un comportement social particulier, signe d'un déficit de flexibilité et d'un comportement plus stéréotypé que les WT. L'utilisation du logiciel *MiceProfiler* nous a conduit à la même conclusion et nous à permis de mettre en évidence d'autres critères (notamment d'évolution temporelle) difficilement identifiable par une analyse manuelle chez ces souris lors de la tâche SIT.

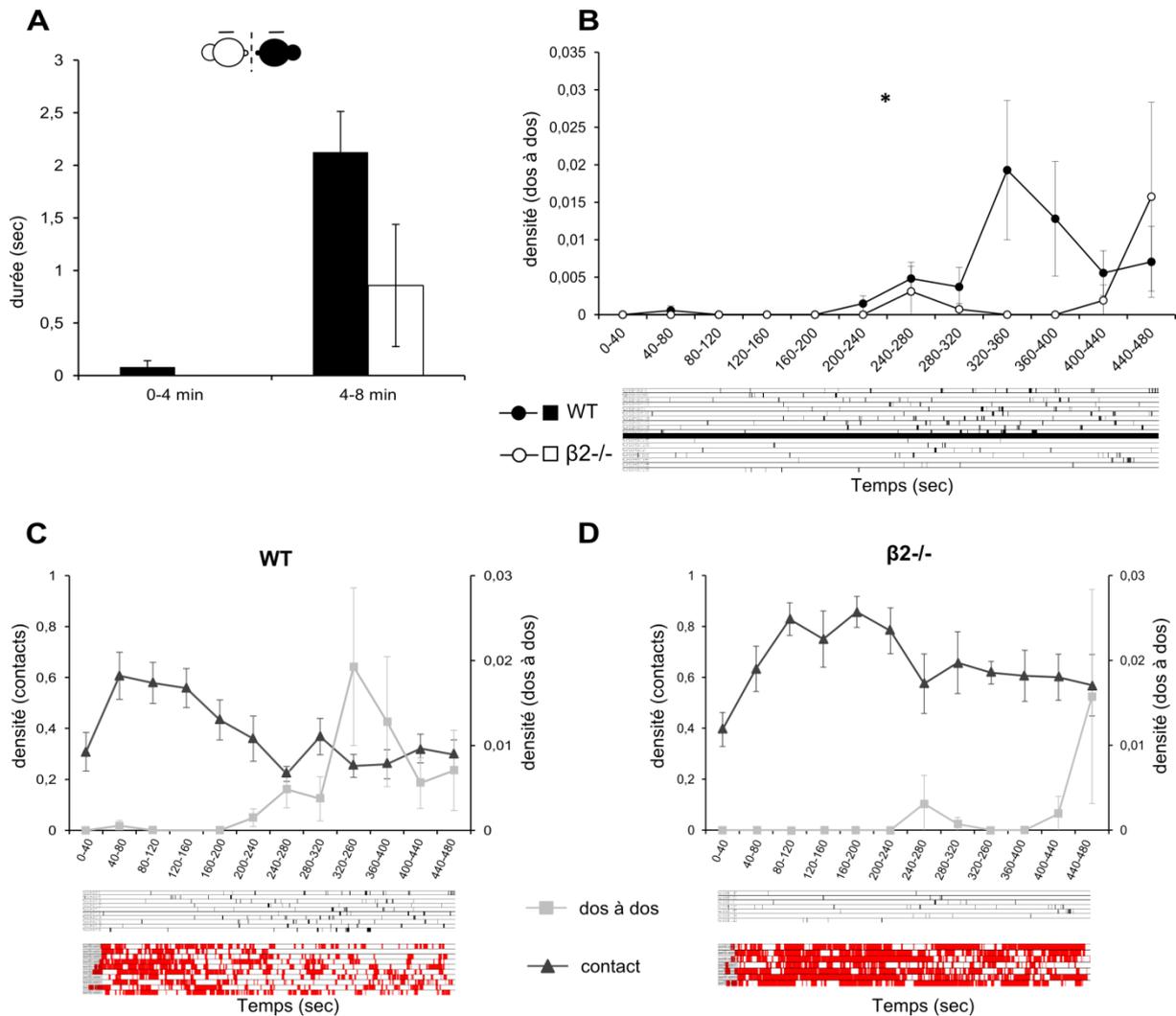


Figure 53: Analyse des événements « dos à dos » lors de l'interaction sociale. **(A)** Durée des séquences « dos à dos » **(B)** Evolution temporelle par tranches de 40 secondes des événements « dos à dos ». En dessous, les chronographes correspondant aux événements « dos à dos ». Evolution temporelle conjointe des contacts sociaux et des séquences « dos à dos », avec en dessous les chronographes correspondants pour les animaux WT **(C)** et $\beta 2$ KO **(D)**. Mesures réalisées chez des animaux WT (n=9) et $\beta 2$ KO (n=7) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05.

De façon intéressante, l'analyse automatisée a permis de mettre en évidence certaines séquences comportementales spécifiques. Les séquences « dos à dos », postures où les deux animaux ne se voient pas et ne se touchent pas. Ce sont des postures durant lesquelles les animaux sont très exposés au risque. Lors de la tâche SIT, nous avons observé que la durée de « dos à dos » est plus élevée chez les animaux WT que chez les $\beta 2\text{KO}$ lors des quatre dernières minutes (effet génotype, $F_{(1,14)} = 4.73$, $P=0.04$; effet temps, $F_{(1,14)} = 22.8$, $P=0.0003$; interaction génotype x temps, $F_{(1,14)} = 3.4$, $P=0.08$; test t-student *post-hoc* 0-4 minutes, $P=\text{NS}$; 4-8 minutes, $P=0.06$). L'analyse de la densité de ces comportements chez les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ montre deux profils différents (**Figure 53B**).

En effet les séquences « dos à dos » se mettent en place au cours du temps chez les WT, pour atteindre leurs maximum au cours des quatre dernières minutes. Tandis que chez les $\beta 2\text{KO}$, ces séquences restent très peu représentées au cours du temps (effet génotype, $F_{(1,14)} = 4.73$, $P=0.04$; effet temps, $F_{(11,154)} = 2.4$, $P=0.007$; interaction génotype x temps, $F_{(11,154)} = 1.73$, $P=0.007$; **Figure 53B**). Lorsque l'on regarde plus précisément les circonstances d'apparition de ces événements chez les WT et chez les $\beta 2\text{KO}$ (**Figure 53C & D**), nous remarquons que chez les WT elles se mettent en place lorsque les contacts sociaux diminuent, c'est-à-dire dans la seconde partie de la tâche. *A contrario*, chez les animaux $\beta 2\text{KO}$, on observe bien l'augmentation du temps de contact au cours du temps ainsi que son maintien, mais l'occurrence des « dos à dos » reste très basse jusqu'aux dernières minutes de la tâche. Bien que les deux séquences comportementales évoluent de façon différentes, nous pouvons penser que la mise en place des séquences « dos à dos » chez les $\beta 2\text{KO}$ se fait plus tardivement que chez les WT.

Cette séquence comportementale particulière observée grâce à cette analyse automatique renforce l'idée que pour les animaux dans la tâche SIT, il est nécessaire d'avoir un comportement flexible au cours du temps. Des séquences comportementales telles que les « dos à dos » qui apparaissent en étroite relation avec la diminution des temps de contact sociaux, pourrait être un marqueur comportemental de la flexibilité lors de tâche d'interaction sociale.

Parallèlement, nous avons aussi utilisé *MiceProfiler* pour déterminer un événement comportemental, les séquences d'immobilisations ou « Stop », définies par une forte diminution de la vitesse de déplacement de l'animal jusqu'à devenir nulle (**Figure 54**). Ce que nous avons montré, c'est que le nombre de « stop » ne diffère pas entre les WT et les $\beta 2\text{KO}$ sur les quatre premières ou les quatre dernières minutes (effet génotype, $F_{(1,14)} = 1.21$,

$P=0.28$, effet temps, $F_{(1,14)} = 3.99$, $P=0.06$, interaction génotype \times temps, $F_{(1,14)} = 1.03$, $P=0.32$; **Figure 54A**). Par contre chez les souris $\beta 2\text{KO}$, les « stop » sont significativement plus courts que chez les WT, et ce uniquement de 4 à 8 minutes (effet génotype, $F_{(1,14)} = 14.77$, $P=0.001$; effet temps, $F_{(1,14)} = 2.53$, $P=0.13$; test *post-hoc*, 0-4 minutes : 0.06 ; 4-8 minutes : 0.0006 ; **Figure 54B**).

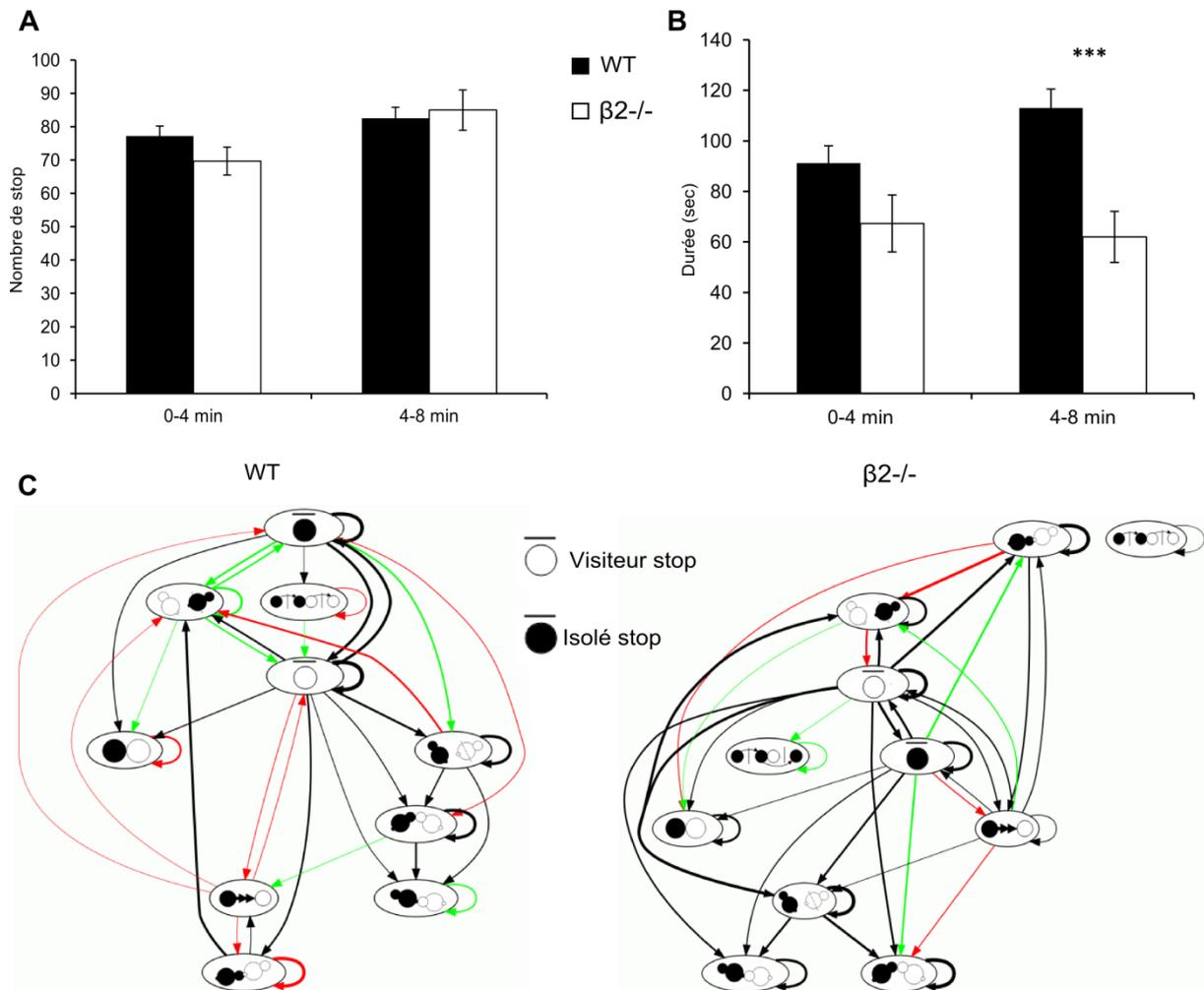


Figure 54: Analyse des séquences de « Stop ». (A) Nombre de « Stop » durant l'interaction sociale (B) Durée moyenne des séquences « Stop » (C) Diagrammes représentant les transitions comportementales à partir des séquences « Stop » chez les animaux WT (gauche) et $\beta 2\text{KO}$ (droite). La taille des flèches est proportionnelle à la probabilité de transition entre une séquence et une autre. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *** $P < 0.001$.

Nous avons pu schématiser l'ensemble du répertoire comportemental des animaux WT et β 2KO sur des diagrammes représentant les probabilités de transitions entre séquences. Ces diagrammes contiennent des informations concernant la probabilité de passer d'une séquence à une autre, nous permettant ainsi de mieux comprendre où se situent les différences de comportement entre les groupes. Ainsi, une information importante peut être extraite de la **Figure 54C**. En effet, nous avons observé que chez les β 2KO, plus précisément chez les animaux isolés (animal test de la tâche SIT), les « stop » ne sont jamais suivis de séquences complexes. De plus les « stops » n'apparaissent que lorsque le visiteur est également en train de réaliser un « stop » (**Figure 54C**, droite). A l'inverse chez les WT, les événements « stop » représentent un carrefour, et une multitude de comportements sont initiés à la suite de ces « stop ».

Ainsi, comme pour les événements « dos à dos », l'analyse avec *MiceProfiler* nous a permis d'approfondir le comportement des souris WT et β 2KO lors de la tâche de SIT. L'étude des comportements de « stop » lors de cette tâche peut s'avérer un bon outil, au même titre que l'apparition des « dos à dos », pour l'étude de la flexibilité comportementale.

3.2. Evolution des marqueurs de flexibilité et motivation sociale

L'analyse automatisée a permis de définir certains marqueurs comportementaux que nous avons interprétés comme étant des marqueurs de flexibilité comportementale lors de la tâche d'interaction sociale. Ainsi, après avoir étudié l'apparition et l'évolution de ces marqueurs chez des souris β 2KO et WT, nous avons décidé de nous intéresser aux liens existants entre l'évolution de ces marqueurs et la modulation de motivation sociale.

a. *Isolement social et impact sur le comportement social*

Nous avons ainsi étudié de façon précise le comportement social d'animaux précédemment isolés (« SIT-isolé ») ou non (« SIT-goupé ») avant l'interaction sociale (comme dans le Chapitre 1). Nous avons montré que les animaux élevés en groupe effectuent plus de contact que leurs homologues isolés, et ce sur les deux périodes de l'interaction sociale (**Figure 55A** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 30.95$, $P < 0.0001$; effet temps, $F_{(1,15)} = 4.38$, $P = 0.05$; test *post-hoc* de Mann-Whitney, 0-4 minutes : $U = 1$, $P < 0.001$; 4-8 minutes : $U = 3$, $P = 0.001$). Cependant, malgré un nombre de contact plus élevé, ce sont les animaux en SIT-isolés qui passent le plus de temps au contact social par rapport aux animaux groupés (**Figure 55B** ; effet génotype, $F_{(1,15)} = 17.08$, $P = 0.0009$; effet temps, $F_{(1,15)} = 23.484$, $P = 0.0002$; interaction temps \times génotype, $F_{(1,15)} = 5.38$, $P = 0.034$; test *post-hoc* de Mann-Whitney, 0-4 minutes : $U = 6$, $P = 0.003$; 4-8 minutes : $U = 9$, $P = 0.009$). En effet, chez les animaux isolés, nous observons qu'un peu plus de 40% du temps total est passé au contact du congénère lors des quatre premières minutes. Cette proportion diminue lors des quatre dernières minutes pour passer à moins de 30%. Chez les animaux groupés, nous n'observons pas cette large diminution au cours du temps. La proportion de temps passé au contact est relativement faible de 0 à 4 minutes (22%), et le reste de 4 à 8 minutes (15%). Ces animaux consacrant plus de temps à l'exploration de l'environnement (0 à 4 min : 80% ; 4 à 8 min : 90% ; données non montrées).

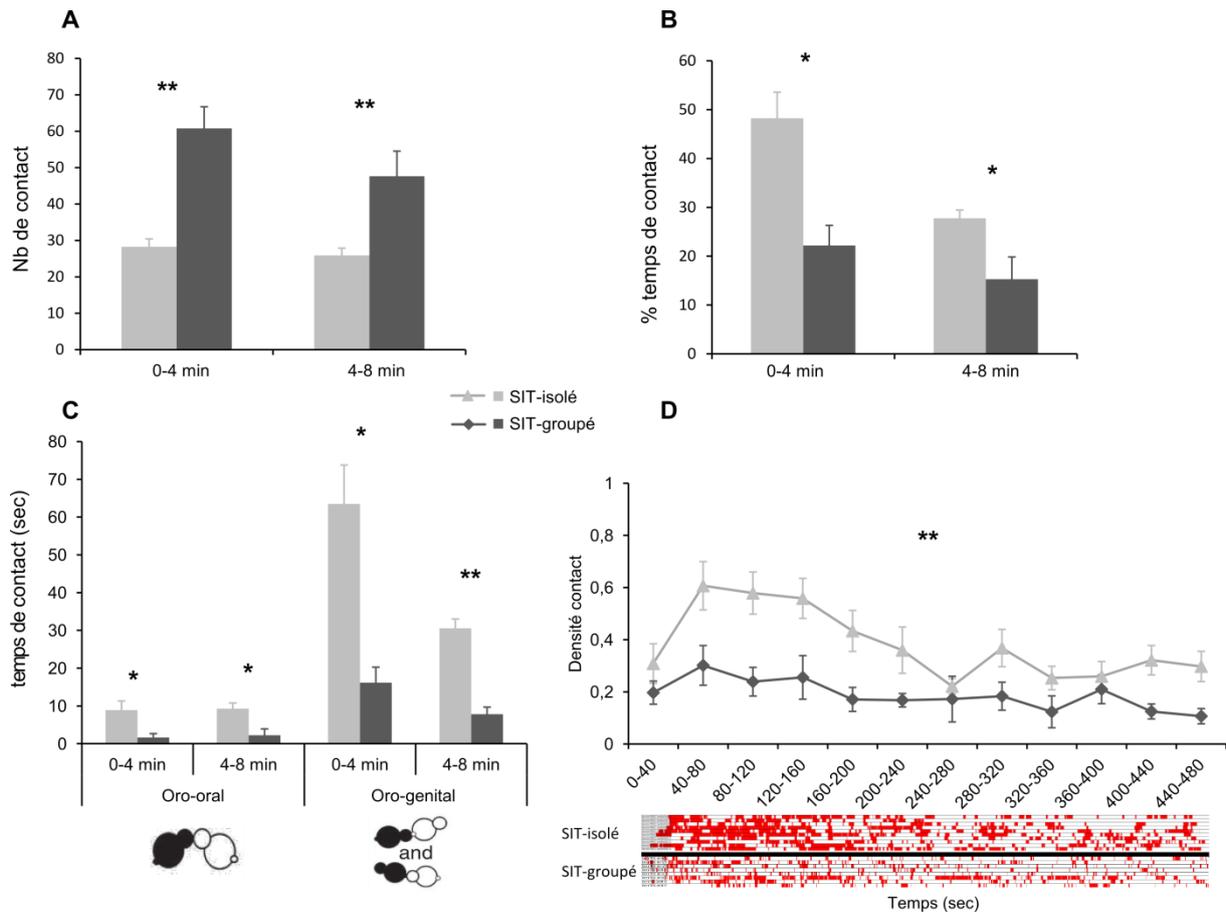


Figure 55: Comportement social par MiceProfiler. (A) Nombre de contact (B) Proportion du temps de contact (C) Durée des différents types de contacts (D) Evolution temporelle par tranches de 40 secondes du temps de contact. En dessous, les chronographes correspondant pour le temps de contact social. Mesures réalisées chez des animaux WT en SIT-isolé (n=9) et SIT-groupé (n=8) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

En étudiant plus précisément le type des contacts (**Figure 55C**), nous avons montré que les animaux isolés passent plus de temps que les animaux groupés en contact oro-oral (effet génotype, $F_{(1,15)} = 12.89$, $P=0.002$; test *post-hoc* de Mann-Whitney, 0-4 minutes : $U=5.5$, $P=0.003$; 4-8 minutes : $U=7$, $P=0.005$) et oro-génital (effet groupe, $F_{(1,15)} = 33.32$, $P<0.0001$; test *post-hoc* de Mann-Whitney, 0-4 minutes : $U=2$, $P=0.0011$; 4-8 minutes : $U=0$, $P=0.0005$).

En SIT-isolés ou en SIT-groupés, les animaux passent plus de temps en contact oro-génital qu'en contact oro-oral. Le pourcentage d'augmentation de temps passé au contact oro-génital par rapport au contact oro-oral varie très peu entre les groupes (SIT-isolés : 86%

de 0 à 4 minutes et 70% de 4 à 8 min ; SIT-groupés : 89% de 0 à 4 minutes et 71% de 4 à 8 min). Par contre, l'évolution temporelle des contacts chez les animaux en SIT-isolé et les animaux en SIT-groupé est très différente (**Figure 55D** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 17.07$, $P=0.0009$; effet temps, $F_{(1,15)} = 6.08$, $P<0.0001$). L'augmentation ainsi que la progressive diminution des contacts sociaux en condition isolées (SIT-isolé) est clairement visible, mais, on n'observe aucune évolution chez les animaux groupés (SIT-groupé).

L'analyse des séquences comportementales nous a permis d'approfondir les types de contact mis en place par ces deux groupes de souris (**Figure 56A**). Les résultats montrent qu'il n'existe aucune différence entre les deux groupes d'individus pour le nombre d'approche de l'animal test (IA), ou pour le nombre de poursuites initiées par l'animal test (IA-VE-IP). En revanche le nombre d'approche de l'individu visiteur est systématiquement plus élevé en SIT-groupé qu'en SIT-isolé (effet groupe, $F_{(1,15)} = 66.12$, $P<0.0001$; test *post-hoc* de Mann-Whitney, 0-4 minutes : $U=2$, $P=0.0010$; 4-8 minutes : $U=0$, $P=0.0005$). Comme nous l'avons vu précédemment, il n'y a aucune différence pour le nombre de poursuite. L'analyse du temps consacré à la poursuite par les animaux résidents, révèle que les animaux en SIT-isolé et en SIT-groupé, passent également autant de temps en poursuite, mais que ce temps diminue de 0 à 4 et de 4 à 8 minutes (**Figure 56B** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 1.34$, $P=0.26$; effet temps, $F_{(1,15)} = 21.2$, $P=0.0003$; interaction groupe x temps, $F_{(1,15)} = 1.71$, $P=0.20$). De même, lorsque nous observons l'évolution au cours du temps des poursuites, aucune différence ne ressort entre les deux groupes d'animaux (**Figure 56B** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 1.34$, $P=0.26$; effet temps, $F_{(1,165)} = 4.21$, $P<0.0001$; interaction groupe x temps, $F_{(11,165)} = 2.78$, $P=0.0024$).

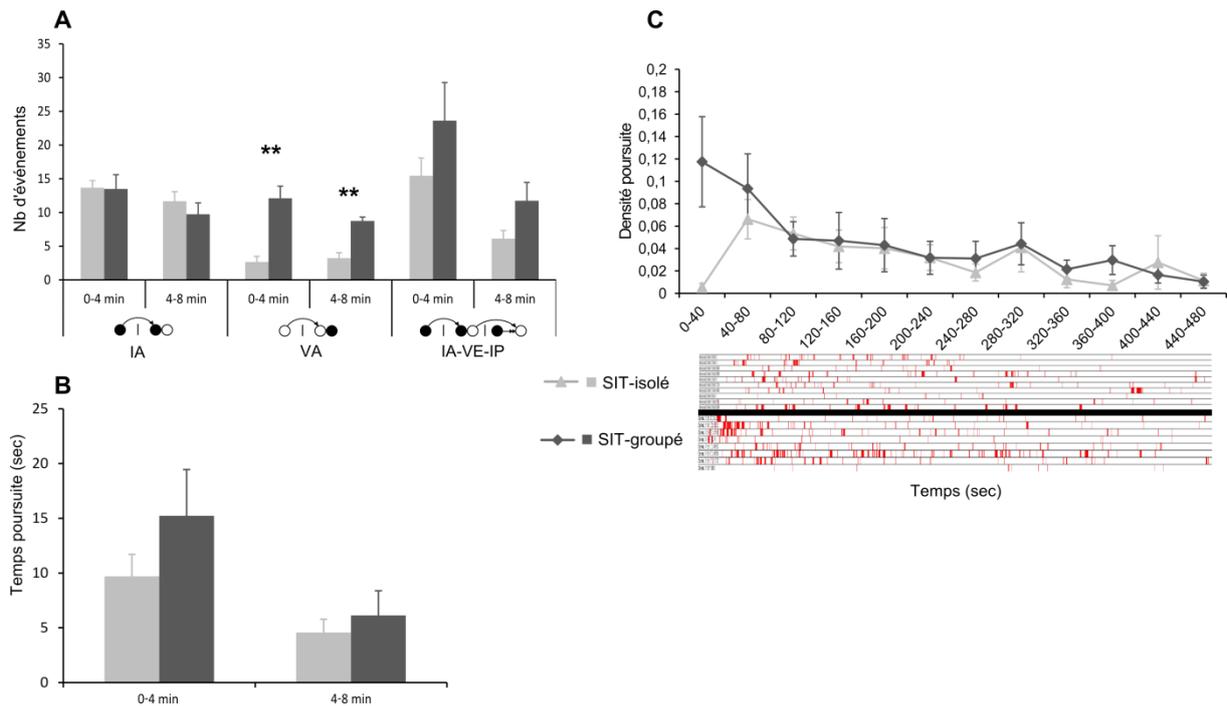


Figure 56: Analyse des séquences « isolé approche, visiteur échappe, isolé poursuit » ou poursuite (IA-VE-IP), « isolé approche » (IA), et « visiteur approche » (VA) par *MiceProfiler*. (A) Nombre d'événements (B) Temps total passé en poursuite. (C) Evolution temporelle par tranches de 40 secondes des événements de poursuite. En dessous, les chronographes correspondant aux événements de poursuite. Mesures réalisées chez des animaux WT en SIT-isolé (n=9) et SIT-groupé (n=8) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et **P<0.01.

Les animaux en condition d'interaction sociale non isolés précédemment à l'expérience, présentent donc un comportement social tout à fait original. Malgré un nombre de contact plus élevé, la durée de ces contact est très faible comparée à celle des animaux précédemment isolés. Contrairement à la condition isolée, la moitié des contacts sont initiés par le visiteur.

b. Marqueurs comportementaux et motivation sociale

Nous avons ensuite étudié l'apparition et l'évolution des marqueurs comportementaux identifiés lors de la partie précédente (les séquences « dos à dos » et les événements « stop »). En effet, nous avons voulu étudier l'impact de l'isolement (et donc de la motivation pour l'interaction sociale) sur ces marqueurs de comportement, mais aussi de flexibilité comportementale.

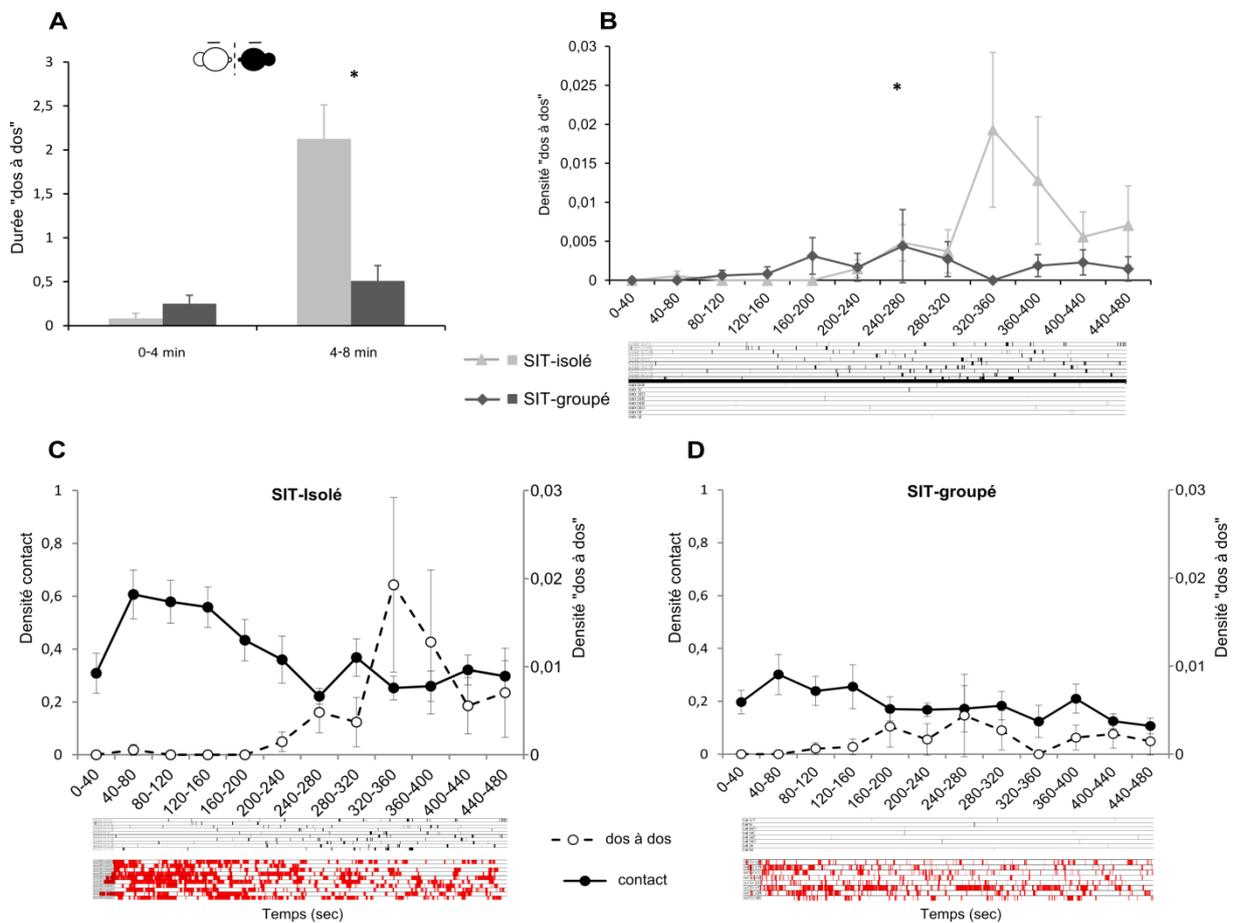


Figure 57: Analyse des événements « dos à dos » lors de l'interaction sociale. (A) Durée des séquences « dos à dos » **(B)** Evolutions temporelles par tranches de 40 secondes des événements « dos à dos ». En dessous, les chronographes correspondant aux événements « dos à dos ». Evolution temporelle conjointe des contacts sociaux et des séquences « dos à dos », avec en dessous les chronographes correspondants pour les animaux WT en SIT-isolé **(C)** et SIT-goupé **(D)**. Mesures réalisées chez des animaux WT en SIT-isolé (n=9) et SIT-goupé (n=8) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.05.

- Evolution des séquences « dos à dos »

Pour commencer nous nous sommes intéressés aux séquences « dos à dos ». L'analyse de la durée des événements « dos à dos » révèle que comme les animaux WT en SIT-isolé, les animaux en SIT-goupé font très peu de séquences « dos à dos » de 0 à 4 minutes, et ces événements durent très peu de temps. Par contre, alors que pour le groupe SIT-isolé le nombre et la durée des « dos à dos » augmentent de 4 à 8 minutes, le groupe SIT-goupé reste au même niveau que lors des quatre premières minutes (Données non montrées ; nombre de « dos à dos » : effet groupe, $F_{(1,15)} = 5.74$, $P=0.03$; effet temps, $F_{(1,15)} = 28.36$, $P<0.0001$; interaction groupe x temps, $F_{(1,15)} = 16.41$, $P=0.001$; test *post-hoc* de Mann-Whitney : 0-4 min : $U=22$, $P=0.12$; 4-8 min : $U=6.5$, $P=0.003$). Ainsi, les animaux isolés effectuent des séquences « dos à dos » qui durent plus longtemps que celles des animaux groupés, de 4 à 8 minutes (**Figure 57A** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 12.84$, $P=0.002$; effet temps, $F_{(1,15)} = 28.03$, $P<0.0001$; interaction groupe x temps, $F_{(1,15)} = 15.37$, $P=0.001$; test *post-hoc* de Mann-Whitney : 0-4 min : $U=21$, $P=0.10$; 4-8 min : $U=7$, $P=0.005$). Cette évolution temporelle différente entre les deux groupes est clairement visible sur la **Figure 57B**. Nous observons que chez les animaux isolés la mise en place des séquences comportementales « dos à dos » se fait au cours du temps et est en place au bout de 4 minutes d'interaction sociale. Tandis que chez les animaux non isolés, il n'y a jamais mise en place de ces comportements.

Lorsque nous regardons dans quelles circonstances les « dos à dos » se mettent en place, nous remarquons que chez les animaux en SIT-isolé, les séquences « dos à dos » apparaissent lorsque la densité de contact social diminue (**Figure 57C**). C'est-à-dire au cours de la deuxième partie de la tâche (de 4 à 8 minutes). Ces deux paramètres évoluent de façon inversée, les séquences « dos à dos » ne nécessitant pas de contacts sociaux. A l'inverse, chez les animaux en SIT-goupé, la densité de contact ainsi que la densité des séquences « dos à dos » restent très basses et n'évoluent que très peu au cours du temps (**Figure 57D**). Malgré une densité de contact basse, il semblerait que chez les individus non isolés, les « dos à dos » ne se mettent pas en place s'il n'y a pas eu de contact suffisant auparavant. Ces résultats montrent également que ces deux paramètres ne sont donc pas nécessairement liés.

- Evolution des séquences « stops » lors de l'interaction sociale

Nous avons ensuite quantifié et analysé l'apparition et les caractéristiques des événements de stop lors de l'interaction sociale. De manière intéressante, nous avons montré que les animaux non précédemment isolés effectuent plus de « stop » que les animaux isolés,

ceci sur les deux périodes de l'interaction sociale analysées (**Figure 58A** ; effet groupe, $F_{(1,15)} = 21.30$, $P=0.003$; test *post-hoc* de Mann-Whitney : 0-4 min : $U=11.5$, $P=0.01$; 4-8 min : $U=14$, $P=0.03$). Ce nombre d'événements « stop » reste constant au cours du temps pour les deux groupes (effet temps, $F_{(1,15)} = 4.11$, $P=0.06$). Par contre, malgré ce plus grand nombre de « stop », les animaux non isolés effectuent des arrêts qui sont significativement plus courts que ceux observés chez les animaux isolés avant l'expérience (**Figure 58B** ; effet temps, $F_{(1,15)} = 44.66$, $P<0.0001$; interaction groupe x temps, $F_{(1,15)} = 8.23$, $P=0.011$; test *post-hoc* de Mann-Whitney : 0-4 min : $U=1$, $P=0.0008$; 4-8 min : $U=0$, $P=0.005$).

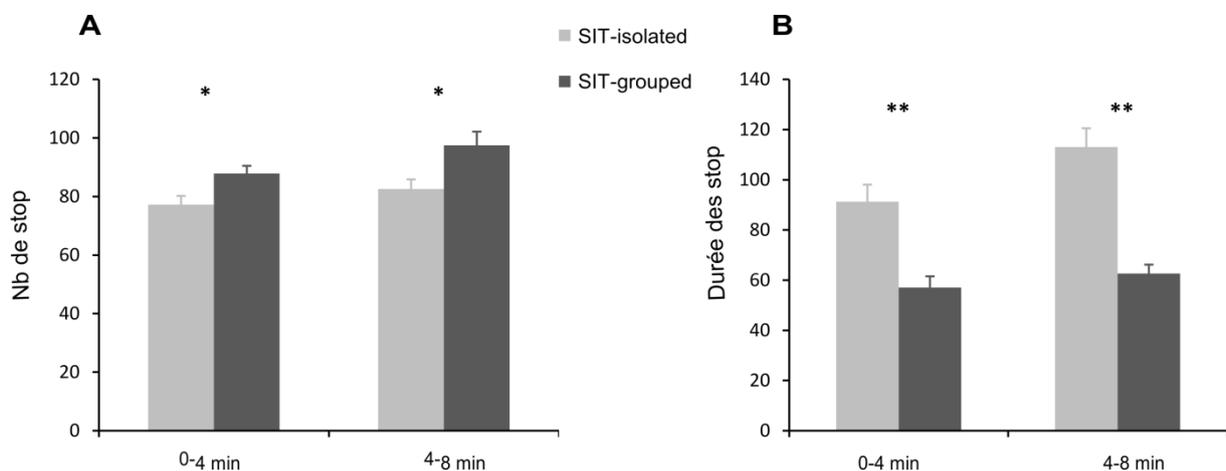


Figure 58: Analyse des séquences de « Stop ». (A) Nombre de « Stop » durant l'interaction sociale (B) Durées moyennes des séquences « Stop ». Mesures réalisées chez des animaux WT en SIT-isolé (n=9) et SIT-groupé (n=8) sur 8 minutes (réparties en périodes) d'interaction sociale. Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3.3. Hiérarchie des motivations lors de tâche de flexibilité sociale

Comme nous l'avons montré précédemment, les animaux $\beta 2\text{KO}$ ont beaucoup plus de mal que les animaux WT à mettre en place des comportements sociaux adaptés à la situation. Or la façon dont les animaux classent leurs motivations internes joue un rôle particulier lors de la SIT. Seulement, comme nous venons de le voir avec l'analyse fine du comportement, le comportement du visiteur influence largement le comportement de la dyade lors de la tâche. Or, quels que soit le génotype de l'animal test, le visiteur lors de la SIT est toujours une WT, et le rôle du visiteur dans le déficit d'interaction sociale chez les souris $\beta 2\text{KO}$ reste encore à éclaircir. Pour déterminer si le déficit de flexibilité était dû à une mauvaise évaluation ou un mauvais classement des motivations, nous avons donc mis en place une tâche sécurisante pour l'animal test dans laquelle il peut choisir, selon son état motivationnel, le temps passé au contact de chaque motivation (nourriture, exploration d'objet, ou exploration de congénère). Dans cette tâche le comportement de l'animal test n'est pas perturbé par le comportement du visiteur social, permettant ainsi d'observer la classification des motivations propre à l'individu.

a. Hiérarchie des motivations et état de satiété

Les animaux utilisés pour cette tâche ont été isolés durant les 3 semaines précédant l'expérimentation, comme lors de la SIT classique et sont nourris et hydratés *ad libitum*. Ensuite c'est animaux sont exposés à un conflit de motivation pouvant opposer deux des trois motivations suivantes ; de la nourriture (boulettes de sucrose), l'exploration d'un nouvel objet, ou d'un nouveau congénère enfermé sous un pot de plexiglas. Ainsi, nous observons le choix effectué par l'animal test en dehors de toute pression ou réaction à un comportement du congénère.

Nous avons donc montré, que pour le temps passé au contact des différentes motivations (**Figure 59A haut**), il n'existe aucune différence entre les deux génotypes de souris (effet génotype, $F_{(1,2)}=1.98$, $P=0.16$). A l'inverse, et ce peu importe le génotype des animaux, il existe une nette différence significative entre les motivations (effet condition, $F_{(1,2)}=54$, $P<0.0001$; interaction génotype x conditions, $F_{(1,2)}=3.3$, $P=0.04$, test *post-hoc* Mann-Whitney). En effet, les animaux WT passent plus de temps au contact du congénère qu'au

contact de la nourriture (U=4, P<0.0001) ou de l'objet (U=43, P=0.001). De même, ils passent plus de temps au contact de l'objet qu'au contact de la nourriture (U=28, P=0.0002).

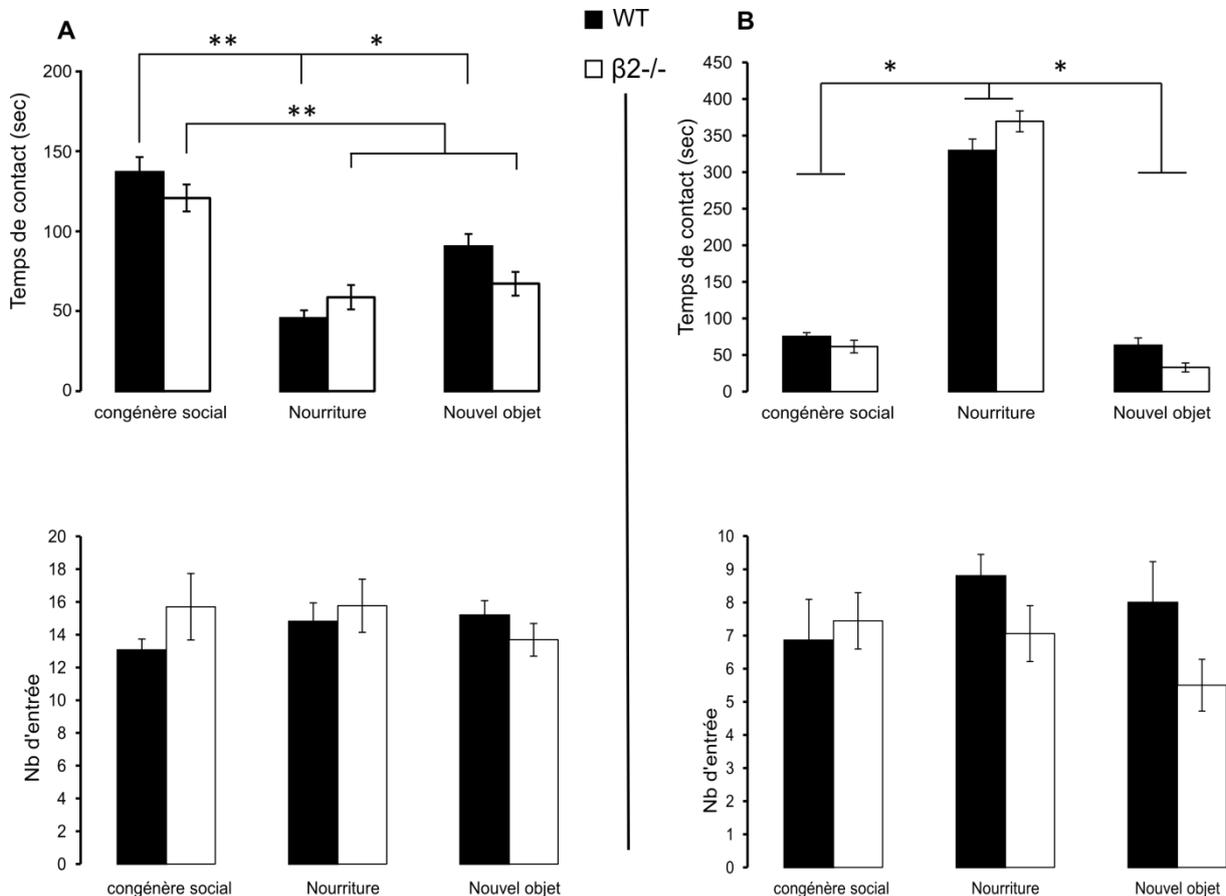


Figure 59: Hiérarchie des motivations naturelles (nourriture, exploration d'un nouvel objet, et d'un congénère) lors de la tâche de 3 chambres. Temps passés au contact de chacune des motivations (*haut*), et nombre d'entrées dans chaque bras appâté (*bas*) pour les animaux WT (n=16) et $\beta 2$ KO (n=17) en condition non privée (A) et en état de privation alimentaire (B). Les données sont présentées en moyenne \pm sem., et *P<0.01, **P<0.0001.

Les $\beta 2$ KO quand à eux, passent également plus de temps au contact de la motivation sociale, représentée par le congénère, qu'au contact de la nourriture (U=27, P<0.0001), ou qu'au contact de l'objet (U=26, P<0.0001). En revanche il n'y a aucune différence significative entre le temps passé au contact de la nourriture et celui passé à l'exploration de l'objet (U=121, P=0.58).

Pour exclure tout déficit d'exploration des différentes motivations, nous avons également quantifié et analysé les nombres d'entrée dans les différents compartiments contenant les motivations (**Figure 59A** *bas*). Nous avons montré qu'il n'y avait aucunes différences entre les groupes (effet génotype, $F_{(1,2)}=0.43$, $P=0.51$), ni même entre les conditions (effet condition, $F_{(1,2)}=0.30$, $P=0.73$). Les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ effectuent le même nombre d'entrées dans chacune des chambres.

Suite à la tâche de 3 chambres en condition normales décrites ci-dessus, les mêmes animaux ont, après 2 semaines de tranquillité, été placés en état de restriction alimentaire (85% de la masse corporelle). Cette manipulation crée une modulation de leur attrait naturel pour la motivation alimentaire. Ensuite, nous avons eu recours à la même tâche de 3 chambres pour observer leur nouvelle hiérarchisation des motivations. L'étude du temps passé au contact de chacune des motivations, révèle un changement considérable dans les priorités des animaux (**Figure 60B** *haut*). En effet, en bouleversant l'équilibre motivationnel, nous avons montré que les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ réagissent de la même façon à ce changement (effet génotype, $F_{(1,2)}=1.56$, $P=0.215$). Ainsi, les deux génotypes montrent un temps passé au contact de la nourriture plus élevé que celui passé au contact du congénère (WT : $U=0$, $P=0.0002$; $\beta 2\text{KO}$: $U=0$, $P<0.0001$) ou de l'objet (WT : $U=0$, $P=0.0001$; $\beta 2\text{KO}$: $U=0$, $P<0.0001$). De plus, les temps passés au contact de l'objet et du congénère ne diffèrent pas pour les WT (WT : $U=13$, $P=0.08$), mais les $\beta 2\text{KO}$ tendent à passer un peu plus de temps au contact du congénère malgré tout ($\beta 2\text{KO}$: $U=9$, $P=0.009$). Nous avons également observé que le nombre d'entrée dans chacun des compartiments est identique entre les génotypes (**Figure 60B** *bas* ; effet génotype, $F_{(1,2)}=2.18$, $P=0.14$; effet condition, $F_{(1,2)}=0.17$, $P=0.84$; interaction génotype x conditions, $F_{(1,2)}=1.21$, $P=0.30$). Ces résultats montrent que malgré un temps considérable passé au contact de la motivation alimentaire, les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ n'en délaissent pas moins l'exploration des autres motivations et effectuent autant d'entrée dans les différents compartiments.

b. Hiérarchie des motivations et émission d'USVs

De façon intéressante, nous avons également enregistré les USVs émises lors de ces deux tâches. L'objectif est de valider ou non l'émission d'USVs à certaines fréquence en fonction de l'état motivationnel de l'individu. En effet, nous supposons qu'en présence de la motivation sociale (laquelle semble préférée par les animaux) les animaux n'émettent des

USVs à plus haute fréquence que lors de la visite des deux autres motivations. Inversement, après privation alimentaire, la motivation la plus renforçante devient la motivation alimentaire. Ainsi, si notre hypothèse se confirme, les USVs émises au contact de la nourriture devraient refléter ce changement d'orientation motivationnelle. En divisant le nombre de ces USVs par le temps passé au sein de chacun des compartiments, nous obtenons un nombre d'USVs émises réellement en présence des motivations.

Pour les animaux effectuant la tâche de 3 chambres en condition de satiété normale (**Figure 60A**), nous avons observé qu'il n'existait pas de différences d'émission entre les WT et les β 2KO selon les conditions (effet génotype, $F_{(1,2)}=3.2$, $P=0.074$), par contre il y a un effet condition significatif ($F_{(1,2)}=22.1$, $P<0.0001$). En effet, chez les animaux WT et β 2KO, le nombre d'USVs émises au contact de la motivation sociale incarnée par le congénère, est significativement plus élevé que lors de l'exploration d'objet (WT : $U=26$, $P=0.0001$; β 2KO : $U=19$, $P<0.0001$) ou de la nourriture (WT : $U=23$, $P<0.0001$; β 2KO : $U=30$, $P<0.0001$). Aucune différence n'est observée entre le nombre d'USVs émises lors de l'exploration de l'objet et celle de la nourriture (WT : $U=126$, $P=0.93$; β 2KO : $U=135$, $P=0.97$).

En condition de privation alimentaire (**Figure 60B**), l'analyse du nombre d'USVs émises lors de la visite des différentes motivations révèle une différence entre les conditions (ANOVA ; effet génotype, $F_{(1,2)}=0.36$, $P=0.54$; effet condition, $F_{(1,2)}=16.67$, $P<0.0001$; interaction génotype x conditions, $F_{(1,2)}=1.69$, $P=0.19$; test *post-hoc* Mann-Whitney). En effet, chez les WT, le nombre d'USVs émises durant le contact social est plus élevé que le nombre d'USVs émises en exploration de nourriture ($U=8$, $P=0.001$). De même le nombre d'USVs associées à la nourriture est plus faible que lors de l'exploration d'objet ($U=28$, $P=0.03$), mais aucune différence n'est observée entre le nombre d'USVs associées à l'objet et celle associées à la motivation sociale ($U=18$, $P=0.24$). Chez les animaux β 2KO, le nombre d'USVs émises en contact de la motivation sociale est plus élevé que lors de l'exploration d'objet ($U=5$, $P=0.002$), ou lors de l'exploration de la nourriture ($U=4$, $P<0.0001$). Mais aucune différence n'est observée entre le nombre d'USVs émises entre le compartiment objet et le compartiment nourriture ($U=54$, $P=0.41$).

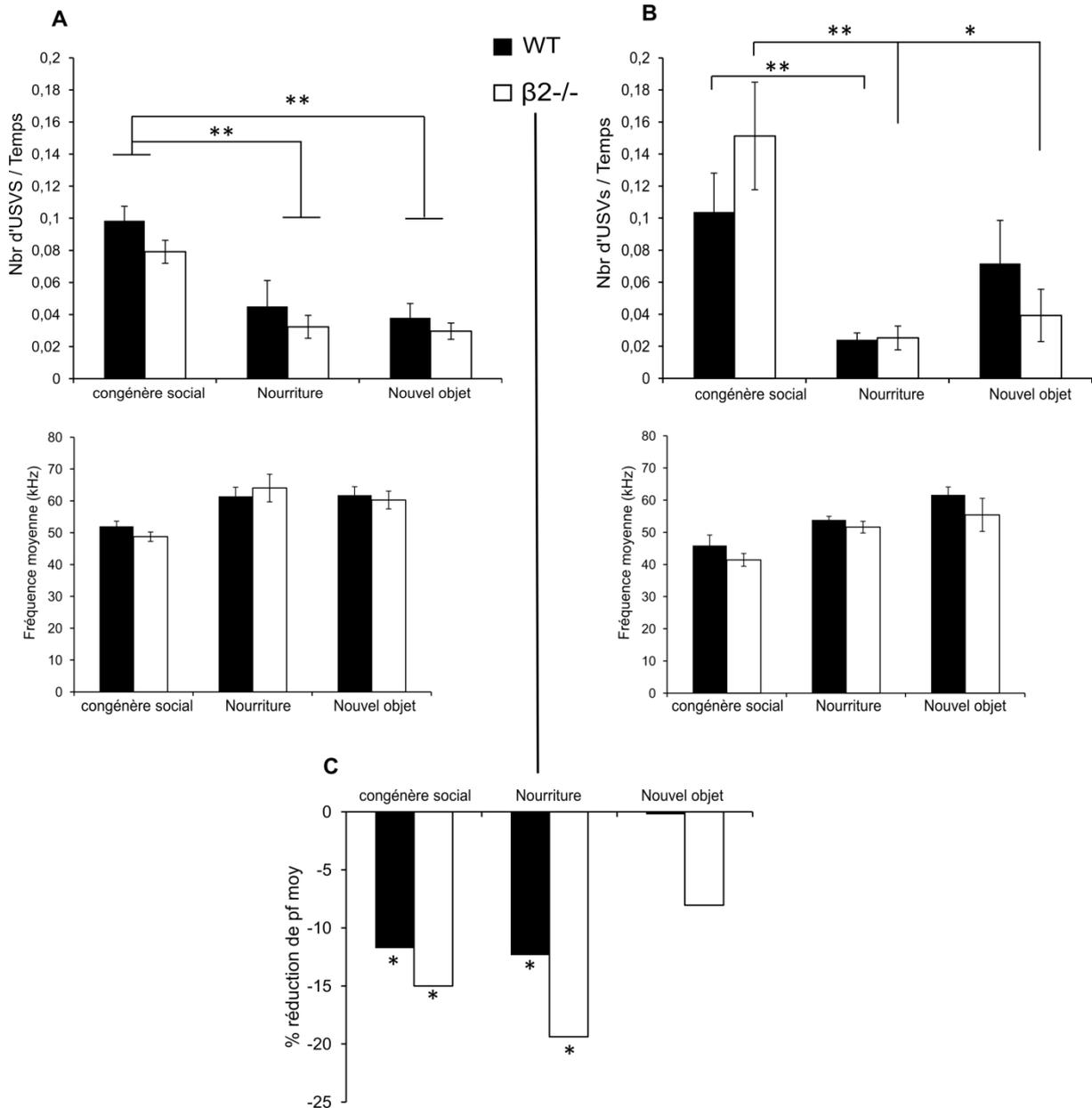


Figure 60: Hiérarchie des motivations naturelles lors de la tâche de 3 chambres et production d'USVs. Nombre d'USVs émises divisé par le temps passé dans chaque compartiment (*haut*), et fréquence moyenne des USVs émises (*bas*) chez les animaux WT (n=16) et $\beta 2$ KO (n=17) en condition non privé (A) et en condition de privation alimentaire (B). (C) pourcentage de réduction de la fréquence moyenne entre les deux conditions non privé et privé. Les données sont présentées en moyenne \pm sem. (Excepté pour la figure C), et *P<0.01, **P<0.0001.

De façon à compléter cette analyse des USVs en condition de hiérarchisation de motivations naturelles, nous avons réalisé une analyse des fréquences de ces vocalisations (utilisation de la fréquence moyenne ; fréquence moyenne = fréquence max + fréquence min / 2). Les résultats montrent que les animaux WT et β 2KO ne diffèrent pas dans leurs fréquences d'émission. Étonnamment la fréquence moyenne d'émission en motivation sociale est assez basse chez les deux groupes d'animaux WT et β 2KO (WT : 51.9±1.6 kHz ; β 2KO : 48.7±1.4 kHz). Dans le compartiment alimentaire, les souris émettent des USVs de fréquence plus élevée (WT : 61.4 ±2.8 kHz ; β 2KO : 64±4.3 kHz). De même au contact du nouvel objet (WT : 61.1±2.6 kHz ; β 2KO : 60.2±2.8 kHz). Lorsque les animaux sont état de privation alimentaire, leur fréquence moyenne d'émission semble diminuer. En effet, au contact du congénère social en 3 chambres, les fréquences moyennes des USVs émises par les souris WT et β 2KO ne diffèrent pas (WT : 45.8.9±3.2 kHz ; β 2KO : 41.4±1.9 kHz), mais sont significativement plus basses (de l'ordre de 10% inférieures) que lors de la condition non privé (**Figure 60C** : effet génotype, $F_{(1,5)}=2.52$, $P=0.11$; effet condition, $F_{(1,5)}=13.35$, $P<0.0001$; interaction génotype x conditions, $F_{(1,5)}=0.55$, $P=0.73$; test post-hoc Mann-Whitney ; WT : $U=25$, $P=0.03$; β 2KO : $U=26$, $P=0.006$). Au contact de la nourriture, nous n'observons de même aucune différence entre les génotypes (WT : 53.8±1.1 kHz ; β 2KO : 51.6±1.8 kHz), ainsi qu'une diminution d'environ 12% pour les WT et de 20% pour les β 2KO de la fréquence moyenne (WT : $U=52$, $P=0.007$; β 2KO : $U=52$, $P=0.0025$). En revanche aucune diminution significative n'est observée lors de l'exploration du nouvel objet WT : $U=60$, $P=NS$; β 2KO : $U=42$, $P=NS$).

Tableau 6: Tableau récapitulatif de la hiérarchie de motivation lors des conditions de trois chambres normale ou privée

	Condition non privée	
	<i>Temps de contact</i>	<i>Nombre d'USVs</i>
WT	Social > Objet > Nourriture	Social > Objet = Nourriture
β2KO	Social > Objet = Nourriture	Social > Objet = Nourriture
	Condition privée	
	<i>Temps de contact</i>	<i>Nombre d'USVs</i>
WT	Nourriture > Social = Objet	Social > Objet > Nourriture
β2KO	Nourriture > Social ≥ Objet	Social > Objet = Nourriture

Discussion:

Motivation sociale, interaction sociale et classement des motivations naturelles

Synthèse des résultats :

L'utilisation de *MiceProfiler* a permis de retrouver et de valider par le biais d'une analyse automatisée le comportement spécifique des animaux β 2KO obtenu sur 4 minutes en analyse manuelle. En effet, l'analyse automatique permet une analyse sur 8 minutes, et montre que les animaux β 2KO présentent un temps de contact élevé sur l'ensemble des 8 minutes. De plus nous avons vu que la majorité des contacts sociaux initiés par le résident étaient dus à des poursuites du congénère visiteur. L'impossibilité d'arrêter ces poursuites, alors qu'elles diminuent chez les WT, renforce l'idée d'un manque de flexibilité comportementale lors de la tâche d'interaction sociale chez les animaux β 2KO (Granon et al. 2003).

Par l'analyse automatique, nous avons pu montrer la mise en place de séquences comportementales spécifiques à l'interaction sociale. Des séquences, « dos à dos », évoluant différemment selon les souris WT et β 2KO. Chez les souris WT, elles se mettent en place au cours du temps, tandis que chez les β 2KO elles n'apparaissent quasiment pas. Cette analyse permet également de mettre en exergue des séquences d'immobilisation, appelées « stop ». Nos résultats montrent que ces « stop » représentent un point clé de prise de décision pour les souris WT. De plus le temps consacré à ces « stop » varie drastiquement entre les deux génotypes.

La comparaison du comportement social et notamment de ces marqueurs lors de la tâche SIT chez des animaux isolés et non-isolés a permis de mettre en évidence plusieurs divergences. Nous confirmons et affinons les résultats du chapitre 1, les animaux non isolés précédemment à l'interaction sociale passent beaucoup moins de temps au contact du congénère. De plus les séquences comportementales diffèrent, offrant plus de séquences à l'initiative du visiteur social (notamment les approches). En outre, il apparaît clairement que

la mise en place des séquences « dos à dos » varie chez les animaux non isolés. Elles ne se mettent pas en place au cours du temps comme chez les animaux isolés. Nous avons également montré que les périodes d'immobilité (stop) de l'animal test étaient également plus courts chez les animaux non isolés.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans la tâche de trois chambres montrent que l'organisation entre des motivations d'exploration d'un congénère, d'exploration d'objet et de consommation de nourriture est identique entre WT et β 2KO. Toutes les souris préfèrent d'abord aller au contact du congénère, puis explorer le nouvel objet et enfin consommer la nourriture. Cette organisation est bouleversée de la même façon au sein des deux génotypes, si l'on met les animaux en état de privation alimentaire, montrant ainsi une capacité d'adaptation des animaux β 2KO dans un environnement sans incertitude, c'est-à-dire lorsque l'animal test est seul décideur. En ce qui concerne les émissions d'USVs en présence des diverses motivations, le maximum d'USVs est toujours retrouvé au contact de la motivation sociale. Ensuite, la distribution des USVs semble totalement indépendante du temps passé au contact des diverses motivations. En effet, le nombre d'USVs émises en exploration d'objet reste relativement constant entre les deux tâches. Cependant lors de la plus forte consommation de la motivation alimentaire, lorsque les souris sont en état de privation alimentaire, nous observons une légère diminution du nombre d'USVs émises.

1. Interaction sociale, marqueur de flexibilité et prise de décision

a. un marqueur de flexibilité comportementale

Mise en place des séquences « dos à dos » et flexibilité

La nécessité d'adopter un comportement flexible lors de la tâche d'interaction sociale est primordiale. Pouvoir entreprendre des comportements d'approches du congénère, les stopper et initier un autre comportement (e.g. d'exploration) permet d'éviter tout comportement risqué et d'optimiser les choix possibles. Au sein de la SIT, de nombreuses séquences comportementales sont entreprises par les animaux. Et le passage de l'une à l'autre résulte d'une évaluation précise de nombreux paramètres, et d'une prise de décision adaptée, qui fait intervenir des acteurs préfrontaux (Killcross & Coutureau 2003; Rushworth et al. 2004; Rich & Shapiro 2009; Oualian & Gisquet-Verrier 2010). Grâce à l'analyse automatisée fournies par *MiceProfiler*, Nous avons pu mettre en évidence un type de comportement mis en place spécifiquement à l'arrêt d'un autre, et qui rend compte de la flexibilité comportementale requise lors de cette tâche. En effet, les séquences « dos à dos » observées dans nos données, se mettent en place chez les WT uniquement après diminution drastique des contacts sociaux. Ainsi, comme suggéré dans le chapitre 1, l'activation de l'OFC permettrait au contact social d'avoir une valeur évolutive (Sul et al. 2010), faisant diminuer le temps passé au contact social, et permettant la mise en place d'autres séquences comportementales.

Nos données montrent également que les séquences « dos à dos » ne se mettent pas en place chez les animaux β 2KO. En effet, le déficit comportemental des animaux β 2KO, proche de celui observé chez des souris au du cortex prélimbique lésé, tend à montrer que ces souris β 2KO ont un déficit dans l'exécution du maintien de la stratégie de contact social. Elles persévèrent dans le maintien d'une stratégie inadaptée à la situation, notamment en s'autorisant des séquences d'immobilité trop courtes, engendrant un fort taux de contact social, totalement rédhibitoire à la mise en place de séquences « dos à dos ». L'intérêt écologique de tels comportements « dos à dos » est actuellement inconnue mais ils pourraient permettre la surveillance de l'environnement. Or nos données montrent que les

animaux β 2KO passent beaucoup moins de temps que les WT à l'exploration de l'environnement. Plusieurs données montrent d'ailleurs que les animaux β 2KO ont un déficit d'exploration et que ce déficit est principalement dû à une hyperactivité, à une mauvaise organisation des séquences comportementales et une mauvaise résolution des conflits motivationnels (Granon et al. 2003; Maubourguet et al. 2008; Avale et al. 2008). L'absence de mise en place de comportements « dos à dos » chez ces souris reposerait sur une mauvaise gestion des conflits lors de l'interaction sociale et donc une surreprésentation de la valeur des contacts sociaux aux dépens des comportements d'exploration. La mise en place de « dos à dos » nécessite l'inhibition des contacts sociaux, sans arrêt des contacts, impossible pour les individus de mettre en place une stratégie de coopération dans un but exploratoire ou autre.

Flexibilité comportementale et Coopérativité

Un des traits fondamentaux de l'humain est sa capacité sans précédent à établir des comportements coopératifs avec un individu jusqu'à lors inconnu. Il était jusqu'ici admis que des formes avancées de coopération sont rares chez les espèces non-primates (Engemann et al. 2012), et que ces comportements sont apparus chez les primates non-humains il y a quelques millions d'années (Cosmides & Tooby 2005; Hare et al. 2007). Mais, depuis peu, des études décrivent des comportements similaires chez d'autres espèces animales et révèlent que ce comportement n'est pas exclusif aux primates (Viana et al. 2010). Bien que le terme de coopérativité nécessite une certaine réciprocité entre les individus, l'étude de tels concepts chez l'animal est encore largement sujette à débat malgré une littérature grandissante sur le sujet (Rutte & Taborsky 2007; Viana et al. 2010; Łopuch & Popik 2011). Nos résultats sur les séquences comportementales « dos à dos » pourrait aller dans le sens de cette hypothèse de coopération chez les rongeurs. En effet chez les souris WT nous remarquons la mise en place progressive de ces séquences après une période de contact social dense au début de la tâche. Ensuite les animaux ne se touchent quasiment plus et mettent en place cette séquence. La progression dans la mise en place des séquences « dos à dos » va dans le même sens que certaines données qui suggèrent que les comportements coopératifs sont évolutifs au cours du temps et nécessitent préalablement la mise en place d'interaction sociale entre les deux individus (Łopuch & Popik 2011). Rappelons que lors de ces séquences, les animaux se tournent le dos complètement et se trouve hors du champ de vision du congénère. En revanche, cette posture leur fournit un vue panoramique d'ensemble qui leur permet surveiller de manière collective l'ensemble de la pièce. Ce comportement observé chez

d'autres espèces (Ebensperger et al. 2006; Robert 1996) permet de surveiller l'arrivée d'éventuels prédateurs (ou de l'expérimentateur), ou de récolter le maximum d'informations sur l'environnement qu'ils pourront ensuite échanger. Ces événements « dos à dos » ne sont quasiment jamais observés chez les souris de souche 129SV ou DBA2 qui montrent des niveaux de contact affiliatifs très bas (particulièrement les 129SV), aucune évolution temporelle des séquences comportementales, et un haut niveau d'agressivité par rapport au C57BL6/J (Données supplémentaire en ligne, ARTICLE 5). Ces données renforcent l'idée que les contacts sociaux affiliatifs sont un pré-requis à la mise en place de telles séquences.

Nos résultats montrent également que les animaux β 2KO effectuent un nombre et une durée de contacts plus importants que les animaux WT. Nous observons pourtant que très peu de séquences « dos à dos » lors de la tâche. En effet, la mise en place de ces séquences est véritablement concomitante avec la baisse de la densité de contact au cours du temps, or les β 2KO ne diminuent pas leurs contacts sociaux au cours du temps. Dans la littérature plusieurs explications peuvent rendre compte de l'absence de ces événements de coopération. Il a été montré que le niveau d'impulsivité (Stephens 2002; Baker & Rachlin 2002; Stephens et al. 2006), ou l'état motivationnel de l'individu (Viana et al. 2010) modulaient la mise en place de coopération chez les animaux. En effet, une absence de coopération est observée chez des animaux présentant un haut degré d'impulsivité. De plus, la mise en place de comportements coopératifs se fait selon deux schémas opposés : (1) la propension pro-sociale, qui voudrait qu'un acte de coopération soit un comportement purement altruiste, avec une valeur de récompense attribuée à la perception du bénéfice de l'acte par l'autre (Camerer & Fehr 2006). (2) à l'inverse, basé sur une définition plus économique et plus égocentrique, l'animal coopèrerait chaque fois que cela implique un bénéfice (immédiat ou futur), et ce, quelles que soient les conséquences de cette action sur l'autre individu (Viana et al. 2010). Dans notre cas, nous savons que les animaux β 2KO ne présentent pas de troubles de l'impulsivité (ARTICLE 3). De plus, nous avons vu lors de l'expérience de trois chambres, qu'elles ne présentent pas d'état motivationnel envers l'interaction sociale différent de celui des WT. Ainsi, l'absence de séquences « dos à dos » semblerait principalement due au déficit de flexibilité comportementale entraînant un fort taux de contacts sociaux tout au long de la tâche.

En marge de la notion de coopération, nos données montrent que les séquences « dos à dos » sont également des postures de prise de risque. Laisser le congénère dans son dos sans pouvoir l'apercevoir nécessite de tolérer ce risque. En suivant cette hypothèse, les

animaux WT semblent plus enclins que les β 2KO à prendre des risques. Nos données suggèrent ainsi que les animaux β 2KO tolèrent mal la prise de risque dans un environnement aussi incertain que l'interaction sociale. Cependant des données supplémentaires et d'autres études sont nécessaires pour valider une telle hypothèse qui pourrait expliquer les difficultés de mise en place de comportements sociaux évolutifs chez les souris β 2KO.

b. Les points « clés » de prise de décision

Lors de tâches complexes comme l'interaction sociale, l'animal doit sans cesse évaluer les comportements du congénère et y réagir de la meilleure façon possible. Ce processus nécessite d'être attentif à l'autre, et surtout de prendre le temps de choisir entre différentes options de réponse. Cette prise de décision chez l'animal se fait à des moments clés, par exemple, des moments où l'animal « scanne » l'environnement et intègre les informations issues des différentes modalités pour prendre la bonne décision et entreprendre un comportement adapté. Chez la souris il a été montré que l'alternance des séquences comportementales favorisait l'apparition de ces séquences ou posture d'immobilité. Ces comportements, qui peuvent être des arrêts complets ou des mouvements à vitesse très réduite, sont considérés comme étant des moments associés à la collecte d'informations (Kramer & McLaughlin 2001; Whishaw et al. 2006), des moments de prise de décision pour l'animal (Maubourguet et al. 2008; Dvorkin et al. 2008). Jusqu'à lors ces séquences spécifiques n'ont été montrées que lors de tâche d'exploration d'environnement permettant à l'animal d'organiser son comportement futur. Nos résultats sont les premiers montrant que ce type de séquences est également observé lors de tâches plus complexes, nécessitant une adaptation instantanée.

Nous avons montré que les souris β 2KO effectuent le même nombre de période d'immobilité que les WT, mais que le temps qu'elles y consacrent est beaucoup plus court, et ce spécialement lors de la seconde période de la tâche. Nos données sont cohérentes avec de précédentes données de la littérature obtenues également chez les souris β 2KO (Maubourguet et al. 2008) qui montrent que chez ces animaux déficitaires pour la sous-unité β 2 des récepteurs nicotiques, le nombre ainsi que la durée des « stop » lors d'une tâche d'exploration en environnement libre étaient réduites. De même ces auteurs ont montré que

ces animaux était hyperactifs (Avale et al. 2008; Maskos 2010), et que cette hyperactivité pouvait être expliquée, d'une part par une diminution de ces événements « stop », et d'autre part par l'organisation des comportements qui en découlent. Dans notre tâche d'interaction sociale, seule la durée des « stops » est plus courte chez les souris β 2KO que chez les souris WT, leurs nombres ne varient pas entre les deux groupes. Cette différence est probablement due au fait que lors de notre tâche et à l'inverse de l'exploration d'environnement libre, il y a la présence d'un congénère social. Cet individu peut tout à fait perturber un événement stop en décidant d'initier un contact envers l'animal β 2KO.

Cependant, l'analyse de l'arbre des décisions qui découle de ces événements « stops » nous montre qu'ils représentent un « carrefour des décisions », et semblent appuyer leur rôle comme événements de prise de décision, comme c'est le cas lors de l'exploration (Maubourguet et al. 2008). Nos résultats montrent que chez les souris WT les séquences de poursuite initiées par le résident ont trois origines : les contacts oro-oral, oro-génital, et les « stops ». Tandis que chez les souris β 2KO, les événements de poursuite découlent souvent d'autres poursuites. Les « stops » ne représentent pas un point de départ pour la majorité des comportements, à l'inverse des souris WT, où la quasi-totalité des comportements peuvent être initiés à la suite d'un « stop ». Ces données sont cohérentes avec les données trouvées dans la littérature qui montrent que les animaux WT et β 2KO ont une organisation des séquences comportementales différentes en environnement libre (Maubourguet et al. 2008). De plus, de précédentes observations ont montré que les souris WT réagissent à la nouveauté en augmentant leur activité exploratrice, tandis que les souris β 2KO n'adaptent pas leurs comportements à un environnement changeant et font preuve d'un comportement plus rigide (Granon et al. 2003), comme c'est aussi le cas chez des animaux avec des lésions PrL (Granon & Changeux 2011).

2. Motivation sociale et flexibilité comportementale

a. Impact de la motivation sociale sur le contact social

Le modèle d'étude de la prise de décision qu'est l'interaction sociale, permet d'étudier des prises de décision répétées tout en modulant les principales motivations naturelles impliquées. Il est maintenant bien décrit dans la littérature que le contact social représente une source de motivation pour les animaux (Panksepp & Lahvis 2007; Panksepp 2007). De nombreuses études soulignent l'importance des systèmes impliqués dans la motivation et la récompense lors de contacts sociaux chez les animaux (Krach et al. 2010; Trezza, Damsteegt, et al. 2011; Trezza, Campolongo, et al. 2011a; Marco et al. 2011). L'isolement social chez la souris et le rat est fréquemment utilisé et étudié lors de protocoles expérimentaux (Brain 1975; Võikar et al. 2005; Krohn et al. 2006; Kuleskaya et al. 2011). Cependant il est important de noter la différence qui existe entre condition d'isolement total (physique, olfactif, acoustique) et élevage en condition individuelle (uniquement par la séparation physique). Dans la quasi-totalité des études, y compris la nôtre, il est question de condition d'élevage individuel. Cette modification des conditions d'élevage modifie fortement le comportement des animaux selon le fond génétique utilisé (Võikar et al. 2005; Silva et al. 2011). En effet, les souris C57BL6/J tendent à être plus actives que leurs congénères groupés, mais n'en deviennent pas pour autant plus agressives, contrairement au BALBC (Cambon et al. 2010).

De manière intéressante, nos données montrent que lorsque les conditions d'élevage changent, on modifie fortement l'interaction sociale des animaux. Les individus n'ayant pas été isolés préalablement à la SIT (SIT-groupé) effectuent beaucoup moins de contacts sociaux que les individus isolés (SIT-isolé). En effet, ils font seulement 20% de temps de contact sur l'ensemble de la tâche contre quasiment 40% pour les animaux en SIT-isolés. Ce temps de contact diminué est cohérent avec l'analyse des types de contacts initiés, car les animaux en SIT-groupés n'effectuent pratiquement pas de contact oro-oral, ou oro-génital par rapport au animaux en SIT-isolés. En clair, lorsque les animaux ne sont pas isolés avant la SIT, ils délaissent l'interaction sociale pour l'exploration de l'environnement. En accord avec les études précédentes, les présents résultats semblent supporter l'idée que la condition d'élevage de l'animal affecte significativement la qualité et la durée des interactions sociales

(Laviola & Terranova 1998; Terranova et al. 1999; Marco et al. 2011). En effet ces études montrent qu'un rat en présence d'un congénère connu consacre moins de temps à l'exploration sociale que lorsqu'il rencontre un individu inconnu. De plus il a été montré que l'isolement social induit une modification du système dopaminergique et du système opioïde, augmentant le niveau de comportement social chez le jeune rat (Niesink & Van Ree 1989; Vanderschuren et al. 1997). Nos résultats ainsi que ceux de la littérature renforcent l'hypothèse de l'impact de la modulation de la motivation sociale sur le comportement des animaux. En plaçant les animaux dans un état motivationnel augmenté pour l'interaction sociale, nous sommes capables de modifier drastiquement leur comportement social. De nombreux travaux montrent l'importance de circuits fonctionnels impliquant le CPF, le COF, le NAcc ainsi que les afférences dopaminergiques de ces structures dans le traitement des motivations alimentaires et probablement également sociales. Notamment, des travaux ont montré le rôle du GABA et d'une interaction Glutamate/Dopamine au sein du striatum ventral dans le traitement de la valeur motivationnelle des stimuli de l'environnement et le déclenchement de comportements motivés (Faure et al. 2008; Faure et al. 2010). Suggérant qu'en isolant les animaux, nous jouons sur la représentation de la récompense sociale de l'animal en modifiant la transmission dopaminergique associée.

b. Etat motivationnel, flexibilité comportementale et prise de décision

Une hypothèse alternative à la modification de la représentation de la récompense sociale, serait que l'isolement modifierait également (ou seulement) l'état émotionnel de l'animal. Cette modification pouvant être à l'origine même de nos résultats sur le contact social. De nombreuses études montrent que les conditions d'élevages des animaux en laboratoire influencent leur état émotionnel et motivationnel (Valzelli 1973; Kuleskaya et al. 2011; Olsson & Dahlborn 2002; Krohn et al. 2006; Võikar et al. 2005). Le syndrome d'isolement chez le rongeur est très bien décrit aujourd'hui et plusieurs études rapportent des troubles du comportement, tels que l'hyperactivité ou l'anxiété dans ces conditions (Koike et al. 2009; Wei et al. 2007; Hellemans et al. 2004). Cependant, ce type d'effet apparaît après une période d'isolement plutôt longue (entre 4 et 8 semaines d'isolement) et diffère fortement entre les mâles et les femelles (Valzelli 1973; Kuleskaya et al. 2011). Lors de nos protocoles, nous utilisons des périodes d'isolement relativement courtes (3 semaines

maximum), celles-ci ne suffisent pas à entraîner un état de stress intense chez les animaux. Ainsi, nous avons pu montrer qu'en modifiant les conditions d'élevage de ces animaux, nous étions aussi capables de modifier l'apparition des séquences « dos à dos » lors de l'interaction sociale. En effet, chez les animaux en SIT-isolés, on observe une évolution et une apparition des « dos à dos » au cours du temps, conjointement à la diminution des contacts de 4 à 8 minutes. Inversement, chez les individus en SIT-groupé, le nombre, ainsi que le temps passé au contact du congénère, de même que les séquences « dos à dos », restent très peu représentés. Ainsi, chez les animaux moins motivés pour l'interaction sociale, l'absence de ce marqueur putatif de flexibilité semble être liée à l'absence de contacts sociaux au début de la tâche. Les animaux passant la plupart de leur temps à l'exploration de l'environnement et non au contact du congénère (pour cause de motivation différente), cela ne permet pas la mise en place de ces séquences spécifiques. Nos données renforcent donc l'hypothèse soulevée dans le chapitre 1, à savoir qu'un conflit motivationnel (créé grâce à l'isolement social) permet la mise en place d'épisodes de flexibilité comportementale durant lesquels les animaux basculent d'une motivation à l'autre. De plus, il existe dans la littérature des évidences montrant que l'état motivationnel de l'individu joue sur ses capacités et sa volonté de coopération sociale (Viana et al. 2010). Nos données vont dans le même sens en montrant que chez les individus SIT-groupés, il n'y a quasiment pas de séquences comportementales « dos à dos » par rapport aux animaux SIT-isolés. Très récemment, une équipe de chercheurs a montré que les USVs produites chez le rat influencent l'efficacité des réponses instrumentales lors d'une tâche de coopération (Łopuch & Popik 2011). Ainsi, l'absence de séquence « dos à dos » lors de notre tâche de SIT-groupé pourrait s'expliquer par le faible taux de vocalisations émises lors de cette tâche comparé à la tâche SIT-isolé (Voir chapitre 2).

Ces animaux à la motivation sociale plus faible montrent également un nombre de séquences d'immobilité plus important que les animaux en SIT-isolés. Cependant la durée de ces arrêts est beaucoup plus faible. L'identification de ces séquences comme des points de prise de décision, nous amène à considérer l'impact de la motivation sociale sur les séquences de prise de décision. Ainsi, lorsque le conflit motivationnel entre deux motivations concurrentes n'est pas potentialisé par l'isolement social, les animaux semblent prendre moins de temps pour effectuer leurs prises de décision. De plus étant donné le faible taux de contact initié par le résident lors de la SIT-groupé, ces choix semblent donc s'orienter plus rapidement vers de l'exploration d'environnement.

3. Classement des motivations et comportement social

a. Hiérarchie de motivation et conflit motivationnel

Les premières études concernant les préférences de l'animal entre plusieurs choix apparaissent dans la littérature aux alentours de 1970 (Hughes 1976). En effet, Il est possible d'étudier la préférence de l'animal pour l'une ou l'autre des motivations qui lui est exposée, en considérant que plus l'animal passe de temps à l'exploration, plus la motivation est préférée (Moy et al. 2004; Nadler et al. 2004; Defensor et al. 2011). Bien que le choix conscient pour l'une ou l'autre des ressources présentées indique la préférence relative de l'animal, certains auteurs argumentent que l'expression d'une préférence par un choix n'indique pas à quel point cette option est importante pour l'animal (Matthews & Ladewig 1994). La force de la motivation peut être estimée par le « prix » que l'animal est prêt à « payer » pour accéder à la récompense. Cette réponse peut se faire par une réponse opérante, tel qu'un appui sur un levier, ou la capacité à endurer une expérience aversive (Matthews & Ladewig 1994). Plus le prix que l'animal est prêt à payer est élevé, plus la motivation est élevée, et donc plus important sera le comportement opérant (Mason et al. 1998; Olsson & Dahlborn 2002).

Dans notre étude nous nous sommes concentrés sur la préférence des animaux pour des motivations naturelles, telles que l'exploration d'un nouvel objet, le contact social, et la consommation de nourriture. L'utilisation de la tâche de trois chambres a permis de définir la hiérarchie entre ces trois motivations « primaires » chez la souris adultes mâles et de vérifier si les animaux $\beta 2\text{KO}$ présentent ou non un déficit dans leur classement. De précédentes données obtenues au laboratoire montrent que lorsque l'on rajoute une troisième motivation (alimentaire) lors de l'interaction sociale, les animaux $\beta 2\text{KO}$ montrent un déficit dans l'organisation entre ces trois motivations (ARTICLE 3). En effet, la sous-unité $\beta 2^*n\text{AChRs}$ semble être impliquée dans la capacité à refreiner un comportement engagé, et à évaluer correctement la valeur des récompenses associées aux différentes motivations. Elle semble également permettre l'établissement d'un classement approprié entre les motivations concurrentes lors de cette tâche. Comme nous l'avons montré précédemment pendant une tâche d'interaction sociale (Chapitre 1), les animaux consacrent une grande partie de leur temps à l'exploration de l'environnement. Ces données, ainsi que d'autres (Granon et al. 2003), renforcent l'idée que les souris $\beta 2\text{KO}$ ne souffrent pas d'une manque d'intérêt pour

l'exploration de l'environnement, mais montrent bien un déficit d'organisation comportementale (Maubourguet et al. 2008) fortement modulé par le système de récompense (Maskos et al. 2005; Avale et al. 2008). Les souris $\beta 2\text{KO}$ montrent un déficit dans l'intégration de l'information motivationnelle nécessaire à la planification comportementale (ARTICLE 2). Incorporer une troisième motivation dans le même contexte d'interaction sociale, nous renseigne certes sur le déficit d'organisation comportementale de ces souris, mais ne procure qu'une idée un peu biaisée de leur véritable hiérarchie de motivation. En effet, comme nous l'avons supposé précédemment, l'animal visiteur interagit fortement avec l'animal test. Son comportement influence obligatoirement les décisions de la souris test. Par exemple, lorsque l'animal test explore l'environnement, si le visiteur décide d'interagir avec lui, il va alors probablement initier un comportement de contact social qui sera suivi par la souris test. Donc le temps passé respectivement à l'exploration de l'environnement ou au contact social, n'est pas le reflet exact de la motivation intrinsèque de l'animal test, car le visiteur influence ce temps. Ainsi, l'utilisation d'un environnement sécurisé, tel que la tâche des trois chambres, où l'animal test (WT ou $\beta 2\text{KO}$) choisit de passer ou non un certain temps au contact de telle ou telle motivation (indépendamment des comportements initiés par le visiteur) nous donne un meilleur aperçu de leurs préférences naturelles, mais supprime un élément majeur de l'équation de prise de décision : l'incertitude.

De manière simple, les données obtenues jusqu'alors sur le déficit de classement motivationnel des animaux $\beta 2\text{KO}$, vont à l'encontre de ce que nous observons lors de notre tâche de trois chambres en condition de satiété (**Figure 59**). En effet, nous avons montré que lors de cette tâche les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ présentaient une préférence marquée pour le congénère social, puis pour l'exploration du nouvel objet et enfin pour la nourriture. Aucune différence de hiérarchie entre ces motivations n'est observée entre les deux génotypes. Nos données appuient les résultats de la littérature montrant que les souris $\beta 2\text{KO}$ n'ont pas de déficit dans l'appréciation de la récompense alimentaire (Granon et al. 2003). De plus, les données présentées dans le chapitre 1 montrent que des animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ non isolés avant l'interaction sociale, ne montrent aucune différence dans leurs comportements sociaux. Les animaux $\beta 2\text{KO}$ ont un taux d'interaction sociale au même niveau que celui des WT. Nos données renforcent donc l'idée que ces animaux ne présentent pas de déficit dans l'évaluation des motivations sociales ou d'exploration en tant que telles, mais montrent plutôt un déficit dans la gestion lorsque ces motivations entrent en conflit après isolement et lorsque le congénère se déplace et crée alors de l'incertitude dans l'environnement.

Ainsi, de façon à créer un conflit motivationnel chez ces animaux dans le contexte de l'étude des 3 chambres, nous avons privé les animaux de nourriture, et regardé quel était leur préférence motivationnelle. Nos données montrent que les animaux WT et $\beta 2\text{KO}$ réagissent de la même façon à ce traitement en adaptant leur classement de motivation de façon à consommer d'abord la nourriture, puis d'effectuer des contacts avec le congénère, et enfin l'exploration du nouvel objet. On remarque également que le nombre d'entrée dans chacun des compartiments est identique entre les génotypes et entre les motivations, comme lors de la première partie de l'expérience. L'aire prélimbique du CPF, chez la souris participe fondamentalement, comme chez l'humain (Sescousse et al. 2010), à la hiérarchisation entre motivations concurrentes lorsqu'un individu choisit de renforcer l'une ou l'autre (Granon & Changeux 2011). De plus, nous avons précédemment montré que les $\beta 2^*\text{nAChRs}$ au niveau PrL, jouent un rôle fondamental dans la gestion de la flexibilité comportementale lors des contacts sociaux. Nos présentes données montrent que lorsque l'on crée un conflit entre la motivation alimentaire et les autres motivations, les animaux $\beta 2\text{KO}$ ne présentent pas de déficit dans l'organisation et la gestion des motivations. La différence entre notre tâche d'interaction sociale et la tâche de 3 chambres utilisée ici, repose sur l'incertitude entourant les comportements liés au visiteur social. L'incertitude et, *a fortiori*, la prise de risque sont des facteurs extrêmement importants lors de la prise de décision (Dreher 2007; Tom et al. 2007; Doya 2008; Rivalan et al. 2009). En effet, des structures frontales (COF, CPF ventromédian) et sous-corticales (striatum dorsal, amygdale, insula) sont largement impliquées dans ces processus. Elles permettent de guider la prise de décision en intégrant les facteurs de risques et d'incertitudes au codage de la valeur de l'option et ainsi de moduler le schéma de prise de décision (Tom et al. 2007; Doya 2008; Rangel et al. 2008; Haber & Knutson 2010). Comme nous l'avons montré précédemment, les animaux $\beta 2\text{KO}$ ne présentent que très peu de séquences comportementales « dos à dos ». Ainsi, le niveau de prise de risque lors de la tâche d'interaction sociale semble diminué, et les animaux $\beta 2\text{KO}$ ne tolèrent pas ou peu que l'individu visiteur soit hors de leur champ de vision. Nos données appuient l'implication des $\beta 2^*\text{nAChRs}$ au sein du PrL, et renforcent l'hypothèse du rôle central des $\beta 2^*\text{nAChRs}$ dans la gestion de la flexibilité en condition incertaines, comme lors de l'interaction sociale avec un nouveau congénère.

b. L'émission d'USVs comme marqueurs motivationnels

L'hypothèse motivationnelle associée aux USVs chez le rongeur suppose que le niveau d'émission ainsi que les fréquences des USVs soient fortement lié à l'état motivationnel (Brudzynski 2007). Nos données obtenues dans le Chapitre 2 tendent à renforcer cette hypothèse. Cependant, lors de la condition de 3 chambres en présence de motivations concurrentes, les USVs émises, sur la base de leurs critères physiques (fréquence, nombre et durée) rendent difficilement distinguable les différentes motivations. En condition de satiété, les animaux émettent plus de vocalisations au contact de la motivation sociale, qu'au contact des motivations alimentaire ou nouvel objet. De plus, malgré l'absence de corrélation entre le nombre d'USVs et le temps passé à l'exploration de la motivation, nous observons une nette gradation du nombre d'USVs (similaire à celle observée pour le temps de visite de chaque stimulus). Cependant lorsque nous regardons de plus près les fréquences d'émissions, nous remarquons que la fréquence moyenne des USVs émises lors de l'exploration de la motivation sociale (congénère) est de l'ordre de 50 kHz, tandis que la consommation de nourriture et l'exploration d'objet génèrent des USVs à 60 kHz environ. Cette légère diminution de la fréquence moyenne d'émission en contexte social pourrait s'expliquer par la présence de la souris « récompense », elle-même restreinte sous le pot. En effet plusieurs études, dont nos résultats obtenus dans le Chapitre 2, rapportent l'émission d'USVs à basse fréquence dans un contexte aversif chez le rongeur (Portfors 2007; Litvin et al. 2007; Sadananda et al. 2008). Etant donnée l'impossibilité actuelle de différencier les USVs de l'une ou l'autre des souris, ces USVs à plus basse fréquence de l'individu sous le pot, mêlées à celle de l'individu test, engendreraient une fréquence moyenne d'émission plus faible enregistrée dans ce compartiment.

De récentes études suggèrent qu'un contact social direct est requis pour l'émission d'USVs haute fréquence chez la souris, tandis qu'un contact indirect (e.g. par présentation d'urine) ne permet pas l'enregistrement de telles USVs (Wang et al. 2008). Nos résultats montrent que nous sommes capables d'enregistrer des USVs à 50 kHz lors d'un contact social indirect, mais que ces USVs présentent une fréquence d'émission plus faible que lors d'un contact social direct. Ainsi, comme suggéré par ces études, c'est probablement le fait que le contact soit indirect qui rend l'émission d'USVs à plus haute fréquence plus difficile. Cette hypothèse rejoint notamment la relation qui existerait entre l'état émotionnel/motivationnel et l'émission d'USVs à haute ou basse fréquence. La frustration

de l'animal de ne pas pouvoir accéder à un contact social direct entraînerait l'émission d'USVs reflétant cet état.

De façon intéressante, lorsque les animaux subissent une privation alimentaire, nous observons une diminution significative des fréquences moyennes d'USVs au contact des motivations à la fois sociales, et alimentaires, tandis qu'aucune diminution n'est notée pour les USVs émises dans le compartiment lors de l'exploration du nouvel objet. De récentes données rapportent que la privation alimentaire entraîne des modifications physiologiques pouvant conduire à un état de stress intense chez l'animal (Bourguet et al. 2011; Hemsworth et al. 2011; Bauer et al. 2011; Wunderink et al. 2012). Ainsi, cet état de privation alimentaire chez l'animal peut conduire à l'émission d'USVs associées à un état plus « négatif », malgré la possibilité d'assouvir ce manque par la consommation de pastille de sucre.

*Partie V : Conclusions générales &
perspectives*

Conclusions générales & perspectives

Lors de ce travail de thèse, j'ai utilisé plusieurs approches complémentaires pour tenter d'apporter des éléments de réponse à la compréhension des processus de prise de décision et l'intégration des motivations naturelles chez la souris. L'étude de la prise de décision a été entreprise grâce à de nombreuses tâches plus ou moins compliquées qui mettent en exergue certains aspects spécifiques de ce processus. Nous avons vu en introduction qu'il existe, chez le rongeur, des tâches basées sur des labyrinthes (set-shifting, labyrinthe en croix modifié). Chacune de ces tâches présente des particularités en s'intéressant soit spécifiquement aux changements physiologiques de l'individu ou aux changements environnementaux. Nous n'avons pas la prétention d'avoir ici utilisé la tâche ultime pour étudier la prise de décision chez l'animal, mais la SIT présente l'intérêt d'être naturellement signifiante pour le rongeur. Elle permet notamment l'étude de la flexibilité comportementale dans un environnement relativement simple. Le principe repose sur la mise en conflit de deux (ou plusieurs) motivations en parallèle : dans la version la plus simple de la SIT (Granon et al. 2003), un conflit motivationnel est généré entre deux motivations naturelles très prégnantes : interagir avec un congénère alors qu'on en a été privé, et explorer un nouvel environnement. Cette situation incite l'animal d'une part à varier ses actions, et d'autre part à adapter son comportement en fonction des réactions du congénère auquel il est confronté.

Cependant, lors de cette tâche, le seul fait d'isoler l'animal pendant 3 semaines précédemment à l'expérience module à la fois sa motivation pour l'interaction sociale, mais également son état émotionnel. De plus, la modification de l'environnement dans lequel se déroule la tâche peut également influencer l'état émotionnel. Ces deux notions sont dans ce cas intimement liées, et la compréhension de l'implication de ces processus de façon individuelle est primordiale. Ainsi, au laboratoire, tout un projet visant à étudier les composantes strictement émotionnelles lors de la SIT est en cours. Ces manipulations passent par des conditions de stress chronique ou aigu avant exposition à la SIT et par le dosage de la corticostérone plasmatique et/ou corticale lors de l'isolement ou directement à la suite de la tâche d'interaction sociale pour les deux individus.

En partant de la tâche classique (SIT-isolé), nous avons décliné une tâche d'interaction sociale durant laquelle le conflit entre les deux motivations est beaucoup moins important. En effet, en n'isolant pas les animaux préalablement à l'expérimentation, notre hypothèse est que la motivation pour l'interaction sociale n'est pas aussi prégnante que lorsqu'ils ont été isolés. Certains psychologues du comportement animal comme Reuchlin M. (Reuchlin 1981), avance l'idée que le rat de Skinner n'apprend à appuyer sur le levier qu'en présence d'un renforçateur, la nourriture par exemple. En revanche, donner de la nourriture à un animal rassasié ne constitue pas un renforcement, comme nous avons pu le voir lors de la tâche de trois chambres. Ainsi, la force du renforçateur serait fonction de la création préalable d'un besoin (nourriture), que le renforçateur satisfait. Dans notre cas, en SIT, les animaux isolés présentent un temps au contact du congénère (renforcement social) plus élevé qu'en condition non isolée. De plus l'expression vocale de ces deux groupes est différente. En effet, les animaux isolés émettent des USVs à plus hautes fréquences (au-delà de 75 kHz), classiquement associées à un état émotionnel positif (Sadananda et al. 2008; Brudzynski 2007), tandis que les animaux non isolés émettent des USVs à des fréquences plus basses associées à un état émotionnel plus négatif (Brudzynski 2001; Litvin et al. 2007). Les ressemblances entre nos données et les principes de base de la motivation chez l'animal en conditionnement sont intéressantes. En effet, comme l'expression faciale du plaisir chez le rat (Berridge 2000; Berridge 2009), ces USVs reflètent, pour nous, un critère d'évaluation de l'état émotionnel de l'animal lors de la SIT.

L'autre point de ce travail de thèse concerne la mise en évidence de bases neurobiologiques de la prise de décision chez la souris. Depuis maintenant plusieurs dizaines d'années, le CPF est considéré comme le centre d'intégration des informations émotionnelles, motivationnelles, et sensorielles, qui toutes sont nécessaires à la bonne évaluation de situations complexes, et donc à la prise de décision chez les mammifères (Fuster 1997; Uylings et al. 2003; Wallis 2007). Seulement, comme décrit précédemment dans ce manuscrit, les étapes intervenant dans le processus de prise de décision sont nombreuses. Et bien évidemment, elles ne sont pas toutes gérées par une seule et même structure. Dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence l'existence d'une dichotomie entre plusieurs sous-parties du CPF lors de tâches complexes. En effet, au sein du PrL, la partie rostrale ne semble pas particulièrement impliquée lors de la SIT, à l'inverse de la partie plus médiane (PrL médian). Le rôle précis de cette dichotomie reste encore à définir, mais plusieurs études semblent corroborer nos résultats. Notamment, des études de traçage antérograde chez le rat

montrent un gradient rostro-caudal au sein des connexions PrL-NAcc (Gorelova & C. R. Yang 1997). Fonctionnellement, ces connexions cortico-striatales jouent un rôle dans la concrétisation des actions à la suite de la combinaison d'informations sensorielles au sein du CPF. Cependant, la distinction fonctionnelle des sous-parties (« core » et « shell ») du NAcc reste aujourd'hui encore relativement sujette à controverse (Everitt & Robbins 2005; Belin et al. 2009; Shiflett & Balleine 2011; Corbit & Balleine 2011) et le rôle de cette dichotomie doit être éclairci. L'utilisation d'enregistrements électrophysiologiques *in vivo* (Battaglia et al. 2009) situés spécifiquement sur les aires rostrales ou médiales du PrL pourrait permettre de mieux comprendre l'implication fonctionnelle de ces sous-parties lors de la SIT.

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence une multitude de marqueurs comportementaux nouveaux associés à l'interaction sociale, et par extension, à la flexibilité comportementale. En effet, l'analyse automatisée via MiceProfiler, de la SIT a permis de définir deux éléments jusqu'alors impossibles à quantifier manuellement : l'analyse temporelle des séquences comportementales, et l'analyse couplée des comportements des deux animaux. Notamment, cette analyse a mis en évidence les séquences « dos à dos », définies comme des marqueurs temporels de flexibilité comportementale. En effet, la mise en place de ce comportement repose sur un bon équilibre entre recherche du contact social et satisfaction d'autres motivations et chez les animaux WT, ces séquences n'émergent que lorsque leurs contacts sociaux diminuent au cours du temps. Ce n'est pas le cas des animaux $\beta 2$ KO, qui à cause d'un déficit de flexibilité (Granon et al. 2003; Maubourguet et al. 2008), présentent un taux de contact sociaux élevé. Ainsi, s'il n'y a pas d'arrêt des contacts, la mise en place des séquences « dos à dos » est impossible, car ces critères sont mutuellement exclusifs. Inversement, lorsque les animaux ne présentent pas de motivation particulière pour l'interaction sociale (SIT-groupé), le taux de contact reste bas. Malgré cela, les « dos à dos » sont inexistantes. Ceci montre qu'il ne suffit pas que les souris n'aient pas de contact pour que les dos à dos se mettent en place; il s'agit donc certainement de postures choisies conjointement et non pas obtenues aléatoirement. Il y a donc une alchimie complexe pour la mise en place des « dos à dos », mais l'un des éléments clé semble être la flexibilité comportementale permettant des ruptures entre séquences comportementales. La mise en évidence de ce critère de flexibilité a permis de mieux caractériser le comportement rigide des animaux $\beta 2$ KO. Une des caractéristiques des « dos à dos », est que les individus ne se voient pas et couvrent (grâce à leurs champs de vision respectifs) la totalité de l'environnement. De ces séquences spécifiques à une coopération

entre les animaux, il n'y a qu'un pas. En effet, la mise en place de comportements coopératifs entre les rongeurs a pu être montrée dans différentes études récentes (Łopuch & Popik 2011; Tsoory et al. 2012; Schneeberger et al. 2012). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les séquences « dos à dos » reflètent des comportements de coopération destinés à la surveillance de l'environnement. Il serait alors intéressant d'étudier le rôle des contacts sociaux en termes d'échange d'informations: comment les animaux décident-ils de la mise en place de ces comportements ? Est-ce au moment des contacts ? Si oui quels rôles jouent les USVs dans la mise en place de ces séquences « dos à dos » ? Comme nous l'avons décrit, seuls les animaux WT en SIT-isolé présentent un taux d'émission d'USVs élevé fortement corrélé au contact social. De plus ces contacts sociaux sont majoritairement oro-oral, plus favorable à la transmission d'informations sociale, probablement nécessaire à la mise en place de la coopération. Inversement, chez les individus β 2KO, les contacts sociaux initiés par le résident envers le visiteur sont oro-génitaux, et malgré un niveau d'émission identique aux WT, il n'y a pas de séquence « dos à dos ». Pour expliquer cette différence, l'hypothèse majeure que nous envisageons est que les individus β 2KO possèdent un fort déficit de flexibilité lors de la gestion de situations conflictuelles (Granon et al. 2003) qui les empêchent de basculer vers des comportements coopératifs.

De façon intéressante, des résultats récents obtenus au laboratoire, montrent que des dyades de souris β 2KO/ β 2KO en SIT ne vocalisent pas. Il est donc pertinent de se demander si ce déficit de flexibilité observé typiquement chez les β 2KO entraîne un mutisme des animaux, ou si, inversement, l'absence d'émission d'USVs chez ces animaux expliquerait le manque de flexibilité. Des éléments de réponse pourraient être fournis en procédant à l'enregistrement des USVs chez des animaux β 2KO réexprimés pour la sous-unité β 2 au PrL lors de la SIT.

Nous avons vu tout au long de ce manuscrit que les USVs semblent jouer un rôle important lors de la tâche d'interaction sociale, et qu'elles pourraient représenter un marqueur physiologique de la motivation sociale. En effet, notre étude est la première à comparer l'émission d'USVs au sein de trois conditions sociales différentes variant selon le niveau de « feedback » social fourni à l'animal test. Nous avons observé que le niveau d'émission d'USVs est fortement lié à ce « feedback ». De plus, si les animaux sont motivés pour l'interaction sociale (SIT-isolé *versus* SIT-goupé) ces USVs sont fortement corrélées au temps de contact social : le nombre, mais aussi la fréquence de ces USVs sont augmentés. Ces

données s'accordent avec celles de la littérature (Panksepp et al. 2007; Moles et al. 2007), mais elles posent la question fondamentale concernant l'origine de l'émission de ces USVs. Est-ce qu'un attracteur attentionnel suffirait au déclenchement des USVs ? En effet, lors de la présentation d'urine d'un congénère très peu d'USVs sont enregistrées, tandis que lors de la tâche des 3 chambres il y en a un peu plus (mais beaucoup moins que lors de la SIT). Ainsi en présentant un attracteur attentionnel (un élément animé par exemple), quel serait l'émission de ces animaux ? La mise au point d'un tel outil (Bernard et al. 2010; Meyer & Guillot 2007), tel qu'il a pu être mis en place dans l'étude du comportement chez le poisson zèbre (Abaid et al. 2012) permettrait d'une part de s'affranchir des biais concernant l'identité de l'individu vocalisant, mais également de voir si le simple fait d'introduire un attracteur attentionnel en mouvement suffit à générer des USVs chez l'animal test.

Grâce à ce travail de thèse, notre équipe a mis pour la première fois en évidence le lien entre état motivationnel et émotionnel et l'émission de vocalisations chez la souris. Ces résultats montrent que, comme chez le rat (Brudzynski 2007), Les souris émettent des USVs à plus basses fréquences lors des tâches à « valeur négative ». Inversement lors des tâches à « valeur positive », comme lors de la SIT, les USVs sont émises à des fréquences plus hautes. Cette relation entre l'état de l'animal et ces émissions de sons est bien connue chez l'humain. Un état émotionnel négatif entraînant un changement de prosodie vers des gammes de fréquence plus haute et inversement (House et al. 1987). Bien que cette prosodie soit inversée chez le rongeur, son utilisation permettrait de connaître avec plus ou moins de certitude l'état émotionnel dans lequel se trouve l'animal. De plus, un changement dans l'expérience affective subjective pourrait être la cause proximale d'un changement de comportement (G P Lahvis et al. 2010). De façon schématique, la prosodie est le reflet de l'état émotionnel, qui lui-même influence fortement le comportement des animaux. Comme chez le rat (Normansell & Panksepp 1990; Wöhr & Schwarting 2009), pour corroborer l'existence d'un tel lien, direct, entre les états émotionnels et l'émission d'USVs chez la souris, il serait judicieux de procéder à des expérimentations pharmacologiques destinée à influencer l'état émotionnel des animaux. Une telle étude est actuellement en cours au sein du laboratoire. En effet, nous avons voulu voir si l'injection de Diazépam (anxiolytique) entraîne une modification des émissions, et plus particulièrement des caractéristiques physiques (fréquence d'émission, modulation, durée) des USVs. L'idée étant de réussir à obtenir un profil d'expression des USVs différent (pourquoi pas similaire à la SIT) lors de la tâche de contention durant laquelle les souris émettent des USVs à basse fréquence. Dans le même registre, l'utilisation du

« playback » chez la souris permettrait de répondre à certaines questions concernant la relation entre les états émotionnels ou motivationnels et les vocalisations. Cette technique qui consiste à rejouer la bande sonore de sons enregistrés chez l'animal lors d'une situation spécifique, et qui est largement utilisée chez le rat (Burgdorf et al. 2008; Sadananda et al. 2008; Wöhr & Schwarting 2007), reste marginale chez la souris (Wöhr et al. 2011). En utilisant des bandes sons enregistrées lors de conditions appétitives (contact social par exemple), il serait intéressant de voir si ces sons induisent une approche de l'animal test et s'ils représentent un stimulus motivant pouvant donner lieu à un conditionnement opérant. Inversement, en utilisant le principe d'empathie développé par l'équipe de Garet Lahvis (Chen et al. 2009), nous pourrions voir si le fait de jouer un son enregistré lors d'une tâche aversive (contention, choc électrique) module l'état émotionnel de l'animal « spectateur ».

En outre, depuis les débuts de l'utilisation des souris au laboratoire, ces dernières ont toujours été élevées dans des cages limitant les opportunités de variation de température, d'accès à la nourriture, de rencontre avec un prédateur, avec de nouveaux partenaires, etc. À côté de cela, les souris domestiques montrent des comportements hautement variables et différents de ceux promus par une cage d'élevage standard (Bronson 1979). Nous sommes ainsi obligés de nous demander comment seraient les USVs de souris de laboratoire en réponse à un environnement plus complexe, comprenant une variété d'états émotionnels et sociaux, tels que peut en rencontrer une souris sauvage. Une étude s'est particulièrement focalisée sur la comparaison des émissions d'USVs entre souris de laboratoire et souris sauvages, de façon à savoir si les USVs couramment enregistrées en laboratoire pourraient être issues d'un artefact dû à la captivité ou non (Kalcounis-Rueppell et al. 2010). Les auteurs n'ont pas relevé de différences significatives entre les USVs des deux groupes, et ont donc conclu que la captivité n'avait aucune incidence sur l'émission d'USVs chez la souris. Toutefois l'utilisation d'environnements qui incorporent des stimuli à la fois renforçant et aversifs, associés à un contexte social plus complet et complexe (comme lors d'enrichissement par exemple (Silva et al. 2011)), pourrait fournir un modèle utile à la compréhension réelle des liens entre états émotionnels et USVs. Depuis quelques années, plusieurs équipes de chercheurs se sont penchées sur ce problème, et tentent d'élucider le véritable rôle de ces USVs et des conséquences d'une putative prosodie chez des souris sauvages (Musolf et al. 2010; Hoffmann et al. 2012).

Parallèlement à cela, l'idée du « langage » des souris et de ses composantes innées ou acquises reste un domaine actuellement en plein questionnement. Bien que des expériences

d'élevages croisés ne montrent pas de preuves apparentes de mécanisme d'apprentissage vocal chez la souris, de récents travaux mettent en évidence que les mâles émettent leurs vocalisations différemment en présence d'autres mâles d'espèces différentes (Petkov & Jarvis 2012). Pour ces auteurs, il semblerait que l'apprentissage vocal chez la souris soit relativement limité, parce que ces animaux semblent faire des variations acoustiques à partir de vocalisations innées (Kikusui et al. 2011). Ainsi, la détermination de la valeur innée ou acquise des différentes composantes des vocalisations chez la souris, notamment la prosodie, est une question cruciale en vue d'une meilleure compréhension de la putative fonction des USVs.

Bibliographie

- Abaid, N. et al., 2012. Zebrafish responds differentially to a robotic fish of varying aspect ratio, tail beat frequency, noise, and color. *Behavioural brain research*, 233(2), pp.545–53.
- Ahrens, A.M. et al., 2009. Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behavioural brain research*, 197(1), pp.205–9.
- Alexander, G.E., DeLong, M.R. & Strick, P.L., 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann Rev Neurosci*, 9, pp.357–381.
- Amodio, D.M. & Frith, C.D., 2006. Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(4), pp.268–77.
- Arakawa, H., Blanchard, D C & Blanchard, R J, 2007. Colony formation of C57BL/6J mice in visible burrow system: identification of eusocial behaviors in a background strain for genetic animal models of autism. *Behavioural brain research*, 176(1), pp.27–39.
- Del Arco, A. & Mora, F., 2009. Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 116(8), pp.941–52.
- Arriaga, G. & Jarvis, E.D., 2011. *Of Mice , Birds , and Men* : by.
- Assadi, S.M., Yücel, M. & Pantelis, C., 2009. Dopamine modulates neural networks involved in effort-based decision-making. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 33(3), pp.383–93.
- Avale, M.E. et al., 2008. Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), pp.15991–6.
- Baker, F. & Rachlin, H., 2002. Self-control by pigeons in the prisoner's dilemma. *Psychonomic bulletin & review*, 9(3), pp.482–8.
- Barbas, H & Pandya, D.N., 1989. Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of comparative neurology*, 286(3), pp.353–75.
- Barbas, Helen, 2000. *Proceedings of the Human Cerebral Cortex : From Gene to Structure and Function Connections underlying the synthesis of cognition , memory , and emotion in primate prefrontal cortices. , 52(5)*, pp.319–330.
- Battaglia, F.P. et al., 2009. The Lantern: an ultra-light micro-drive for multi-tetrode recordings in mice and other small animals. *Journal of neuroscience methods*, 178(2), pp.291–300.
- Bauer, C.M. et al., 2011. Effects of predictable and unpredictable food restriction on the stress response in molting and non-molting European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 160(3), pp.390–9.
- Beatty, W.W. et al., 1982. Psychomotor stimulants, social deprivation and play in juvenile rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 16(3), pp.417–22.

- Bechara, A et al., 2001. Decision-making deficits, linked to a dysfunctional ventromedial prefrontal cortex, revealed in alcohol and stimulant abusers. *Neuropsychologia*, 39(4), pp.376–89.
- Bechara, A et al., 1996. Failure to respond autonomically to anticipated future outcomes following damage to prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 6(2), pp.215–25.
- Bechara, A et al., 1994. Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition*, 50(1-3), pp.7–15.
- Bechara, A & Damasio, H., 2002. Decision-making and addiction (part I): impaired activation of somatic states in substance dependent individuals when pondering decisions with negative future consequences. *Neuropsychologia*, 40(10), pp.1675–89.
- Bechara, A, Dolan, S. & Hindes, A., 2002. Decision-making and addiction (part II): myopia for the future or hypersensitivity to reward? *Neuropsychologia*, 40(10), pp.1690–705.
- Beckstead, M.J. et al., 2004. Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*, 42(6), pp.939–46.
- Belin, D. et al., 2009. Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behavioural brain research*, 199(1), pp.89–102.
- van den Berg, C.L. et al., 1999. Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental psychobiology*, 34(2), pp.129–38.
- Bernard, M. et al., 2010. A Supramodal Vibrissa Tactile and Auditory Model for Texture Recognition. , pp.188–198.
- Berridge, K.C., 2009. “Liking” and “wanting” food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & behavior*, 97(5), pp.537–50.
- Berridge, K.C., 2000. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 24(2), pp.173–98.
- Berridge, K.C., 2004. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & behavior*, 81(2), pp.179–209.
- Berridge, K.C., 2003. Parsing reward. *Trends in Neurosciences*, 26(9), pp.507–513.
- Berridge, K.C. & Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research. Brain research reviews*, 28(3), pp.309–69.
- Bindra, D., 1974. A motivational view of learning, performance, and behavior modification. *Psychological review*, 81(3), pp.199–213.
- Birrell, J.M. & Brown, V.J., 2000. Medial Frontal Cortex Mediates Perceptual Attentional Set Shifting in the Rat. , 20(86), pp.4320–4324.
- Bisler, S. et al., 2002. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *Journal of chemical neuroanatomy*, 23(3), pp.187–98.

- Bissonette, G.B. et al., 2008. Double dissociation of the effects of medial and orbital prefrontal cortical lesions on attentional and affective shifts in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(44), pp.11124–30.
- Björklund, A. & Dunnett, S.B., 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in neurosciences*, 30(5), pp.194–202.
- Blaha, C.D. et al., 1996. Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculo-pontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(2), pp.714–22.
- Blaha, C.D., Columbia, B. & Kingdom, U., 1993. Modulation Stimulation Tegmental of Dopamine Efflux in the Striatum following Cholinergic of the Substantia Nigra in Intact and Pedunculo-pontine Rats. , 73(March).
- Blanchard, R J et al., 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiology & behavior*, 50(5), pp.967–72.
- Blanchard, R J & Blanchard, D C, 1977. Aggressive behavior in the rat. *Behavioral biology*, 21(2), pp.197–224.
- Block, A.E. et al., 2007. Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 17(7), pp.1625–36.
- Bolla, K. et al., 2003. Orbitofrontal cortex dysfunction in abstinent cocaine abusers performing a decision-making task. *NeuroImage*, 19(3), pp.1085–1094.
- Bollen, B. et al., 2007. Learned defense response to hypoxia in newborn mice. *Neuroscience letters*, 420(3), pp.268–72.
- Bolles, R., 1980. Some functionalistic thoughts about regulation. In T. T.W & H. T.W, eds. *Analysis of motivational processes*. New York: Academic Press.
- Boretius, Susann et al., 2009. MRI of cellular layers in mouse brain in vivo. *NeuroImage*, 47(4).
- Borta, A., Wöhr, M. & Schwarting, R K W, 2006. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural brain research*, 166(2).
- van den Bos, R et al., 2006. Toward a rodent model of the Iowa gambling task. *Behavior research methods*, 38(3).
- Bourgeois, J.-P. et al., 2011. Modulation of the Mouse Prefrontal Cortex Activation by Neuronal Nicotinic Receptors during Novelty Exploration but not by Exploration of a Familiar Environment. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, (86).
- Bourgeron, T., Jamain, S. & Granon, S., 2006. Animal models of autism: Focus on genetic models and behavioral test paradigms. In G.S. Fisch & J. Flint, ed. *Transgenic and knockout models of neuropsychiatric diseases*. Contemporary clinic neuroscience, Humana Press Inc., pp. 151–174.
- Bourguet, C. et al., 2011. Effects of feed deprivation on behavioral reactivity and physiological status in Holstein cattle. *Journal of animal science*, 89(10).

- Bradbury, J.W. & Vehrencamp, S., 2000. Economic models of animal communication. *Animal behaviour*, 59(2).
- Brain, P., 1975. What does individual housing mean to a mouse? *Life sciences*, 16(2).
- Branchi, I. et al., 1998. Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Developmental psychobiology*, 33(3).
- Briefer, E.F., 2012. Vocal expression of emotions in mammals: mechanisms of production and evidence S. Le Comber, ed. *Journal of Zoology*, p.n/a-n/a.
- Brigman, J.L. et al., 2006. Executive functions in the heterozygous reeler mouse model of schizophrenia. *Behavioral neuroscience*, 120(4), pp.984-8.
- Bronson, F.H., 1979. The reproductive ecology of the house mouse. *The Quarterly review of biology*, 54(3), pp.265-99.
- Broughton, W.P., 1963. *Acoustic behavior of animals* Boston: El. R. G. Burnel, ed.
- Brown, V.J. & Bowman, E.M., 2002. Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends in neurosciences*, 25(7).
- Brudzynski, S.M., 2001. Pharmacological and behavioral characteristics of 22 kHz alarm calls in rats. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(7-8).
- Brudzynski, S.M., 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behavior genetics*, 35(1).
- Brudzynski, S.M., 2007. Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behavioural brain research*, 182(2).
- Brudzynski, S.M., 1994. Ultrasonic vocalization induced by intracerebral carbachol in rats: localization and a dose-response study. *Behavioural brain research*, 63(2).
- Brudzynski, S.M. & Chiu, E.M., 1995. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & behavior*, 57(6).
- Brudzynski, S.M. & Ociepa, D., 1992. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiology & behavior*, 52(4).
- Brudzynski, S.M. & Pniak, A., 2002. Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *Journal of Comparative Psychology*, 116(1).
- Bunsey, M. & Eichenbaum, H., 1995. Selective damage to the hippocampal region blocks long-term retention of a natural and nonspatial stimulus-stimulus association. *Hippocampus*, 5(6).
- Burgdorf, J. et al., 2001. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behavioral Neuroscience*, 115(4).
- Burgdorf, J. et al., 2008. Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of comparative psychology*, 122(4).

- Burgdorf, J., Knutson, B. & Panksepp, J, 2000. Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behavioral neuroscience*, 114(2).
- Burgdorf, J. & Panksepp, J, 2006. The neurobiology of positive emotions. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(2).
- Burgess, M.L. et al., 1991. Intracranial self-stimulation motivates treadmill running in rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 71(4).
- Calcagnetti, D.J. & Schechter, M.D., 1992. Place conditioning reveals the rewarding aspect of social interaction in juvenile rats. *Physiology & behavior*, 51(4).
- Callicott, J.H. et al., 2003. Abnormal fMRI response of the dorsolateral prefrontal cortex in cognitively intact siblings of patients with schizophrenia. *The American journal of psychiatry*, 160(4).
- Cambon, K. et al., 2010. Aggressive behavior during social interaction in mice is controlled by the modulation of tyrosine hydroxylase expression in the prefrontal cortex. *Neuroscience*, 171(3).
- Camerer, C F & Fehr, E., 2006. When does “economic man” dominate social behavior? *Science (New York, N.Y.)*, 311(5757).
- Camille, N. et al., 2004. The involvement of the orbitofrontal cortex in the experience of regret. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674).
- Cavedini, P, Riboldi, G, D’Annunzi, A., et al., 2002. Decision-making heterogeneity in obsessive-compulsive disorder: ventromedial prefrontal cortex function predicts different treatment outcomes. *Neuropsychologia*, 40(2).
- Cavedini, P, Riboldi, G, Keller, R, et al., 2002. Frontal lobe dysfunction in pathological Gambling Patients. *Biological Psychiatry*, 3223(01).
- Cavedini, P et al., 2004. Neuropsychological investigation of decision-making in anorexia nervosa. *Psychiatry research*, 127(3).
- Cavedini, Paolo, Riboldi, Giovanna, Keller, Roberto, et al., 2002. Gambling Patients. *Biological Psychiatry*, 3223(01).
- Changeux, J-P & Edelman S J, 2005. *Nicotinic Acetylcholine Receptors* Odile Jaco.,
- de Chaumont, F. et al., 2012. Computerized video analysis of social interactions in mice. *Nature methods*, (MaRch).
- Chen, Q, Panksepp, J B & Lahvis, G P, 2009. Empathy is moderated by genetic background in mice. *PloS one*, 4(2).
- Chevallier, C., Molesworth, C. & Happé, F., 2012. Diminished social motivation negatively impacts reputation management: autism spectrum disorders as a case in point. *PloS one*, 7(1).
- Di Chiara, G. & Bassareo, V., 2007. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn’t do. *Current opinion in pharmacology*, 7(1).
- Chudasama, Y. & Robbins, T W, 2006. Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biological psychology*, 73(1).

- Chugani, H.T., Phelps, M.E. & Mazziotta, J.C., 1987. Positron emission tomography study of human brain functional development. *Annals of neurology*, 22(4).
- Clarke, H.F. et al., 2004. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5672).
- Condé, F. et al., 1995. Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *The Journal of comparative neurology*, 352(4).
- Corbit, L.H. & Balleine, B.W., 2011. The general and outcome-specific forms of Pavlovian-instrumental transfer are differentially mediated by the nucleus accumbens core and shell. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(33).
- Coricelli, G., Dolan, R.J. & Sirigu, A., 2007. Brain, emotion and decision making: the paradigmatic example of regret. *Trends in cognitive sciences*, 11(6).
- Cosmides, L. & Tooby, J., 2005. Neurocognitive adaptations designed for social exchange. In D. M. Buss, ed. *Evolutionary Psychology Handbook*.
- Cousins, M.S. et al., 1996. Nucleus accumbens dopamine depletions alter relative response allocation in a T-maze cost/benefit task. *Behavioural brain research*, 74(1-2).
- Crawley, J.N., 2007. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 17(4).
- Crawley, J.N., 2000. *What's wrong with my mouse?* Wiley-Liss. Wiley-Liss, ed.,
- Cressant, A. & Granon, S., 2003. Definition of a new maze paradigm for the study of spatial behavior in rats. *Brain Research Protocols*, 12(2).
- Crowder, W.F. & Hutto, C.W., 1992. Operant place conditioning measures examined using two nondrug reinforcers. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 41(4).
- DSM-IV, 1994. *American Psychiatric Association, Committee on Nomenclature and Statistics: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn.* American P. A. P. Press, ed.,
- Dahlström, A. & Fuxe, K., 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7).
- Dalley, Jeffrey W, Cardinal, R.N. & Robbins, Trevor W, 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 28(7).
- Damasio, A.R., 1994. Descartes' error and the future of human life. *Scientific American*, 271(4).
- Damasio, H. et al., 1994. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*, 264(5162).
- Daw, N.D. & Doya, K., 2006. The computational neurobiology of learning and reward. *Current opinion in neurobiology*, 16(2).
- Van De Werd, H.J.J.M. et al., 2010. Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain structure & function*, 214(4).

- Defensor, E.B. et al., 2011. A novel social proximity test suggests patterns of social avoidance and gaze aversion-like behavior in BTBR T+ tf/J mice. *Behavioural brain research*, 217(2).
- Dehaene, S. & Changeux, J P, 2000. Reward-dependent learning in neuronal networks for planning and decision making. *Progress in brain research*, 126.
- Delatour, B. & Gisquet-Verrier, P, 2000. Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural brain research*, 109(1).
- Dias, R., Robbins, T W & Roberts, A.C., 1996. Dissociation in PFC of affective and attentional shifts. *Nature*, 7(380).
- Dorais Pagé, D. & Dumas, C., 2009. Decision making and visibility in cats (*Felis catus*) in a progressive elimination task. *Animal cognition*, 12(5).
- Doupe, a J. & Kuhl, P.K., 1999. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annual review of neuroscience*, 22.
- Doya, K., 2008. Modulators of decision making. *Nature neuroscience*, 11(4).
- Dreher, J.-C., 2007. Sensitivity of the brain to loss aversion during risky gambles. *Trends in cognitive sciences*, 11(7).
- Dunn, B.D., Dalgleish, T. & Lawrence, A.D., 2006. The somatic marker hypothesis: a critical evaluation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 30(2).
- Dvorkin, A., Benjamini, Y. & Golani, I., 2008. Mouse cognition-related behavior in the open-field: emergence of places of attraction. *PLoS computational biology*, 4(2).
- D'Amato, F.R. et al., 2005. Pups call, mothers rush: does maternal responsiveness affect the amount of ultrasonic vocalizations in mouse pups? *Behavior genetics*, 35(1).
- Ebensperger, L.A., Hurtado, M.J. & Ramos-Jiliberto, R., 2006. Vigilance and collective detection of predator in degus (*Octodon degus*). *Ethology*, 112.
- Ehret, G., 2005. Infant rodent ultrasounds -- a gate to the understanding of sound communication. *Behavior genetics*, 35(1).
- El-Khodor, B.F. et al., 2004. Juvenile 5HT(1B) receptor knockout mice exhibit reduced pharmacological sensitivity to 5HT(1A) receptor activation. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 22(5-6).
- Enard, W. et al., 2009. A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell*, 137(5).
- Engemann, D. a et al., 2012. Games people play-toward an enactive view of cooperation in social neuroscience. *Frontiers in human neuroscience*, 6(June).
- Ernst, M. et al., 2003. Neural substrates of decision making in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *The American journal of psychiatry*, 160(6).
- Ernst, M. & Paulus, M.P., 2005. Neurobiology of decision making: a selective review from a neurocognitive and clinical perspective. *Biological psychiatry*, 58(8).

- Esposito, a et al., 1999. Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. *Neuroreport*, 10(4).
- Everitt, B.J. & Robbins, T W, 1997. Central cholinergic system and cognition.
- Everitt, B.J. & Robbins, T W, 2005. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, 8(11).
- Ey, E., Leblond, C I S & Bourgeron, T., 2011. Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*, 4(1).
- Falk, J.L., 1958. The grooming behavior of the chimpanzee as a reinforcer. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 1(1).
- Farovik, A. et al., 2008. Medial prefrontal cortex supports recollection, but not familiarity, in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(50).
- Faure, A. et al., 2008. Mesolimbic dopamine in desire and dread: enabling motivation to be generated by localized glutamate disruptions in nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(28).
- Faure, A., Richard, J.M. & Berridge, K.C., 2010. Desire and dread from the nucleus accumbens: cortical glutamate and subcortical GABA differentially generate motivation and hedonic impact in the rat. *PloS one*, 5(6).
- Fellows, L.K., 2004. The cognitive neuroscience of human decision making: a review and conceptual framework. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews*, 3(3).
- Fendt, M., Schwienbacher, I. & Schnitzler, H.-U., 2006. Carbachol injections into the nucleus accumbens induce 50 kHz calls in rats. *Neuroscience letters*, 401(1-2).
- Ferguson, J.N., Young, Larry J & Insel, Thomas R, 2002. The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in neuroendocrinology*, 23(2).
- Floresco, S B & Ghods-Sharifi, S., 2007. Amygdala-prefrontal cortical circuitry regulates effort-based decision making. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 17(2).
- Floresco, S B & Jentsch, J.D., 2011. Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 36(1).
- Floresco, Stan B, Block, A.E. & Tse, M.T.L., 2008. Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behavioural brain research*, 190(1).
- Floresco, Stan B & Magyar, O., 2006. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology*, 188(4).
- Francescoli, G., 2000. Sensory capabilities and communication in subterranean rodents. In E. A. Lacey, J. . Patton, & G. . Cameron, eds. *Life Underground. The biology of subterranean rodents*. pp. 111-144.
- Fride, E. et al., 2005. Differential response to acute and repeated stress in cannabinoid CB1 receptor knockout newborn and adult mice. *Behavioural pharmacology*, 16(5-6).

- Von Frijtag, J.C. et al., 2002. Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Developmental psychobiology*, 41(1).
- Fuster, J., 1997. *The prefrontal cortex, anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe* Lippincott.,
- Fuster, J., 2001. The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2).
- Gabbott, P.L. a et al., 2005. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of comparative neurology*, 492(2).
- Galef, B.G., Wigmore, S.W. & Kennett, D.J., 1983. A failure to find socially mediated taste aversion learning in Norway rats (*R. norvegicus*). *Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 97(4).
- Gaspar, P., Bloch, B. & Le Moine, C., 1995. D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. *The European journal of neuroscience*, 7(5).
- Gibson, R.M. & Langen, T. a, 1996. How do animals choose their mates? *Trends in ecology & evolution*, 11(11).
- Gil-da-Costa, R. et al., 2004. Toward an evolutionary perspective on conceptual representation: species-specific calls activate visual and affective processing systems in the macaque. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50).
- Gillberg, C., 2010. The ESSENCE in child psychiatry: Early Symptomatic Syndromes Eliciting Neurodevelopmental Clinical Examinations. *Research in developmental disabilities*, 31(6).
- Gleichgerrcht, E. et al., 2010. Decision-making cognition in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neurology*, 6(11).
- Glickman, S.E. & Schiff, B.B., 1967. A biological theory of reinforcement. *Psychological review*, 74(2).
- Goldman-Rakic, P.S., 1996. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24).
- Goldman-Rakic, P.S., Muly, E.C. & Williams, G.V., 2000. D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain research. Brain research reviews*, 31(2-3).
- Gorelova, N. & Yang, C.R., 1997. The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 76(3).
- Gotti, C, Zoli, M. & Clementi, F., 2006. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in pharmacological sciences*, 27(9).
- Gourévitch, B. et al., 2009. Follow-up of latency and threshold shifts of auditory brainstem responses after single and interrupted acoustic trauma in guinea pig. *Brain research*, 1304.
- Granon, S. et al., 1996. Effortful information processing in a spontaneous spatial situation by rats with medial prefrontal lesions. *Behav. Brain Res.*, 78.

- Granon, S. et al., 2000. Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(3).
- Granon, S. et al., 1995. Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology*, 119(2).
- Granon, S. et al., 1994. Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. *Behavioral neuroscience*, 108(5).
- Granon, S. & Changeux, J-P, 2011. Deciding between conflicting motivations: What mice make of their prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*.
- Granon, S., Faure, P & Changeux, J., 2003. Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16).
- Granon, S. & Floresco, S B, 2009. Functional neuroanatomy of flexible behaviors in mice and rats. In S. Granon, ed. *Endophenotypes of psychiatric and neurodegenerative disorders in rodent models*. pp. 83–103.
- Granon, S. & Poucet, B., 1995. Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behavioral neuroscience*, 109(3).
- Grant, D.A. & Berg, E.A., 1948. A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in a Weigl-type card-sorting problem. *Journal of experimental psychology*, 38(4).
- Graybiel, A.M., 2008. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual review of neuroscience*, 31.
- Greengard, P., 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5544).
- Grigsby, J. & Stevens, D., 2002. Memory, neurodynamics, and human relationships. *Psychiatry*, 65(1).
- Grimsley, J.M.S., Monaghan, J.J.M. & Wenstrup, J.J., 2011. Development of social vocalizations in mice. *PloS one*, 6(3).
- Guillem, K. et al., 2011. Nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunits in the medial prefrontal cortex control attention. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6044).
- Haber, S.N., 2003. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26(4).
- Haber, S.N. & Knutson, B., 2010. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1).
- Haber, S.N., Kunishio, K. & Mizobuchi, M., 1995. The Orbital and Medial Prefrontal Basal Ganglia Circuit Through the Primate. , 75(July).
- Hahn, M.E. & Lavooy, M.J., 2005. A review of the methods of studies on infant ultrasound production and maternal retrieval in small rodents. *Behavior genetics*, 35(1).
- Hamilton, S.M. et al., 2011. Multiple autism-like behaviors in a novel transgenic mouse model. *Behavioural brain research*, 218(1).

- Hammerschmidt, K. et al., 2009. Female mice respond to male ultrasonic “songs” with approach behaviour. *Biology letters*, 5(5).
- Hara, E. et al., 2007. Role of the midbrain dopaminergic system in modulation of vocal brain activation by social context. *The European journal of neuroscience*, 25(11).
- Hare, B. et al., 2007. Tolerance allows bonobos to outperform chimpanzees on a cooperative task. *Current biology: CB*, 17(7).
- Harlow, H. & Zimmermann, R., 1959. Affectional responses in the infant monkey. *Science*, 130(3373).
- Hauber, W. & Sommer, S., 2009. Prefrontostriatal circuitry regulates effort-related decision making. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 19(10).
- Hegoburu, C. et al., 2011. The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5(May), p.25.
- Heidbreder, C. a & Groenewegen, Henk J, 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(6).
- Hellems, K.G.C., Bengel, L.C. & Olmstead, M.C., 2004. Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain research. Developmental brain research*, 150(2).
- Hemsworth, P. et al., 2011. The choice behaviour of pigs in a Y maze: effects of deprivation of feed, social contact and bedding. *Behavioural processes*, 87(2).
- Herrera, D.G. & Robertson, H.A., 1996. Activation of c-fos in the brain. *Progress in neurobiology*, 50.
- Hoffman, B.J. et al., 1998. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Frontiers in neuroendocrinology*, 19(3).
- Hoffmann, F., Musolf, K. & Penn, D.J., 2009. Freezing urine reduces its efficacy for eliciting ultrasonic vocalizations from male mice. *Physiology & behavior*, 96(4-5).
- Hoffmann, F., Musolf, K. & Penn, D.J., 2012. Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice. *Physiology & behavior*, 105(3).
- Hoffmann, F., Musolf, K. & Penn, D.J., 2011. Ultrasonic courtship vocalizations in wild house mice: spectrographic analyses. *Journal of Ethology*, 30(1).
- Holloway, W.R. & Thor, D.H., 1985. Interactive effects of caffeine, 2-chloroadenosine and haloperidol on activity, social investigation and play fighting of juvenile rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 22(3).
- Holmes, A., Murphy, D.L. & Crawley, J.N., 2002. Reduced aggression in mice lacking the serotonin transporter. *Psychopharmacology*, 161(2).
- Holson, R., 1986. Medial prefrontal cortical lesions and timidity in rats. III. behavior in a semi-natural environment. *Physiology & behavior*, pp.239-247.
- Holy, T.E. & Guo, Z., 2005. Ultrasonic songs of male mice. *PLoS biology*, 3(12).

- House, A., Rowe, D. & Standen, P.J., 1987. Affective prosody in the reading voice of stroke patients. , (December 1986).
- Howe, W.M. et al., 2010. Enhancement of attentional performance by selective stimulation of alpha4beta2(*) nAChRs: underlying cholinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(6).
- Hsu, M. et al., 2005. Neural systems responding to degrees of uncertainty in human decision-making. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5754).
- Huettel, S. a et al., 2006. Neural signatures of economic preferences for risk and ambiguity. *Neuron*, 49(5).
- Hughes, B.O., 1976. Preference decisions of domestic hens for wire or litter floors. *Applied Animal Ethology*, 2(2).
- Hurd, Y.L., Suzuki, M. & Sedvall, G.C., 2001. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, 22(1-2).
- Huttenlocher, P.R., 1990. Morphometric study of human cerebral cortex development. , 28(6).
- Huttenlocher, P.R. & Dabholkar, A.S., 1997. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology*, 387(2).
- Jamain, S. et al., 2008. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5).
- Jordan, E.G., 2006. Mice, Pain, and empathy. *Science*, 314(6).
- Jürgens, U., 2002. Neural pathways underlying vocal control. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26(2).
- Jürgens, U., 2009. The neural control of vocalization in mammals: a review. *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, 23(1).
- Jürgens, U., 1994. The role of the periaqueductal grey in vocal behaviour. *Behavioural brain research*, 62(2).
- Kalcounis-Rueppell, M.C. et al., 2010. Differences in ultrasonic vocalizations between wild and laboratory California mice (*Peromyscus californicus*). *PloS one*, 5(4).
- Kalivas, P.W., D, P. & Volkow, N.D., 2005. Reviews and Overviews The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, (August).
- Kelley, A.E. & Berridge, K.C., 2002. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9).
- Kenrick, D.. et al., 2010. Renovating the Pyramid of Needs: Contemporary Extensions Built Upon Ancient Foundations. *Perspect Psychol Sci.*, 5(3).
- Kikusui, T. et al., 2011. Cross fostering experiments suggest that mice songs are innate. *PloS one*, 6(3).

- Killcross, S. & Coutureau, E., 2003. Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 13(4).
- Kim, J. & Ragozzino, M.E., 2005. The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiology of learning and memory*, 83(2).
- Kimura, H. et al., 1980. Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science (New York, N.Y.)*, 208(4447).
- Kimura, H. et al., 1981. The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *The Journal of comparative neurology*, 200(2).
- Kimura, H., Mc Geer, P.L. & Peng, J.-H., 1984. Choline acetyltransferase-containing neurons in the rat brain. In *Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS - Part II*. pp. 51-67.
- Klink, R. et al., 2001. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(5).
- Knutson, B., Burgdorf, J. & Panksepp, J., 2002. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological bulletin*, 128(6).
- Ko, S.W., Chatila, T. & Zhuo, M., 2005. Contribution of CaMKIV to injury and fear-induced ultrasonic vocalizations in adult mice. *Molecular pain*, 1.
- Kobelt, P. et al., 2004. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain research. Brain research protocols*, 13(1).
- Kohut, S.J. et al., 2009. The impact of early environmental rearing condition on the discriminative stimulus effects and Fos expression induced by cocaine in adult male and female rats. *Psychopharmacology*, 203(2).
- Koike, H. et al., 2009. Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behavioural brain research*, 202(1).
- Kouneiher, F., Charron, S. & Koehlin, E., 2009. Motivation and cognitive control in the human prefrontal cortex. *Nature neuroscience*, 12(7).
- Kovács, K.J., 2008. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6).
- Krach, S. et al., 2010. The rewarding nature of social interactions. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4(May).
- Kramer, D. & McLaughlin, R., 2001. The behavioral ecology of intermittent locomotion. *Am Zool*, 41.
- Krawczyk, D.C., 2002. *Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making*.
- Kringelbach, M.L. & Berridge, K.C., 2008. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology*, 199(3).
- Krohn, T.C. et al., 2006. The effects of individual housing on mice and rats: a review. *Animal Welfare*, 15(4).

- Kuleskaya, N., Rauvala, H. & Voikar, V., 2011. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. *PloS one*, 6(9).
- Labudda, K. et al., 2010. Decision making under risk condition in patients with Parkinson's disease: a behavioural and fMRI study. *Behavioural neurology*, 23(3).
- Lahvis, G P, Alleva, E. & Scattoni, M.L., 2010. Translating mouse vocalizations: prosody and frequency modulation. *Genes, brain, and behavior*.
- Landry, Y. & Gies, J.-P., 2009. *Pharmacologie: des cibles vers l'indication thérapeutoques* Dunod, 2em.,
- Langford, D.J. et al., 2006. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5782).
- Laplante, F., Srivastava, L.K. & Quirion, R., 2004. Alterations in dopaminergic modulation of prefrontal cortical acetylcholine release in post-pubertal rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *Journal of neurochemistry*, 89(2), pp.314–23.
- Laviola, G & Terranova, M.L., 1998. The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice: the role of social experiences in the family unit. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 23(2).
- Lester, D.B., Rogers, T.D. & Blaha, C.D., 2010. Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS neuroscience & therapeutics*, 16(3).
- Li, Z. et al., 2001. Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in Morris water maze: possible involvement of cholinergic system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 68(3).
- Linnet, J. et al., 2006. Episodic chasing in pathological gamblers using the Iowa gambling task. *Scandinavian journal of psychology*, 47(1).
- Linnman, C. et al., 2012. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *NeuroImage*, 60(1).
- Litvin, Y., Blanchard, D C & Blanchard, R J, 2007. Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural brain research*, 182(2).
- Livingstone, P.D. et al., 2009. Alpha7 and Non-Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Modulate Dopamine Release in Vitro and in Vivo in the Rat Prefrontal Cortex. *The European journal of neuroscience*, 29(3).
- Livingstone, P.D. & Wonnacott, S., 2009. Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways. *Biochemical pharmacology*, 78(7).
- Lorenz, K. & Leyhausen, P., 1973. *Motivation of human and animal behavior: an ethological view /*, Van Nostrand Reinhold Co.
- Lucas-Meunier, E. et al., 2009. Involvement of nicotinic and muscarinic receptors in the endogenous cholinergic modulation of the balance between excitation and inhibition in the young rat visual cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 19(10).
- Mai, B., Sommer, S. & Hauber, W., 2012. Motivational states influence effort-based decision making in rats: the role of dopamine in the nucleus accumbens. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience*, 12(1).

- Mameli-Engvall, M. et al., 2006. Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron*, 50(6).
- Mansvelder, H.D. et al., 2006. Nicotinic modulation of neuronal networks: from receptors to cognition. *Psychopharmacology*, 184(3-4).
- Mansvelder, H.D., Mertz, M. & Role, L.W., 2009. Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Seminars in cell & developmental biology*, 20(4).
- Marco, E.M. et al., 2011. Social encounter with a novel partner in adolescent rats: activation of the central endocannabinoid system. *Behavioural brain research*, 220(1).
- Martin, A. & Weisberg, J., 2006. Neural Foundations For understanding social and mechanical concepts. *Cogn Neuropsychol.*, 20.
- Marubio, L.M. et al., 1999. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature*, 398(6730).
- Maskos, U et al., 2005. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436(7047).
- Maskos, Uwe, 2010. Role of endogenous acetylcholine in the control of the dopaminergic system via nicotinic receptors. *Journal of neurochemistry*, 114(3).
- Maslow, A., 1943. A theory of human motivation. *psychological Review*, 50.
- Mason, G., M, D. & Garner, J., 1998. A demanding task: using economic techniques to assess animal priorities. *Animal behaviour*, 55(4).
- Mason, W.A., Hollis, J.H. & Sharpe, L.G., 1962. Differential responses of chimpanzees to social stimulation. *J of Comp. and Physio Psychology*, 55(6).
- Mason, W.A., Saxon, S.V. & Sharpe, L.G., 1963. Chimpanze social reward. *The Psychological Record*, 13.
- Matsuo, A., Ikematsu, K. & Nakasono, I., 2009. C-fos, fos-B, c-jun and dusp-1 expression in the mouse heart after single and repeated methamphetamine administration. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 11(6).
- Matthews, L.R. & Ladewig, J., 1994. Environmental requirements of pigs measured by behavioural demand functions. *Animal behaviour*, 47.
- Maubourguet, N. et al., 2008. Behavioral sequence analysis reveals a novel role for beta2* nicotinic receptors in exploration. *PLoS computational biology*, 4(11).
- Mc Gregor, P. & Dabelsteen, T., 1996. Communication Networks. In D. Kroodsma & E. Miller, eds. *Ecology and evolution of Acoustic Communication in birds*.
- McClure, S.M. et al., 2004. Separate neural systems value immediate and delayed monetary rewards. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5695).
- McKinney, W.T. & Bunney, W.E., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Archives of general psychiatry*, 21(2).

- Menuet, C. et al., 2011. Age-Related Impairment of Ultrasonic Vocalization in Tau.P301L Mice: Possible Implication for Progressive Language Disorders. *PLoS one*, 6(10).
- Mesulam, M.M. et al., 1983. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, 10(4).
- Meyer, J. & Guillot, A., 2007. Biologically-inspired robots. In *Handbook of robotics*. pp. 1-38.
- Millar, N.S. & Gotti, Cecilia, 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56(1).
- Mogensen, J. et al., 2004. Place learning and object recognition by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain research bulletin*, 63(3).
- Le Moine, C. & Gaspar, P., 1998. Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Brain research. Molecular brain research*, 58(1-2).
- Moles, A. et al., 2007. Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability? *Behavioural brain research*, 182(2).
- Moles, A., Kieffer, B.L. & D'Amato, F.R., 2004. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5679).
- Moroni, M. et al., 2006. alpha4beta2 Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine. , 70(2).
- Morton, E.S., 1977. On the occurrence and significance of motivation-structural rules in some bird and mammal sounds. *Am. Nat.*, 111.
- Moy, S S, Nadler, J J & Perez, A., 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains : an approach to assess autistic-like behavior in mice.
- Moy, Sheryl S et al., 2006. Mouse Models of Autism Spectrum Disorders : The Challenge for Behavioral Genetics. *Autism*, 51(7146).
- Mulder, M.B., 1990. Kipsigis women's preferences for wealthy men: evidence for female choice in mammals? *Behavioral ecology and sociobiology*, 27(4).
- Musolf, K., Hoffmann, F. & Penn, D.J., 2010. Ultrasonic courtship vocalizations in wild house mice, *Mus musculus musculus*. *Animal Behaviour*, 79(3).
- Nadler, J J et al., 2004. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes, brain, and behavior*, 3(5).
- Neer, E.J., 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80(2).
- Niesink, R.J. & Van Ree, J.M., 1989. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology*, 28(8).
- Noirot, E., 1972. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental psychobiology*, 5(4).
- Normansell, L. & Panksepp, J, 1990. Effects of morphine and naloxone on play-rewarded spatial discrimination in juvenile rats. *Developmental psychobiology*, 23(1).

- Le Novère, N., Corringer, P.-J. & Changeux, J-P, 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *Journal of neurobiology*, 53(4).
- Nunez, A.A. et al., 1985. Effects of laryngeal denervation on ultrasound production and male sexual behavior in rodents. *Physiology & behavior*, 34(6).
- Oades, R.D. & Halliday, G.M., 1987. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain research*, 434(2).
- Olds, J. & Milner, P., 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology*, 47(6).
- Olds, M.E. & Fobes, J.L., 1981. The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies. *Annual review of psychology*, 32.
- Olivo-Marin, J.-C., 2002. Extraction of spots in biological images using multi scale products. *Pattern recognition*, 35(9).
- Olsson, I.S. & Dahlborn, K., 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Laboratory animals*, 36(3).
- Ongür, D. & Price, J.L., 2000. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(3).
- Oualian, C. & Gisquet-Verrier, Pascale, 2010. The differential involvement of the prelimbic and infralimbic cortices in response conflict affects behavioral flexibility in rats trained in a new automated strategy-switching task. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(12).
- Overall, K.L., 2000. Natural animal models of human psychiatric conditions: assessment of mechanism and validity. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 24(5).
- O'Connell, L. a & Hofmann, H. a, 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *The Journal of comparative neurology*, 519(18).
- O'Connell, L. a. & Hofmann, H. a., 2012. Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science*, 336(6085).
- Pais-Vieira, M., Lima, D. & Galhardo, V, 2007. Orbitofrontal cortex lesions disrupt risk assessment in a novel serial decision-making task for rats. *Neuroscience*, 145(1).
- Pan, W.X., Mao, T. & Dudman, J.T., 2010. Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. *Frontiers in neuroanatomy*, 4(December).
- Panksepp, J, 2007. Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: Modeling primal human laughter in laboratory rats. *Behavioural Brain Research*, 182.
- Panksepp, J, 2009. emotional causes and consequences of social affective vocalization. In S. M. Brudzynski, ed. *Handbook of mammalian vocalization - an integrative neuroscience approach*. pp. 201-208.
- Panksepp, J B et al., 2007. Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. *PloS one*, 2(4).

- Panksepp, J B & Lahvis, G P, 2007. Social reward among juvenile mice. *Genes, brain, and behavior*, 6(7).
- Panksepp, J & Burgdorf, J., 2000. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behavioural brain research*, 115(1).
- Panksepp, J., Siviy, S. & Normansell, L., 1984. The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 8(4).
- Panksepp, Jules B et al., 2007. Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. *PloS one*, 2(4).
- Paus, T. et al., 1993. Role of the human anterior cingulate cortex in the control of oculomotor, manual, and speech responses: a positron emission tomography study. *Journal of neurophysiology*, 70(2).
- Paus, T. et al., 1999. Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5409).
- Pavlov, I., 1927. Conditioned reflexes. *London: Oxford University Press*.
- Paxinos, G. & Franklin, K.B.J., 2001. *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*,
- Petkov, C.I. & Jarvis, E.D., 2012. Birds, primates, and spoken language origins: behavioral phenotypes and neurobiological substrates. *Frontiers in evolutionary neuroscience*, 4(August).
- Petrides, M. & Pandya, D.N., 2001. Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque ventrolateral prefrontal cortex and corticocortical connection patterns in the monkey.
- Phillips, P.E.M., Walton, Mark E & Jhou, T.C., 2007. Calculating utility: preclinical evidence for cost-benefit analysis by mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology*, 191(3).
- Picard, N. & Strick, P.L., 1996. Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 6(3).
- Picciotto, M.R. et al., 1995. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*, 374(6517).
- Picciotto, M.R. et al., 1998. Acetylcholine receptors containing the $\alpha 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391(January).
- Ploog, D., 1988. An outline of human neuroethology. *Human neurobiology*, 6(4).
- Pochon, J.-B. et al., 2008. Functional imaging of decision conflict. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(13).
- Poletti, M., Cavedini, P & Bonuccelli, U., 2011. Iowa gambling task in Parkinson's disease. *Journal of clinical and experimental neuropsychology*, 33(4).
- Porter, J.T. et al., 1999. Selective excitation of subtypes of neocortical interneurons by nicotinic receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(13).
- Portfors, C.V., 2007. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 46(1).

- Preston, S.D. et al., 2007. Effects of anticipatory stress on decision making in a gambling task. *Behavioral neuroscience*, 121(2).
- Preuss, T.M. & Goldman-Rakic, P.S., 1989. Connections of the ventral granular frontal cortex of macaques with perisylvian premotor and somatosensory areas: anatomical evidence for somatic representation in primate frontal association cortex. *The Journal of comparative neurology*, 282(2).
- Ragozzino, M., Detrick, S. & Kesner, R.P., 1999. Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(11).
- Rangel, A., Camerer, C. & Montague, P Read, 2008. A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(7).
- Ratiu, P. et al., 2004. The tale of Phineas Gage, digitally remastered. *Journal of neurotrauma*, 21(5).
- Ray, J.P. & Price, J.L., 1993. The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *The Journal of comparative neurology*, 337(1).
- Reuchlin, M., 1981. *Psychologie PUF fondam.*
- Rich, E.L. & Shapiro, M., 2009. Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(22).
- Ridderinkhof, K.R. et al., 2004. Neurocognitive mechanisms of cognitive control: the role of prefrontal cortex in action selection, response inhibition, performance monitoring, and reward-based learning. *Brain and cognition*, 56(2).
- Rivalan, M et al., 2011. Inter-individual decision-making differences in the effects of cingulate, orbitofrontal, and prelimbic cortex lesions in a rat gambling task. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5(April).
- Rivalan, M, Ahmed, S.H. & Dellu-Hagedorn, F, 2009. Risk-prone individuals prefer the wrong options on a rat version of the Iowa Gambling Task. *Biological psychiatry*, 66(8).
- Rivalan, M., 2009. *Modélisation de la prise de décision adaptée et inadaptée chez le rat et caractérisation psychobiologique des différences inter-individuelles*. Thèse à l'Université de Bordeaux 2.
- Robert, G., 1996. Why individuals vigilance declines as group size increase. *Animal behaviour*, 51.
- Roberts, A.C., 2006. Primate orbitofrontal cortex and adaptive behaviour. *Trends in cognitive sciences*, 10(2).
- Roberts, A.C., Robbins, T W & Everitt, B.J., 1988. The effects of intradimensional and extradimensional shifts on visual discrimination learning in humans and non-human primates. *Q J Exp Psychol B.*, 40(4).
- Roberts, L.H., 1975. The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics*, 13(2).
- Robinson, T.E. & Berridge, K.C., 2008. Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507).

- Rode, C. et al., 1999. When and why do people avoid unknown probabilities in decisions under uncertainty? Testing some predictions from optimal foraging theory. *Cognition*, 72(3).
- Roesch, M.R. & Olson, C.R., 2004. Neuronal activity related to reward value and motivation in primate frontal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5668).
- Rose, J.E. & Woolsey, C.N., 1948. Structure and relations of limbic cortex and anterior thalamic nuclei in rabbit and cat. *The Journal of comparative neurology*, 89(3).
- Ross, R.S., McGaughy, J. & Eichenbaum, Howard, 2005. Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(3).
- Rossi, F.M. et al., 2001. Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11).
- Rudebeck, P H et al., 2006. A role for the macaque anterior cingulate gyrus in social valuation. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5791).
- Rudebeck, P H et al., 2007. Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *The European journal of neuroscience*, 26(8).
- Rudebeck, Peter H et al., 2006. Separate neural pathways process different decision costs. *Nature neuroscience*, 9(9).
- Rushworth, M F S et al., 2004. Action sets and decisions in the medial frontal cortex. *Trends in cognitive sciences*, 8(9).
- Rushworth, M F S et al., 2007. Contrasting roles for cingulate and orbitofrontal cortex in decisions and social behaviour. *Trends in cognitive sciences*, 11(4).
- Rutte, C. & Taborsky, M, 2007. Generalized reciprocity in rats. *PLoS biology*, 5(7).
- Sadananda, M., Wöhr, M. & Schwarting, R K W, 2008. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience letters*, 435(1).
- Sagara, H., Sendo, T. & Gomita, Y., 2010. Evaluation of motivational effects induced by intracranial self-stimulation behavior. *Acta medica Okayama*, 64(5).
- Salamone, J.D. et al., 2003. Nucleus Accumbens Dopamine and the Regulation of Effort in Food-Seeking Behavior: Implications for Studies of Natural Motivation , Psychiatry , and Drug Abuse. *Pharmacology*, 305(1).
- Salamone, J.D., Cousins, M.S. & Bucher, S., 1994. Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behavioural brain research*, 65(2).
- Santana, N., Mengod, G. & Artigas, F., 2009. Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 19(4).
- Dos Santos Coura, R. & Granon, S., 2012. Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology*.

- Sarter, M & Bruno, J.P., 1997. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain research. Brain research reviews*, 23(1-2).
- Saudou, F. et al., 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5180).
- Scattoni, M.L., McFarlane, H.G., et al., 2008. Reduced Ultrasonic vocalizations in vasopressin 1b Knockout Mice. , 187(2).
- Scattoni, M.L., Gandhi, S.U., et al., 2008. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PloS one*, 3(8).
- Scattoni, M.L., Ricceri, L & Crawley, J.N., 2010. Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+tf/J mice during three types of social encounters. *Genes, brain, and behavior*.
- Schehka, S., Esser, K.-H. & Zimmermann, E., 2007. Acoustical expression of arousal in conflict situations in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 193(8).
- Scherer, K.R., 2003. Vocal communication of emotion: a review of research paradigms. *Speech Communication*, 40.
- Scherer, K.R. & Zei, B., 1988. Vocal indicators of affective disorders. *Psychotherapy and psychosomatics*, 49(3-4).
- Schliebs, R. & Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 113(11).
- Schmeisser, M.J. et al., 2012. Autistic-like behaviours and hyperactivity in mice lacking ProSAP1/Shank2. *Nature*.
- Schneeberger, K., Dietz, M. & Taborsky, Michael, 2012. Reciprocal cooperation between unrelated rats depends on cost to donor and benefit to recipient. *BMC evolutionary biology*, 12(1).
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A. & Gallagher, M., 2000. Changes in Functional Connectivity in Orbitofrontal Cortex and Basolateral Amygdala during Learning and Reversal Training. , 20(13).
- Schoenbaum, G., Roesch, M.R. & Stalnaker, T. a, 2006. Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends in neurosciences*, 29(2).
- Schrijver, N.C. a et al., 2004. Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural brain research*, 152(2).
- Schultz, W., 2006. Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annual review of psychology*, 57.
- Schultz, W., 2002. Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36(2).
- Schultz, W., 1998. Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*.
- Schultz, W., 2012. Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*.

- Schultz, W., Dayan, P. & Montague, P R, 1997. A neural substrate of prediction and reward. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306).
- Schulz, G.M. et al., 2005. Functional neuroanatomy of human vocalization: an H215O PET study. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 15(12).
- Schwarting, R K W, Jegan, N. & Wöhr, M., 2007. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behavioural brain research*, 182(2).
- Schweimer, J. & Hauber, W., 2006. Dopamine D1 receptors in the anterior cingulate cortex regulate effort-based decision making. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(6).
- Schweimer, J. & Hauber, W., 2005a. Involvement of the rat anterior cingulate cortex in control of instrumental responses guided by reward expectancy. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(3).
- Schweimer, J. & Hauber, W., 2005b. Involvement of the rat anterior cingulate cortex in control of instrumental responses guided by reward expectancy. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 12(3).
- Schweimer, J., Saft, S. & Hauber, W., 2005. Involvement of catecholamine neurotransmission in the rat anterior cingulate in effort-related decision making. *Behavioral neuroscience*, 119(6).
- Seamans, J K et al., 2001. Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(10).
- Seamans, Jeremy K, Lapish, C.C. & Durstewitz, Daniel, 2008. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotoxicity research*, 14(2-3).
- Selemon, L.D. & Goldman-Rakic, P.S., 1988. Common cortical and subcortical targets of the dorsolateral prefrontal and posterior parietal cortices in the rhesus monkey: evidence for a distributed neural network subserving spatially guided behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(11).
- Serreau, P. et al., 2011. Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations. *Behavioural brain research*, 225(1).
- Sesack, S.R. et al., 2003. Anatomical substrates for Glutamate-Dopamine Interactions. *Ann N Y Acad Sci*, 1003.
- Sescousse, G., Redouté, J. & Dreher, J.-C., 2010. The architecture of reward value coding in the human orbitofrontal cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(39).
- Shiflett, M.W. & Balleine, B.W., 2011. At the limbic-motor interface: Disconnection of basolateral amygdala from nucleus accumbens core and shell reveals dissociable components of incentive motivation. *Eur J Neurosci*, 32(10).
- Shizgal, P., 1997. Neural basis of utility estimation. *Current opinion in neurobiology*, 7(2).
- Shoaib, M et al., 2002. The role of nicotinic receptor beta-2 subunits in nicotine discrimination and conditioned taste aversion. *Neuropharmacology*, 42(4).

- Shu, W. et al., 2005. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27).
- Silva, C.F. et al., 2011. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. *Behavioural brain research*, 225(1).
- Silverman, J.L. et al., 2010. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(7).
- Siviy, S.M. & Panksepp, Jaak, 2011. In search of the neurobiological substrates for social playfulness in mammalian brains. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(9).
- Smotherman, W.P. et al., 1974. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behavioral biology*, 12(1).
- Sowell, E.R. et al., 1999. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nature neuroscience*, 2(10).
- Spinka, M., Newberry, R.C. & Bekoff, M., 2001. Mammalian play: training for the unexpected. *The Quarterly review of biology*, 76(2).
- Stephens, D., McLinn, C.M. & Stevens, J.R., 2006. Effects of temporal clumping and payoff accumulation on impulsiveness and cooperation. *Behavioural processes*, 71(1).
- Stephens, D.W., 2002. Discounting and Reciprocity in an Iterated Prisoner's Dilemma. *Science*, 298(5601).
- Sugimoto, H. et al., 2011. A role for strain differences in waveforms of ultrasonic vocalizations during male-female interaction. *PloS one*, 6(7).
- Sul, J.H. et al., 2010. Distinct roles of rodent orbitofrontal and medial prefrontal cortex in decision making. *Neuron*, 66(3).
- Takahashi, N., Kashino, M. & Hironaka, N., 2010. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. *PloS one*, 5(11).
- Tanaka, S.C. et al., 2004. Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nature neuroscience*, 7(8).
- Tanji, J. & Hoshi, E., 2008. Role of the Lateral Prefrontal Cortex in Executive Behavioral Control. *Physiol Rev*, (140).
- Terranova, M.L., Cirulli, F. & Laviola, G., 1999. Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuroendocrinology*, 24(6).
- Thomas, L.B. et al., 2009. Establishing a new animal model for the study of laryngeal biology and disease: an anatomic study of the mouse larynx. *Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR*, 52(3).
- Thompson, B., Leonard, K.C. & Brudzynski, S.M., 2006. Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. *Behavioural brain research*, 168(1).

- Thomsen, M.S. et al., 2010. Distinct neural pathways mediate alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-dependent activation of the forebrain. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 20(9).
- Toates, F., 1986. *Motivational systems* F. . Toates, ed., Cambridge University Press.
- Tom, S.M. et al., 2007. The neural basis of loss aversion in decision-making under risk. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811).
- Trantham-Davidson, H. et al., 2004. Mechanisms underlying differential D1 versus D2 dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(47).
- Trezza, V., Damsteegt, R., et al., 2011. Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(17).
- Trezza, V., Baarendse, P.J.J. & Vanderschuren, L.J.M.J., 2010. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(10).
- Trezza, V., Campolongo, P. & Vanderschuren, L.J.M.J., 2011a. Developmental Cognitive Neuroscience Evaluating the rewarding nature of social interactions in laboratory animals. *Neuroscience*, 1.
- Trezza, V., Campolongo, P. & Vanderschuren, L.J.M.J., 2011b. Evaluating the rewarding nature of social interactions in laboratory animals. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 1(4).
- Tseng, K.Y. & O'Donnell, P., 2004. Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(22).
- Tsoory, M.M., Youdim, M.B. & Schuster, R., 2012. Social-cooperation differs from individual behavior in hypothalamic and striatal monoamine function: evidence from a laboratory rat model. *Behavioural brain research*, 232(1).
- Uylings, Harry B.M., Groenewegen, Henk J. & Kolb, Bryan, 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research*, 146(1-2).
- Valzelli, L., 1973. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia*, 31(4).
- Vanderschuren, L.J.M.J., Niesink, R.J. & Van Ree, J.M., 1997. The Neurobiology of Social Play Behavior in Rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(3).
- Verdejo-García, A. & Bechara, Antoine, 2009. A somatic marker theory of addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, pp.48–62.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, 51(1).
- Vertes, R.P., 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*, 142(1).
- Viana, D.S. et al., 2010. Cognitive and motivational requirements for the emergence of cooperation in a rat social game. *PloS one*, 5(1).
- de Visser, L. et al., 2011. Rodent versions of the iowa gambling task: opportunities and challenges for the understanding of decision-making. *Frontiers in neuroscience*, 5(October).

- Volkow, N.D. & Fowler, J.S., 2000. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 10(3).
- Voorn, P. et al., 2004. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *Trends in neurosciences*, 27(8).
- Võikar, V. et al., 2005. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes, brain, and behavior*, 4(4).
- Wallis, J.D., 2007. Orbitofrontal cortex and its contribution to decision-making. *Annual review of neuroscience*, 30.
- Walton, Mark E et al., 2003. Functional specialization within medial frontal cortex of the anterior cingulate for evaluating effort-related decisions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(16).
- Wang, F. et al., 2011. Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6056).
- Wang, H. et al., 2008. Ultrasonic vocalizations induced by sex and amphetamine in M2, M4, M5 muscarinic and D2 dopamine receptor knockout mice. *PloS one*, 3(4).
- Wang, S. et al., 2012. The role of risk aversion in non-conscious decision making. *Frontiers in psychology*, 3(February).
- Wei, X.Y. et al., 2007. Anxiolytic-like effects of oleamide in group-housed and socially isolated mice. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 31(6).
- Whishaw, I.Q. et al., 2001. Accelerated nervous system development contributes to behavioral efficiency in the laboratory mouse: a behavioral review and theoretical proposal. *Developmental psychobiology*, 39(3).
- Whishaw, I.Q. et al., 2006. The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behavioural brain research*, 171(2).
- White, N.R. et al., 1998. 40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus musculus*) during copulation. *Physiology & behavior*, 63(4).
- White, N.R., Cagiano, R., Moises, A.U., et al., 1990. Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of comparative psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 104(3).
- White, N.R., Cagiano, R. & Barfield, R.J., 1990. Receptivity of the female rat (*Rattus norvegicus*) after male devocalization: a ventral perspective. *Journal of comparative psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 104(2).
- Williams, W.O., Riskin, D.K. & Mott, A.K.M., 2008. Ultrasonic sound as an indicator of acute pain in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 47(1).
- Willott, J.F., 2006. Measurement of the auditory brainstem response (ABR) to study auditory sensitivity in mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, Chapter 8, p.Unit8.21B.
- Wilson, D.R. & Hare, J.F., 2004. Ground squirrel uses ultrasonic alarms. *Nature*, 430(6999).

- van Wimersma Greidanus, T.B. & Maigret, C., 1996. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain research*, 713(1-2).
- Winslow, J.T. et al., 2000. Infant vocalization, adult aggression, and fear behavior of an oxytocin null mutant mouse. *Hormones and behavior*, 37(2).
- Wintink, a J. & Brudzynski, S.M., 2001. The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 70(2-3).
- Wise, R.A., 1996. Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19.
- Wise, R.A., 2002. Brain Reward Circuitry : Insights from Unsensed Incentives The natural incentives that shape behavior reach the. *October*, 36.
- Wolf, N.J. & Butcher, L.L., 1986. Cholinergic systems in the rat brain: III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia, and basal forebrain. *Brain research bulletin*, 16(5).
- Wright, J.M., Gourdon, J.C. & Clarke, P.B.S., 2010. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 211(1).
- Wunderink, Y.S. et al., 2012. Food deprivation induces chronic stress and affects thyroid hormone metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 162(4).
- Wöhr, M. et al., 2008. Effects of genetic background, gender, and early environmental factors on isolation-induced ultrasonic calling in mouse pups: an embryo-transfer study. *Behavior genetics*, 38(6).
- Wöhr, M. et al., 2011. Lack of social exploratory activation in male μ -opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. *Social neuroscience*, 6(1).
- Wöhr, M. & Schwarting, R K W, 2009. Ultrasonic communication in rats: Effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 94(2).
- Wöhr, M. & Schwarting, R K W, 2007. Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PloS one*, 2(12).
- Yajima, Y. & Hayashi, Y., 1983a. Ambiguous motoneurons discharging synchronously with ultrasonic vocalization in rats. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale*, 50(2-3).
- Yajima, Y. & Hayashi, Y., 1983b. Identification of motoneurons in the nucleus ambiguus by antidromic stimulation of the superior and the recurrent laryngeal nerves in rats. *Brain research*, 288(1-2).
- Yajima, Y. & Larson, C.R., 1993. Multifunctional properties of ambiguous neurons identified electrophysiologically during vocalization in the awake monkey. *Journal of neurophysiology*, 70(2).
- Yamashita, M., Bless, D.M. & Welham, N.V., 2009. Surgical Method to Create Vocal Fold Injuries in Mice. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 118(2).

- Yeomans, J.S. et al., 2000. Brain-stimulation reward thresholds raised by an antisense oligonucleotide for the M5 muscarinic receptor infused near dopamine cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(23).
- Yizhar, O. et al., 2011. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363).
- Young, J.W. et al., 2011. Increased risk-taking behavior in dopamine transporter knockdown mice: further support for a mouse model of mania. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 25(7).
- Young, K., Gobrogge, K.L. & Wang, Z., 2011. The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(3).
- Young, P.T., 1959. The role of affective processes in learning and motivation. *Psychological review*, 66(2).
- Zeeb, F.D., Robbins, Trevor W & Winstanley, Catharine a, 2009. Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 34(10).
- Zeeb, F.D. & Winstanley, Catharine a, 2011. Lesions of the basolateral amygdala and orbitofrontal cortex differentially affect acquisition and performance of a rodent gambling task. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(6).
- Zhang, W. et al., 2002. Striatal Dopamine Release , as Studied with M 1 – M 5 Muscarinic Receptor Knock-Out Mice. , 22(15).
- Zoli, M. et al., 1999. Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. *The EMBO journal*, 18(5).
- Łopuch, S. & Popik, P., 2011. Cooperative behavior of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) in an instrumental task. *Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 125(2).

Annexes

Annexe 1: article 1: Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice.

Annexe 2: article 2: Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment.

Annexe 3: article 3: Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations.

Annexe 4: article 5: Computerized video analysis of social interactions in mice.

Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice

Maria Elena Avale,^{*,1} Jonathan Chabout,[†] Stéphanie Pons,^{*} Pierre Serreau,^{*,†} Fabrice De Chaumont,[†] Jean-Christophe Olivo-Marin,[†] Jean-Pierre Bourgeois,^{*,2} Uwe Maskos,^{*} Jean-Pierre Changeux,^{*} and Sylvie Granon^{*,†,3}

^{*}Unité Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, CNRS URA 2182, and [†]Laboratoire d'Analyse d'Imagerie Dynamique, Institut Pasteur, Paris, France; and [‡]Team Neurobiologie de la Prise de Décision, Université Paris Sud XI and CNRS UMR 8620, Centre de Neurosciences Paris Sud, Orsay, France

ABSTRACT Social behavior is a defining mammalian feature that integrates emotional and motivational processes with external rewarding stimuli. It is thus an appropriate readout for complex behaviors, yet its neuronal and molecular bases remain poorly understood. In this study, we investigated the role of the mouse prefrontal area, particularly the involvement of $\beta 2$ -subunit nicotinic receptors ($\beta 2^*$ -nAChRs) in a paradigm of social behavior with concurrent motivations. We previously observed that mice lacking $\beta 2^*$ -nAChRs ($\beta 2^{-/-}$) display increased time in social contact and exaggerated approach movements toward the novel conspecific. Here, combining behavioral analysis, localized brain lesions, and lentiviral gene rescue, we found that c-Fos expression is specifically activated in the prelimbic (PrL) area of the prefrontal cortex (PFC) of mice exposed to a novel conspecific; lesions of the PrL area in wild-type mice produce the same social pattern as in $\beta 2^{-/-}$ mice; and virally mediated reexpression of the $\beta 2$ -subunit in the PrL area of $\beta 2^{-/-}$ mice rescues behavioral components in the social interaction task up to normal levels. Together, these data reveal that social interactions particularly mobilize the PrL area of the mouse PFC and that the presence of functional PrL $\beta 2^*$ -nAChRs is necessary for this integrated behavior to emerge.—Avale, M. E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Bourgeois, J.-P., Maskos, U., Changeux, J.-P., Granon, S. Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J.* 25, 000–000 (2011). www.fasebj.org

Key Words: acetylcholine • prelimbic cortex • executive behavior • gene rescue

NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS containing the $\beta 2$ subunit ($\beta 2^*$ -nAChRs) are widely expressed in the brain (1), where they regulate a myriad of neuronal circuits (2). Mice lacking the $\beta 2$ subunit ($\beta 2^{-/-}$ mice; ref. 3) are precious tools for studying the functional role of $\beta 2^*$ -nAChRs; however, they cannot demonstrate the localization in which the expression of this subunit

is necessary for a given behavioral phenotype. The particular networks requiring functional $\beta 2^*$ -nAChRs for specific behaviors have only recently started to be elucidated using refined molecular tools (reviews in refs. 4, 5). Yet, the region specific involvement of $\beta 2^*$ -nAChRs in particular executive functions still remains poorly understood. We have previously shown that $\beta 2^{-/-}$ mice show biased behavior when confronted with a choice between conflicting motivations. For instance, these mice favor food reward over novelty exploration, and when previously deprived of social contact, they exaggeratedly engage in social interactions as compared to wild-type (WT) mice, displaying enhanced approaching behavior toward a novel conspecific (6). However, in the absence of conflicting motivations, $\beta 2^{-/-}$ mice exhibit unaffected cognitive behavior (6–8).

In the present study, we investigated and dissected the role of prefrontal $\beta 2^*$ -nAChRs in novel social interaction, using a paradigm involving concurrent motivations. Like other integrated behaviors, social interaction requires sequential choices of actions within an uncertain context, integrating both emotional and motivational processes (9). Recent evidence points toward a critical role of the prefrontal cortex (PFC) in this complex behavior (10). In addition, choices of action in uncertain environments increase decision-making processes, also dependent on the PFC (11,12). Concurrently, motivation for goal-directed behaviors largely depends on the expected value of the anticipated reward. Social reward has been described in

¹ Current address: MRC Centre for Neurodegeneration Research, King's College London, Institute of Psychiatry, London, UK.

² Current address: Unité de Génétique Humaine et Fonctions Cognitives, URA CNRS 2182, Département des Neurosciences, Institut Pasteur, Paris, France.

³ Correspondence: Université Paris Sud XI and CNRS UMR 8620, Centre de Neurosciences Paris-Sud, UMR 8195, Orsay, F-91405, France. E-mail: sylvie.granon@u-psud.fr

doi: 10.1096/fj.10-178558

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

humans (13, 14) and nonhuman primates (15), and also in rodents (16). In all species, even routine choices require the evaluation of reward values related to the selection of different actions. These goal-directed behaviors belong to the executive functions that mobilize discrete regions of the PFC (17).

In the behavioral paradigm used here, mice previously deprived of social interaction are exposed to an unknown conspecific in a novel environment (6,18). Isolated mice are thus placed in a situation in which they have to select between exploring the novel arena and seeking social contact. They have to adapt their approach behavior toward the novel conspecific, integrating their internal motivation for rewarding social contact with the uncertain behavior of the visitor mouse. The time spent in social contact was recorded as a first indicator of social activities, and different behavioral sequences were analyzed to distinguish the approach and escape behaviors of both the isolated and visitor mice. In addition, we scored behavioral parameters related to spatial exploration, social dominance and aggressiveness.

MATERIALS AND METHODS

Mice

$\beta 2^{-/-}$ mice were generated as described previously (3) and backcrossed to the C57BL/6J strain for >19 generations. Male $\beta 2^{-/-}$ and WT (C57BL/6J) mice used in this study were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) at 8–10 wk of age. They were housed in transparent plastic cages (15×30 cm) in groups of 4 or 5, in a temperature (20–22°C)- and humidity-controlled room under a 12/12-h light-dark cycle (lights on at 8:00 AM). They received food pellets and water *ad libitum*. Rearing was considered as standard (no enrichment on cages).

All surgery and behavioral procedures were carried out in accordance with European Commission directives 219/1990 and 220/1990, and approved by Animalerie Centrale and Médecine du Travail, Institut Pasteur.

Social interaction task

Experimental male mice (aged 12–16 wk) were maintained in social isolation for 4 wk by placing 1 mouse/cage under the same conditions as described above. The day of the experiment, each isolated mouse was put in a novel experimental environment (transparent plexiglas cage, 50×20 cm, covered with clean sawdust) in a novel quiet room (light set at 100–120 lux), and was allowed to visit the empty new environment, alone, for 30 min. After this period, a visitor male mouse (C57BL/6J) of the same age was introduced into the experimental environment. For cFos control experiments, a novel object that had been previously placed in a collective cage of male mice for a few hours was introduced instead of the visitor mouse. All mice used as visitors had been maintained in social cages of 4–6 animals. A different visitor mouse was used in each test. Social interactions between the isolated mouse and the visitor were recorded for 4 min on a videotape. The videotapes were analyzed 3 independent times by an experimenter masked to mouse genotype or condition. First, the duration of contacts was analyzed, independently of

the initiator of the contact, and the percentage of time spent in contact was quantified. Second, the time spent in exploration was determined for the experimental mouse, by quantifying the time spent exploring the cage, *i.e.*, not when approaching, escaping, or being approached by the novel conspecific. Times during which both conspecifics were close, facing each other even if not touching, were not scored as exploration time. In addition, the total number of rearings was quantified as an additional index of exploratory activity. Grooming behavior was quantified by the number of independent grooming episodes during the 4-min test.

Third, the numbers of 4 different sequences of interactions were scored: 1) the isolated mouse approaches, and the visitor escapes (IA-VE); 2) the isolated mouse approaches and follows the visitor while it escapes (IA/F); 3) the visitor approaches, and the isolated mouse remains passive (VA-IP); and 4) the visitor approaches, and the isolated mouse escapes (VA-IE).

Together with these affiliative-positive social contacts, we scored episodes of more aggressive social interactions. Aggressive grooming and defensive upright postures have never been observed. We observed and thus could quantify the numbers of tail rattling, attacks, and bites. We scored dominance features that we frequently observed, such as the “forepaw control,” which consists of the resident mouse placing its forepaws on the head or back of the visitor mouse, and circling behaviors, which consist of the resident mouse making fast circles around the visitor mouse without touching.

Open-field test

Mice were placed in the center of the empty 100-cm-diameter circular arena, and their trajectories were recorded for 30 min. The experiment was performed under soft illumination (100 lux) during the light period (11:00 AM and 4:00 PM). A camera fixed to the ceiling above was connected to the videotrack system (View-point, Lyon, France). This videotrack was used to determine total distance traveled (cm) and to record the time spent either in fast movements (speed ≥ 11.8 cm/s) or slow movements (speed ≤ 6.25 cm/s). The open-field trajectories were also analyzed to assess anxiety in the different groups of mice by quantifying the number of entries to the center (a virtual circle of 40 cm diameter) and the time spent in the periphery of the arena (thigmotaxis; within a virtual band of 15 cm from the border). All data of open-field analysis are shown in Supplemental Figs. S4 and S5.

c-Fos immunostaining and quantification

Immunohistochemistry

At the end of the social interaction test, each mouse was returned to its home cage for 90 min to allow for the synthesis of the c-Fos protein in the nuclei of activated neurons (19). A group of mice previously socially isolated for 4 wk but not subjected to the social or novel object interaction was used as a control. These mice were, like all other experimental animals, transported from their home cage to the experimental room and then immediately replaced in their home cage for 90 min. Mice were afterward sacrificed with pentobarbital and perfused through the heart with 20 ml of phosphate buffered saline (PBS) followed by 50 ml 4% paraformaldehyde in PBS. Brains were extracted and postfixed overnight in the same fixative at 4°C. Free-floating sections (70 μ m) were obtained using a vibratome (Leica Microsystems, Rijswijk, The Netherlands). Residual free aldehydes were neutralized in PBS containing 50 mM NH_4Cl , 1 mM lysine, and 1 mM

glycine, and endogenous peroxidases were neutralized during 20 min in PBS containing 3% H₂O₂, followed by 3 × 5 min rinse in PBS. Sections were then incubated for 30 min in PBS with 0.1% Triton, plus 1% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal goat serum (NGS). c-Fos immunolabeling was performed with a purified polyclonal rabbit IgG anti-human c-Fos (AB-5; PC38; Calbiochem, San Diego, CA, USA), diluted 1:8000 in PBS with 1% BSA, 1% NGS, 0.05% NaN₃ (sodium azide; S-2002; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.1% Triton for 38 h, at 4°C. After 3 × 10-min rinses in PBS, sections were incubated for 2 h with the secondary biotinylated antibody (goat IgG anti-rabbit; BA-1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted 1:600 in PBS with 1% BSA and 1% NGS, followed by an avidin-peroxidase complex (Vectastain Élite PK 6100; Vector Laboratories) for 30 min, at room temperature. After 3 × 5-min rinses in PBS, the staining was revealed using H₂O₂ and diaminobenzidine (D-5905; Sigma) for 3 min. After rinsing, sections were flattened on SuperFrost glass slides (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany), dehydrated with ethanol, and mounted.

Image acquisition and quantification of c-Fos⁺ nuclei

Quantification was performed automatically by identifying spot positions using a statistical analysis of the multiscale decomposition of the image. The program (<http://www.bioimageanalysis.org>) was able to detect spots by filtering out the image with an undecimated B3 wavelet at different scales and then thresholding it with a statistical procedure (20), taking into account the noise level of the current region of interest. Sections were positioned on the motorized stage (Prior Proscan; Prior Scientific, Rockland, MA, USA) of a Nikon Eclipse1000 light microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Images of the selected brain areas were acquired using a digital camera (Nikon DXM 1200). The constant use of a ×10 Plan Apo objective allowed both resolution for the c-Fos immunoreactive (c-Fos⁺) nuclei and the identification of the cytoarchitectonic fields. The focus was set on the upper face of each section before digitization. The final magnification, calibrated with a micrometer-object slide (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), scaled 100 μm in the tissues to 67 pixels in the images. Each region of interest (ROI) was delimited on the screen for each picture based on the mouse atlas (21). The software automatically calculated the surface of the ROI, converted the number of c-Fos⁺ nuclei into gray spots, and computed their density per square micrometer. In each coronal section, ipsilateral and contralateral areas of each region were analyzed separately and then averaged for each animal. The results were expressed as d_{spots} per square millimeter of cerebral tissue.

The regions of interest chosen for c-Fos quantification included cortical areas known to be involved in decision making [prelimbic (PrL), infralimbic (IL), and cingulate (Cg) cortices], in motivation [ventral orbitofrontal (VO) cortex and nucleus accumbens (NuAcc)], exploration [piriform (Pir) cortex] and emotions [basolateral amygdala (BLA)]. The primary motor (M1) cortex was analyzed as a control, as it was not expected to show specific activation during this test.

Lesion of the PrL area of PFC

Mice were anesthetized with ketamine (Imalgem 1000, 10% in PBS; Rhone Mérieux, Harlow, UK) and xylazine (Rompun, 2% in PBS; Bayer AG, Leverkusen, Germany), 10 ml/kg i.p., and placed in a stereotactic frame (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA), with the incisor bar set at -1 mm. The scalp was cut and the skull exposed. Within a single surgery procedure, 3 injections/side were performed to target the

PrL area at the following coordinates (21): anteroposterior (AP): +1.9, +2.3, +2.8 mm; lateral (L): ±0.3, ±0.3, ±0.4 mm; dorsoventral (DV): -2.5, -2.0, -1.5 mm, respectively. Next, 0.1 μl of 10 mg/ml NMDA solution (in PBS) was bilaterally injected into each site at an infusion rate of 0.1 μl/min. The needle was left *in situ* for an additional 2 min, before being slowly withdrawn from the brain. Finally, the scalp was sutured, and the mouse was placed on a heating pad until it regained motor ability. Control (sham-treated) mice were injected with 0.1 μl of PBS solution at the same coordinates. Behavioral experiments started 4 wk after surgery. For histological analysis of the lesion, 50-μm sections were cut and stained with cresyl violet. Nine mice received the NMDA injection, and 8 mice were injected with PBS (sham treatment). Three NMDA-injected animals were excluded from the lesion group after histological control: 2 because they had a lesion circumscribed to the cg1 area with no lesion of the PrL area, and 1 because the lesion was unilateral.

Lentiviral vectors

Reexpression vectors carrying either β2-IRES-eGFP or only the eGFP sequence under control of the PGK promoter were based on a modified pTRIPΔU3 lentiviral vector (22). Viral particles were generated as described previously (23). Briefly, HEK-293T cells (at 80–85% confluence) were cotransfected with the vector plasmid together with a packaging plasmid (CMVΔ8.9) and an envelope plasmid (CMV-VSVg), using Lipofectamin Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). At 2 d after transfection, viral particles were harvested from the supernatant, concentrated by ultracentrifugation, and stored at -80°C.

Stereotaxical injections of lentivirus

Mice aged 8–10 wk (weight 25–30 g) were anesthetized using ketamine/xylazine and introduced into a stereotactic frame adapted for mice. Next, 2 μl of virus (0.5–1 × 10⁶ TU) was injected bilaterally at the following coordinates (21). PrL: AP, +2.8 mm from bregma; L, ±0.6 mm; and DV, -2.3 mm from the skull. Substantia nigra pars compact (SNpc): AP, -3.0 mm from bregma; L, ±1.3 mm; and DV, -4.3 mm from the skull. Ventral tegmental area (VTA): AP, -3.5 mm; L, ±0.5 mm; and DV, -4.4 mm. Stereotactic surgery procedures were performed as described above for PrL lesions.

[¹²⁵I]-epibatidine autoradiography

To determine the presence of high-affinity nicotinic β2*-nAChRs sites, brains were dissected, frozen in dry ice, and stored at -80°C until use. Coronal sections (20 μm thick) were cut at -20°C and thaw-mounted onto SuperFrost Plus microscope slides (Menzel-Gläser). Slides were incubated at room temperature with 200 pM [¹²⁵I]-epibatidine (specific activity 2200 Ci/mmol; NEN Perkin Elmer, Boston, MA, USA) in 50 mM Tris (pH 7.4) for 60 min. After incubation, sections were rinsed 2 × 5 min in the same buffer and briefly in distilled water. Sections were exposed for 24 h to Kodak Biomax films (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). For quantification of β2*-nAChRs reexpression, OD values were obtained by ImageJ (24) at 4 different levels in the AP axis (rostral PrL area, between AP +2.8 and +2.34 mm from bregma; caudal PrL area, between AP +2.34 and +1.54 mm from bregma). Standard curves were used to convert OD measures to nCi/mg. The level of restoration was expressed as percentage of expression compared to WT mice.

Statistical analysis

c-Fos quantification data in each brain area were analyzed with 1-way ANOVAs followed by Bonferroni *post hoc* tests. Behavioral data were analyzed with 1-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test or 2-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests when appropriate. Students' *t* tests were used when 2 groups were compared, in the lesion *vs.* sham behavioral analyses. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.01 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Data are presented as means \pm SE.

RESULTS

Setup of the social interaction task

To establish the experimental conditions in which mice will favor interaction with a social partner without neglecting novelty exploration, we conducted a preliminary experiment with WT mice, varying the level of motivation either for social contact or for novelty exploration (see Supplemental Fig. S1). Three different conditions were tested. For condition 1 (isolation–no habituation), the experimental mouse previously isolated was introduced to the novel environment at the same time as the visitor mouse, *i.e.*, no exploration of the novel arena was allowed to any mouse before the social test; for condition 2 (no isolation–habituation), none of the mice were isolated before the test, and the experimental mouse was allowed to explore alone the arena for 30 min before introducing the second mouse; and for condition 3 (isolation and habituation), the isolated mouse was allowed to explore the arena alone, and the visitor mouse was introduced after 30 min.

When isolated mice were not allowed to explore the novel environment before the social test (condition 1), their time devoted to social contact was $<10\%$ ($6.40 \pm 1.6\%$) while the time spent in exploring the environment was significantly greater ($58.14 \pm 1.5\%$; Supplemental Fig. S1). On the other hand, when nonisolated mice were habituated to the novel environment for 30 min before introducing the conspecific (condition 2), the duration of social contact was still significantly lower than the time spent in exploring the environment (10.07 ± 1.55 *vs.* $35.93 \pm 2.88\%$). Finally, combining social isolation and 30 min habituation to the environment for the isolated mouse strongly increased the duration of social contact ($37.16 \pm 2.90\%$), which was similar to the time spent in exploration of the environment ($35.42 \pm 1.51\%$). Based on this preliminary experiment, we decided to use experimental condition 3, in which the time devoted to social contact and to novelty exploration were balanced.

We also quantified the instances of attacks, bites, and forepaw control in order to determine whether any aggressive/dominance behavior was related to the increase in social contact. Bites or attacks were not observed in any of the mice in any of the conditions tested. Circling behavior was observed in only 2 mice.

For forepaw control, which reflects dominance behavior, there was a significant effect of habituation (difference between conditions 1 and 2: 1 ± 0.41 *vs.* 3.78 ± 0.52 , $P=0.001$), but no effect of social isolation (no difference between conditions 2 and 3: 3.78 ± 0.52 *vs.* 5.31 ± 0.86 , $P=0.21$, NS). These data indicate that the increase in social contact is unlikely to be related to increased aggressiveness of isolated mice, but that habituation to the environment potentiates dominance features during social interaction.

Analysis of c-Fos immunostaining after the social interaction test

Mice previously isolated for 4 wk (isolated mice) were introduced in a novel environment (see Materials and Methods), and after 30 min of habituation, a social conspecific (visitor mouse) or a novel object was introduced into the cage for 4 min. The introduction of a novel object instead of the visitor mouse is expected to provide a nonspecific, novelty-associated stimulation. At 90 min after the test, mice were sacrificed, and c-Fos immunoreactivity was analyzed in different brain areas (Fig. 1A) and compared to basal c-Fos reactivity of a control group of mice that were not exposed to a social congener or novel object but that had also been socially deprived for 4 wk. c-Fos⁺ reaction was quantified in cortical areas, including the lateral orbitofrontal (LO) and VO cortex (LO/VO), PrL, IL, Cg, and Pir cortex. The M1 cortex was also analyzed as a control, as it was not expected to show specific activation during this test. After detecting enhanced reactivity in the PrL area, c-Fos immunostaining was quantified both at the rostral and caudal levels to better analyze the pattern of activation in this region. We also analyzed c-Fos expression in two subcortical structures, the NuAcc and BLA.

Both groups of mice either exposed to social congener or novel object evidenced similar levels of enhanced c-Fos reactivity compared to control group in LO/VO, rostral PrL, IL, Cg, and NuAcc (Fig. 1B; 1-way ANOVAs between the 3 groups in each area, $P<0.001$, followed by *post hoc* tests as indicated). However, isolated mice that were exposed to a social conspecific showed a significant (45%) increase in c-Fos immunostaining in the caudal PrL area as compared to mice exposed to a novel object (Fig. 1B, C; 1-way ANOVA, $F_{(2,26)}=16.27$, $P<0.0001$, followed by Bonferroni *post hoc* test $P<0.001$ social congener *vs.* novel object). All the other regions showed nonsignificant differences in c-Fos immunostaining between these two groups of mice.

Lesion of the PrL cortex affects flexible behavior in the social interaction task

To study the implication of the PrL in the social interaction test, we performed a lesion of this area in WT mice (Fig. 2A). The lesion led to the destruction of the PrL but did not affect adjacent cortical regions, either Cg or IL. During the 3–4 wk of postoperative recovery, mice were

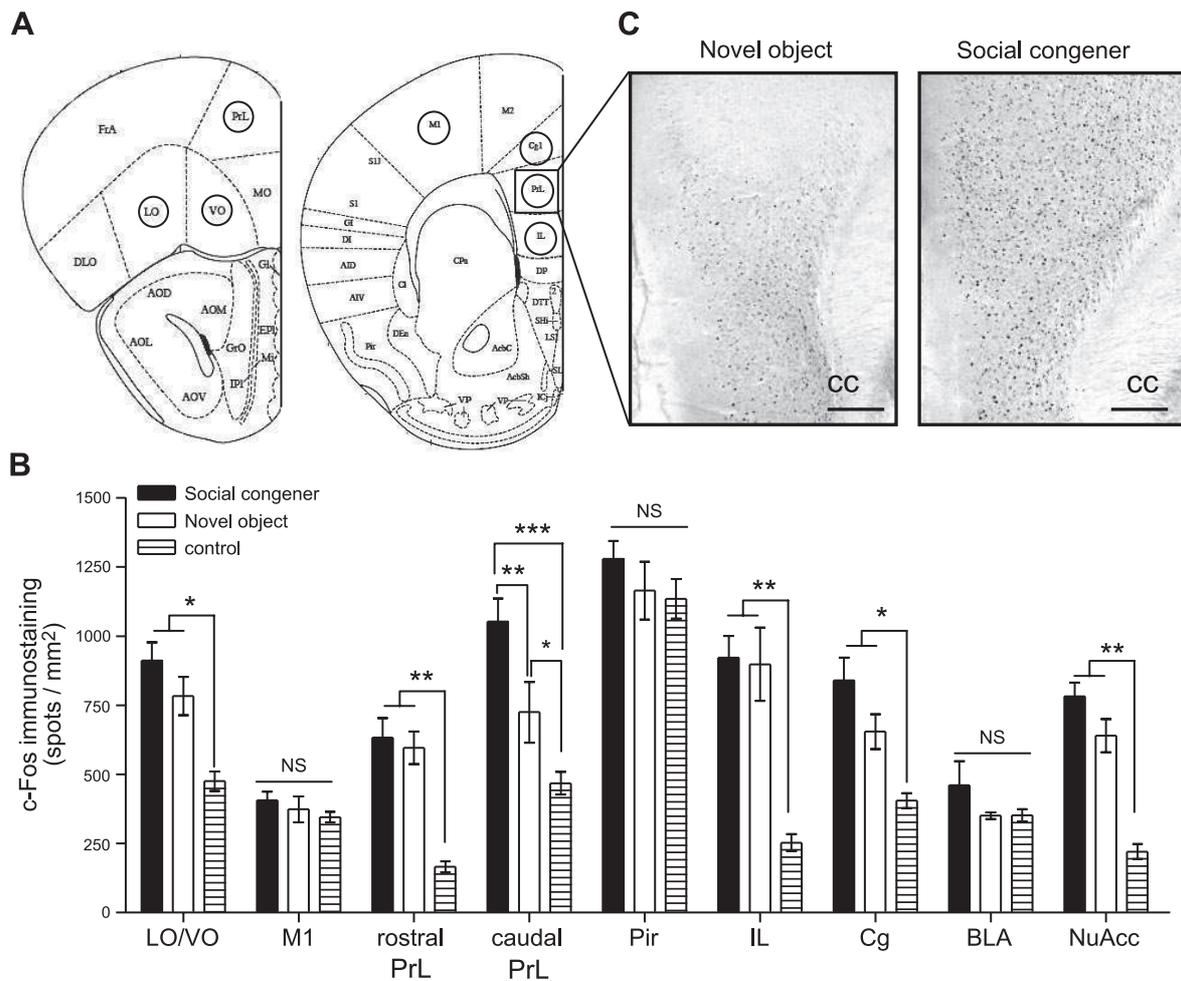


Figure 1. Enhanced c-Fos immunostaining in the PrL area after the social interaction task. Two independent groups of mice were exposed to a social congener or to a novel object, after 3 wk of isolation. c-Fos immunostaining was quantified 90 min after the exposure and compared to a control group of mice. *A*) Schematic representation of the 2 AP brain levels used for c-Fos quantification (left panel: AP +2.8; right panel: AP +1.54 mm from bregma); circles indicate areas included in the analysis. In the PrL area, c-Fos staining was quantified both at the rostral (left panel) and caudal (right panel) level. *B*) Quantification of c-Fos immunostaining in the areas indicated above. Values are means \pm SE. Social congener, $n = 10$; novel object, $n = 7$; control, $n = 10$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Bonferroni *post hoc* test. *C*) Representative c-Fos immunostaining in the caudal PrL area of mice exposed to a social congener or to a novel object (AP +1.54 mm from bregma). cc, corpus callosum. Scale bars = 150 μ m.

socially isolated and thereafter tested in the social interaction task (Fig. 2*B, C*). Isolated PrL-lesioned mice showed a significant increase in the time spent in contact with the visitor mouse ($51.2 \pm 4.1\%$) as compared to isolated sham mice ($36.7 \pm 2.7\%$; $P = 0.007$, 2-tailed Student's *t* test; $t = 3.22$, $df = 12$; Fig. 2*B*). Concomitantly, the time spent in exploration of the environment during the test was significantly reduced in the lesioned group ($21.54 \pm 2.8\%$) with respect to the sham group ($35.42 \pm 1.53\%$; $P = 0.0005$, $t = 4.54$, $df = 14$, 2-tailed unpaired Student's *t* test; Fig. 2*B*). This reduction in the exploratory activity in PrL-lesioned mice was also evidenced by a decrease in the number of their rearing activity (7.85 ± 2.11) as compared with sham mice (15.44 ± 0.92 ; $P = 0.0018$, $t = 3.84$, $df = 14$, 2-tailed unpaired Student's *t* test; Fig. 2*D*).

To better understand the particular behaviors related to the increased time spent in social contact, we

quantified 4 different social behavioral sequences: IA-VE, IA/F, VA-IP, and VA-IE (see Materials and Methods). Isolated mice that were lesioned in the PrL area showed a significant increase in their approach and follow behavior (IA/F) toward the visitor (26 ± 2.4) when compared to sham-lesioned mice (12 ± 2.4 ; 2-way ANOVA; lesion effect $F_{(1,48)} = 21.87$, $P < 0.001$; followed by Bonferroni *post hoc* test, IA/F lesion *vs.* sham, $t = 10.09$, $P < 0.001$). All the other behavioral sequences were similar in sham and lesioned mice (Bonferroni *post hoc* tests: IA-VE, $t = 0.21$; VA-IP, $t = 0.24$; VA-IE, $t = 0.30$; $P > 0.05$), suggesting that the increased time spent in social interaction observed in PrL-lesioned mice (Fig. 2*B*) is mostly due to an increased tendency to follow the new visitor and remain in close contact with it. This increase in the approaching behavior of PrL-lesioned mice is not related to general hyperactivity, as they did not show any alteration in locomotor scores

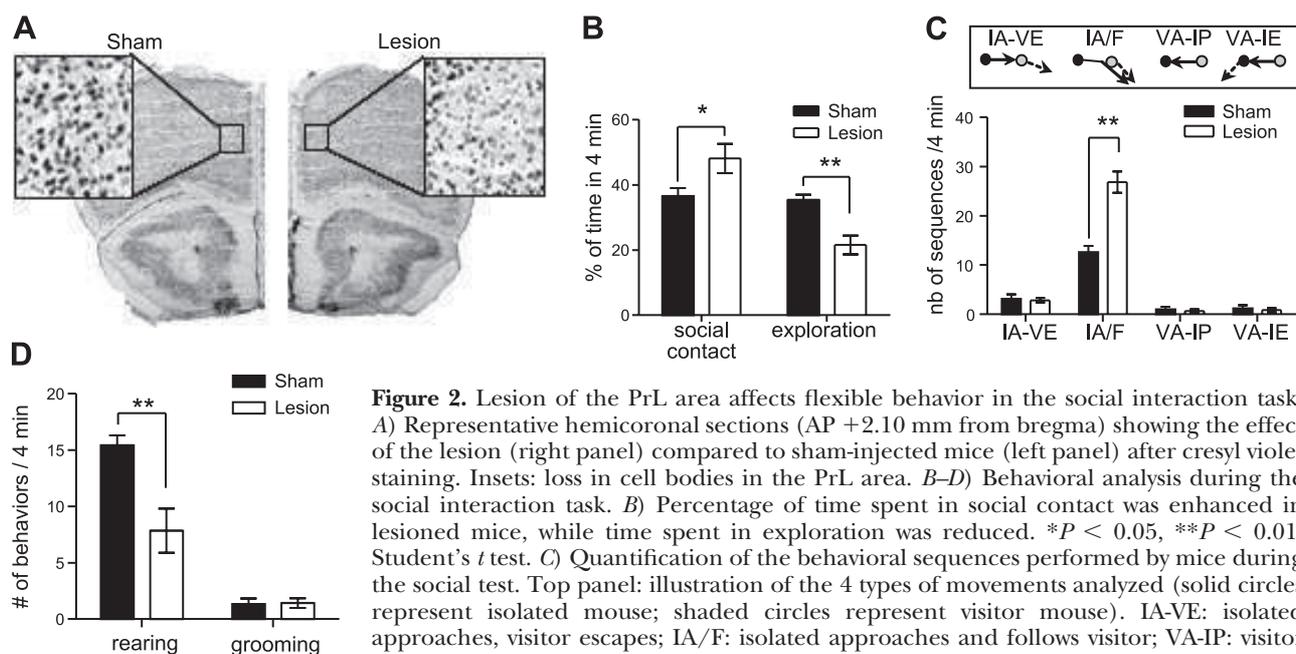


Figure 2. Lesion of the PrL area affects flexible behavior in the social interaction task. *A*) Representative hemispherical sections (AP +2.10 mm from bregma) showing the effect of the lesion (right panel) compared to sham-injected mice (left panel) after cresyl violet staining. Insets: loss in cell bodies in the PrL area. *B–D*) Behavioral analysis during the social interaction task. *B*) Percentage of time spent in social contact was enhanced in lesioned mice, while time spent in exploration was reduced. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Student's *t* test. *C*) Quantification of the behavioral sequences performed by mice during the social test. Top panel: illustration of the 4 types of movements analyzed (solid circles represent isolated mouse; shaded circles represent visitor mouse). IA-VE: isolated approaches, visitor escapes; IA/F: isolated approaches and follows visitor; VA-IP: visitor approaches, isolated remains passive; VA-IE: visitor approaches, isolated escapes. Lesioned mice showed enhanced number of IA/F sequences; all the other sequences were similar between lesion and sham groups. ** $P < 0.001$, Student's *t* test. *D*) Rearing behavior was reduced in lesioned mice, but no changes occurred in grooming behavior. ** $P < 0.001$; Student's *t* test. Values are means \pm SE. Lesion, $n = 6$; sham, $n = 8$.

when tested in the open field (Supplemental Fig. S4). In addition, no aggressive behavior (bites/attacks) was detected in any of the mice during the social contact. Forepaw control dominance was not significantly different (sham, 6.4 ± 0.31 ; and PrL-lesioned, 5.7 ± 1.7 , $P = 0.72$), and no circling behavior was observed.

Rescue of $\beta 2^*$ -nAChRs in the PrL cortex of $\beta 2^{-/-}$ mice

In previous reports, $\beta 2^{-/-}$ mice were found to display enhanced time in social contact as compared to WT mice during the social interaction test (6), closely resembling the behavioral pattern of PrL-lesioned mice observed here (Fig. 2). These findings led us to hypothesize that PrL $\beta 2^*$ -nAChRs might be key components for social motivations during the social interaction task. To test this hypothesis, we performed a specific rescue of $\beta 2^*$ -nAChRs in the PrL area of a group of $\beta 2^{-/-}$ mice and compared the behavior of these PrL-rescued mice with WT and $\beta 2^{-/-}$ mice in the social task.

We locally restored $\beta 2^*$ -nAChRs in the PrL area of adult $\beta 2^{-/-}$ mice by stereotactic injection of a lentiviral vector carrying the $\beta 2$ subunit (see Materials and Methods). This lentiviral gene rescue strategy has been previously used successfully to restore other behavioral phenotypes of the $\beta 2^{-/-}$ model by reexpressing the $\beta 2$ subunit in midbrain dopaminergic areas (22, 23). To determine the presence of functional $\beta 2^*$ -nAChRs, we performed a binding assay with [125 I]-epibatidine, a highly specific $\beta 2^*$ -nAChRs ligand, in brain slices of WT, $\beta 2^{-/-}$, and rescued mice (Fig. 3A). As previously reported (3, 22, 23), $\beta 2^{-/-}$ mice show a complete absence of [125 I]-epibatidine binding sites in the brain.

At 4 wk after the lentiviral injection, rescued (PrL-RESC) mice showed restoration of binding sites in the injected area, evidence that the reexpressed $\beta 2$ subunit partners with endogenous α subunits to restore functional $\beta 2^*$ -nAChRs, as previously observed in other brain areas (22, 23). For quantification purposes, a limit between rostral and caudal regions of the PrL area was arbitrarily established at +2.34 mm from bregma, and this limit was used as a parameter to analyze the average distribution of the rescued $\beta 2^*$ -nAChRs. The lentiviral injection performed here yielded an average of 60% restoration of [125 I]-epibatidine binding sites in the caudal PrL area and 20% in the rostral PrL area compared to WT levels (Fig. 3B). Control (WT and $\beta 2^{-/-}$) mice used in this study were injected with a similar lentiviral vector carrying only the eGFP reporter gene, which does not restore the level of [125 I]-epibatidine binding or affect the behavioral performance (22, 23).

To determine the minimal level of reexpression needed to achieve a significant behavioral rescue in the social task, we analyzed PrL-RESC mice exhibiting different percentages of $\beta 2$ subunit reexpression in the caudal PrL area. Sixteen $\beta 2^{-/-}$ mice were injected with lentiviral particles carrying the $\beta 2$ subunit. Nine of the injected mice showed $>40\%$ (compared to WT) of $\beta 2^*$ -nAChRs restoration, determined by [125 I]-epibatidine binding. Three mice exhibited 20–40% of restoration, and 4 mice were $<20\%$ (see Supplemental Fig. S2). We observed that mice with $<40\%$ restoration performed similarly to $\beta 2^{-/-}$ mice in time spent in social contact, whereas those with $\geq 40\%$ rescue exhibited similar levels to WT controls (Fig. 3C; 1-way ANOVA $F_{(4,26)} = 11.65$, $P < 0.001$, followed by Tukey's

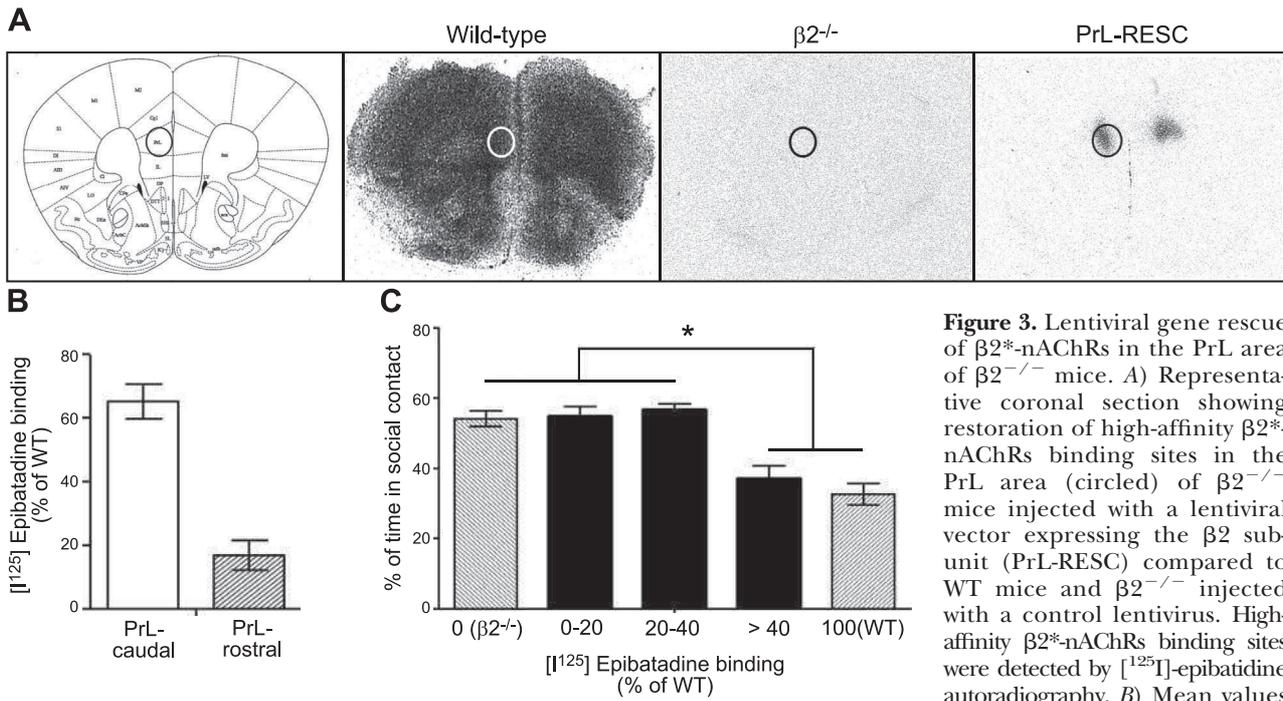


Figure 3. Lentiviral gene rescue of $\beta 2^*$ -nAChRs in the PrL area of $\beta 2^{-/-}$ mice. **A)** Representative coronal section showing restoration of high-affinity $\beta 2^*$ -nAChRs binding sites in the PrL area (circled) of $\beta 2^{-/-}$ mice injected with a lentiviral vector expressing the $\beta 2$ subunit (PrL-RESC) compared to WT mice and $\beta 2^{-/-}$ injected with a control lentivirus. High-affinity $\beta 2^*$ -nAChRs binding sites were detected by [¹²⁵I]-epibatidine autoradiography. **B)** Mean values of [¹²⁵I]-epibatidine binding

quantified in 4 rostral (between AP +2.8 and +2.34 mm from bregma) and caudal (between AP +2.34 and +1.54 mm from bregma) coronal sections of the PrL area of PrL-RESC mice ($n=9$). Values are expressed as percentage of WT OD (means \pm SE). **C)** Reexpression threshold for behavioral rescue in $\beta 2^{-/-}$ mice exhibiting different levels of $\beta 2^*$ -nAChRs restoration in the caudal PrL area. [¹²⁵I]-epibatidine OD autoradiography was quantified bilaterally in 4 caudal sections of the PrL area (as in **B**); and expressed as percentage of WT levels. Percentage of time spent in social time was determined for each group of rescued mice ($\beta 2^{-/-}$, $n=9$; PrL-RESC: 0–20%, $n=4$; 20–40%, $n=3$; $\geq 40\%$, $n=9$; WT, $n=6$). * $P < 0.05$; 1-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

test). Therefore, only mice exhibiting $\geq 40\%$ restoration of [¹²⁵I]-epibatidine binding sites were considered as rescued mice and included as the PrL-RESC group in the analyses performed thereafter.

Behavioral analyses of WT, $\beta 2^{-/-}$, and PrL-RESC mice

When tested in the social interaction task (Fig. 4), $\beta 2^{-/-}$ mice showed a significant enhancement of the time spent in contact with the visitor as compared to

WT mice (WT, $37.9 \pm 5.9\%$; $\beta 2^{-/-}$, $52 \pm 3.2\%$; Fig. 4A; 1-way ANOVA $F_{(2,28)}=5.96$, $P=0.007$, followed by Tukey's test), while their time spent in exploration of the environment was reduced (WT, $35.4 \pm 2.8\%$; $\beta 2^{-/-}$, $23.5 \pm 2.2\%$; Fig. 4A; 1-way ANOVA $F_{(2,28)}=10.35$, $P=0.0005$, followed by Tukey's test) as well as their rearing activity (WT, 16.1 ± 1.9 ; $\beta 2^{-/-}$, 9.7 ± 1.6 ; Fig. 4B; 1-way ANOVA $F_{(2,28)}=6.51$, $P=0.005$, followed by Tukey's test). In the PrL-RESC group, the time spent in social contact ($37.1 \pm 3.9\%$) and exploration of the environment ($40.6 \pm 3.8\%$) were completely restored to

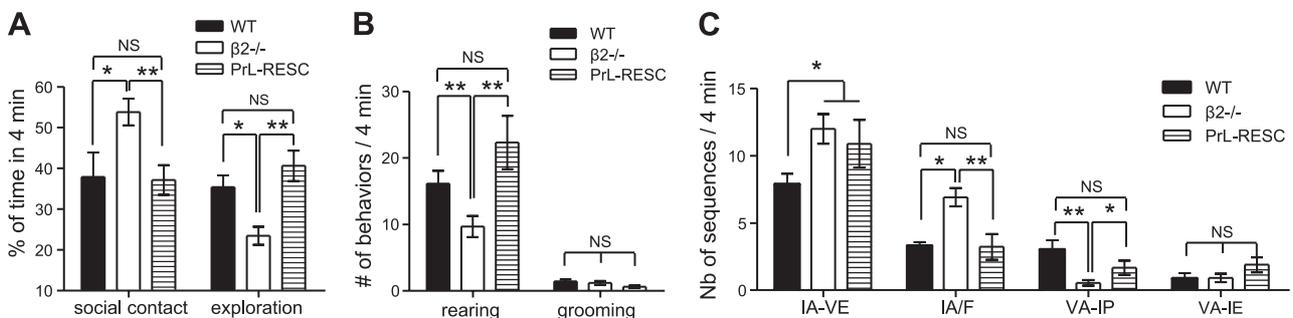


Figure 4. Behavioral rescue in the social interaction task after $\beta 2^*$ -nAChRs restoration in the PrL area. **A)** Percentage of time spent in social contact or exploration in WT, $\beta 2^{-/-}$, and PrL-RESC mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 1-way ANOVA with Tukey's test. **B)** Rearing and grooming behavior determined during the 4-min social test. ** $P < 0.001$; 1-way ANOVA with Tukey's test. **C)** Quantification of the behavioral sequences performed by WT, $\beta 2^{-/-}$, and PrL-RESC mice during the social test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 2-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test. Values are means \pm SE. WT, $n = 7$; $\beta 2^{-/-}$, $n = 11$; PrL, $n = 9$.

WT levels (Fig. 4A). Also, the rearing activity was similar to the WT group (PrL-RESC, 22.3 ± 4 ; WT, 16.1 ± 1.9 ; $P=0.57$; Fig. 4B).

As an additional experimental control, the $\beta 2$ subunit was restored in 2 other brain areas of $\beta 2^{-/-}$ mice, the SNpc and the VTA. The functional recovery of $\beta 2^*$ -nAChRs in the VTA or SNpc did not affect the time spent in social contact of $\beta 2^{-/-}$ mice (SNpc-RESC, $53.13 \pm 4.23\%$; VTA-RESC, $50.71 \pm 2.41\%$, $\beta 2^{-/-}$, $52 \pm 3.2\%$; 1-way ANOVA $F_{(2,24)}=0.6$, $P=0.54$, NS).

We also performed an open-field test to determine whether restoration of $\beta 2^*$ -nAChRs in the PrL area had any effect on the overall locomotor activity of $\beta 2^{-/-}$ mice (Supplemental Fig. S5). It was previously reported that $\beta 2^{-/-}$ mice exhibit increased locomotor activity in the open field, which relies on the lack of functional $\beta 2^*$ -nAChRs in the nigrostriatal pathway (23). We did not find any differences between $\beta 2^{-/-}$ and PrL-RESC mice in the open-field test; both groups exhibited similar increases in distance traveled (Supplemental Fig. S5A) and fast movements (Supplemental Fig. S5B) as compared to WT mice. This data confirmed that motor phenotypes observed in $\beta 2^{-/-}$ mice are not dependent on functional PrL $\beta 2^*$ -nAChRs.

We assessed anxiety in WT, $\beta 2^{-/-}$, and PrL-RESC mice by analyzing the trajectories in the open field to determine thigmotaxis (Supplemental Fig. S5D) and the number of entries in the center of the open field (Supplemental Fig. S5E). The 3 groups of mice showed similar anxiety-related behaviors ($P>0.05$).

We next analyzed the behavioral sequences performed during the social task in the PrL-RESC group compared to WT and $\beta 2^{-/-}$ mice (Fig. 4B). A significant difference in the number of each sequence was observed between groups (2-way ANOVA, interaction effect $F_{(6,96)}=4.39$, $P=0.006$; followed by Bonferroni *post hoc* tests). Compared to WT mice, $\beta 2^{-/-}$ mice showed a significant enhancement of IA-VE behavior ($t=3.45$, $P<0.01$), and in IA/F behavior ($t=3.02$, $P<0.05$). The VA-IP behavior was diminished in isolated $\beta 2^{-/-}$ mice as compared to WT mice; however, it was not significantly different ($t=2.043$, $P>0.05$). In the PrL-RESC group the IA/F behavior was restored to WT levels (RESC vs. $\beta 2^{-/-}$: $t=3.3$, $P<0.01$; RESC vs. WT: $t=0.051$, $P>0.05$). The IA-VE sequences of PrL-RESC mice were not significantly different from the $\beta 2^{-/-}$ group ($t=0.99$, $P>0.05$) nor from WT ($t=2.42$, $P>0.05$). Finally, the number of VA-IP and VA-IE sequences was similar between the 3 groups.

We also quantified aggressive behaviors by recording the number of attacks/bites performed by the 3 groups of mice. No aggressive attacks were observed in the WT group. Five $\beta 2^{-/-}$ mice displayed moderate aggressive behavior toward the novel conspecific (average number of attacks: 3 ± 1.3 in 4 min), while 2 PrL-RESC mice displayed mild aggressive behavior (average number of attacks: 1.8 ± 1.4 in 4 min). However, the time spent in social contact of aggressive ($56 \pm 5.3\%$) and nonaggressive ($48 \pm 5.1\%$) $\beta 2^{-/-}$ mice was not significantly different ($t=1.628$, $df=10$; $P=0$, Student's *t test*). Paw control

did not differ between WT and $\beta 2^{-/-}$ mice (WT, 3.86 ± 0.9 ; $\beta 2^{-/-}$ mice, 7.5 ± 2 , $P=0.2$, NS) but circling behavior was higher in $\beta 2^{-/-}$ mice (WT, 0.29 ± 0.31 ; $\beta 2^{-/-}$ mice, 5.52 ± 2.03 , $P=0.04$). This parameter was restored in the PrL-RESC group (WT, 0.29 ± 0.31 ; PrL-RESC, 1.36 ± 0.99 , $P=0.34$, NS).

DISCUSSION

In this study, we analyzed the contribution of $\beta 2^*$ -nAChRs in a social interaction task with concurrent motivations. We established a social test performed in a novel environment with previously isolated mice. We chose experimental conditions in which the motivation for social contact was balanced with motivation for exploring the environment. This balance was achieved when previously isolated mice were habituated to the novel environment for 30 min before introducing the novel conspecific (Supplemental Fig. S1). This paradigm relies on the ability of isolated mice to adapt their approaching behavior toward a novel conspecific in response to their own motivation for social contact. The protocol thus involves decision making in a context of natural motivations, provided that a decision is defined as the choice of one behavior out of a set of several potential alternatives, with uncertainty as a major factor (11). In this task, the uncertainty generated by the visitor's behavior affect the number of different actions and of adaptive decisions made by the isolated mouse.

We did not observe any sign of aggressiveness in isolated mice during the social test in any of the conditions of isolation/habituation analyzed. Even if we cannot rule out the possible contribution of some kind of aggressive/dominant motivation, based on the results obtained throughout this work we propose a predominance of an affiliative motivation behind the increased time in social contact.

Role of the PrL area in mouse social interaction

Analysis of c-Fos immunoreactivity suggested that the social interaction task particularly mobilizes the PrL area (Fig. 1). Several cortical areas (LO/VO, IL, Cg, rostral PrL) as well as the NuAcc showed equivalent activation when mice were exposed to a social congener or to a novel object, as compared to an home cage stimulation, evidencing that these regions are likely to be activated by novelty *per se*. However, c-Fos reactivity in the caudal PrL area was particularly enhanced in mice exposed to the social congener, while a significant but more modest activation was observed after introduction of the novel object. This observation gave us the clue that the PrL region, while certainly involved in novelty exploration, might be playing a key role during the social interaction task, even if we can not rule out simpler hypotheses, such as the possibility that the PrL area was activated by social odors.

To directly test the involvement of the PrL area in the social task, we performed lesions in this area, which led

to enhanced time spent in social contact together with increased approach/follow behavior. Lesioned mice showed a significant increase in social contact, while the exploration of the environment was reduced. Novelty exploration *per se* is not altered by PrL lesions (25, 26). Thus, favoring social interaction is unlikely to be due to a lack of interest for the novel environment. Our interpretation, indeed, is that PrL-lesioned mice are unable to disengage from a type of action leading to some kind of reward (social partner) to balance behaviors between social interaction and exploration of the environment. This idea is consistent with previous findings in rats showing the PrL area to be involved in the switch between strategies, rewards, or actions (27–29). Alternatively, it is important to note that the integration of sensory cues, such as olfactory or auditory cues, shown to be important during social interactions, might also influence the functioning of the prefrontal cortex. The integration of this sensory information with reward information could create an emotional pattern/state that may alter social interactions. This remains to be fully examined.

The c-Fos immunostaining distinguished a specific activation in the caudal part of the PrL area during the social task (Fig. 1), which is consistent with results of lentiviral rescue, showing that reexpression in the caudal PrL area led to behavioral rescue (Fig. 3 and Supplemental Material). Distinct differences in projections from the rostral and caudal PrL cortex have been described in rats by anterograde tracing (30,31), showing differential patterns of efferent outputs toward limbic structures. Our current data suggest a functional dissection between caudal and rostral PrL areas, but further anatomical and behavioral analyses should be performed in order to test this possibility.

Altogether, our PrL-lesion and c-Fos results emphasize a role of the PrL area when social contact is one concurrent motivation. The involvement of different subareas of the PFC in social value and social reward has been shown in humans (13, 32). Although the prefrontal cortex is definitely more complex in humans than in mice, it is interesting to highlight that the choice between different types of reward involves homologous areas in both species.

Lentiviral rescue of PrL $\beta 2^*$ -nAChRs

$\beta 2^{-/-}$ mice, like PrL-lesioned mice, display enhanced social motivation during the social task, as evidenced by increased time spent in social contact and approach/follow behavior. The strikingly close behavioral similarities between PrL-lesioned and $\beta 2^{-/-}$ mice led us to hypothesize that PrL $\beta 2^*$ -nAChRs might be key regulators of this particular behavior. To directly test this hypothesis, we locally reexpressed the $\beta 2$ subunit in the PrL area of $\beta 2^{-/-}$ mice. This site-specific rescue was enough to restore the time spent in social contact and the approach/follow behaviors to WT controls. Interestingly, a minimum of 40% restoration of functional $\beta 2^*$ -nAChRs was required to achieve a behavioral res-

cue (Fig. 3C), suggesting that a minimal threshold of reexpression was necessary and sufficient to achieve the behavioral rescue in the social task.

It has been shown that nicotinic subunits expressed heterologously assemble into high-sensitivity (HS) and low-sensitivity (LS) sensitivity nAChRs, depending on the α/β ratio (33). In our system, the reexpressed $\beta 2$ subunits partner with endogenous α subunits to form probably both types of $\beta 2^*$ -nAChRs. The [125 I]-epibatidine binding assay used to determine the level of restoration does not differentiate between these populations. However, *in vivo* electrophysiology has been used to verify that lentivirally restored $\beta 2^*$ -nAChRs are fully functional and display nicotine responses similar to the endogenous population (34). Moreover, *in vivo* microdialysis studies in rescued mice substantiate efficient, WT-like restoration of receptor function (22,23).

It is noteworthy that the $\beta 2$ subunit reexpression in the VTA or SNpc, although restoring flexible behavior between slow exploratory behavior and fast locomotor ambulation (22, 23), does not restore social behavior. The changes between successive actions or strategies in rodents involves prefrontal regions (29) as well as the basal ganglia (35, 36). Taken together with our previous efficient recovery obtained in more elementary and self-generated choices of action behavior (22, 23), our present results highlight the contribution of the $\beta 2$ subunit in the PrL area of the mouse to flexible behaviors. In self-generated decision making such as the one involved in the exploration and locomotion of a novel environment, the VTA-NuAcc-PFC circuit would mostly recruit the subcortical areas. In behaviors requiring the integration of combined, and sometimes conflicting, motivations, stimuli, and sensory cues, such as the one implicated in the social interaction task, the prefrontal contribution increases.

Cholinergic prefrontal modulation of executive behaviors

Our present data support the role of PrL $\beta 2^*$ -nAChRs in adapted social behaviors, emphasizing the contribution of the prefrontal cholinergic inputs to executive processes. The basal forebrain cholinergic systems projecting to the medial PFC (mPFC) have proposed roles in learning, working memory, and attention (37–40). In addition, prefrontal $\beta 2^*$ -nAChRs are known to be involved in attentional performance (41). However, to the best of our knowledge, our results are the first evidence of the cholinergic control through prefrontal $\beta 2^*$ -nAChRs in social behaviors.

Nicotinic receptors contribute to the regulation of corticolimbic circuits (42). Particularly, $\beta 2^*$ -nAChRs were described in specific interneurons of the PFC (43) and were recently described to play a role in dendritic morphogenesis of pyramidal neurons (44). On the other hand, stimulation of $\beta 2^*$ -nAChRs enhances thalamocortical excitatory inputs to the PFC (45). Therefore, both PFC afferents and efferents are potential targets for cholinergic modulation through $\beta 2^*$ -

nAChRs. Our lentiviral reexpression strategy locally restored the $\beta 2$ subunit in neuronal populations of the PrL area, as lentiviral particles are only able to infect and integrate into cells with their cell bodies in the injected area. Thus, given that $\beta 2$ subunit expression is not restored in the PFC afferents, the role of $\beta 2^*$ -nAChRs described here might rely on the modulation of PrL outputs toward subcortical structures. This modulation is likely to be mediated by $\beta 2^*$ -nAChRs in GABAergic interneurons of the PrL area, yet, this hypothesis remains to be tested with more refined molecular tools restoring $\beta 2^*$ -nAChRs in particular neuronal subpopulations (46).

The top-down control of PFC toward limbic structures involves prefrontal glutamatergic outputs that may alter the balance between the amygdala, the hippocampus and the NuAcc (47). In rodents, the densest projections from the PFC to the NuAcc and amygdala originate in the PrL area (31). Therefore, it is plausible that the lack of PrL $\beta 2^*$ -nAChRs affects the fine-tuning balance between top-down-regulation of reward seeking behavior (*via* PrL-NuAcc outputs) and emotional state (*via* the PrL-amygdala circuit), both required for the dynamic adaptation of internal motivation to external stimuli in goal-directed behaviors (48).

Our present results underline the importance of the mouse PFC in executive processes, supporting the notion that the rodent mPFC is, to some extent, functionally homologous to the primate dorsolateral PFC (49,50). Even if highly elaborate mental processes involved in goal-directed behaviors are far more complex in humans than in rodents, they plausibly mobilize homologous sets of neurons belonging to a common global neuronal workspace (51). The use of knockout mouse models and local gene transfer coupled with fine-tuned behavioral analyses will allow future research to gain insight into the specific networks and molecular mechanisms underlying complex behaviors. Particularly, the social interaction task described here represents a valuable behavioral tool for studying decision making with constant adaptation to uncertainty. **[F]**

The authors thank Martine Soudant for excellent technical assistance. This work was supported by the Institut Pasteur, the Centre National de la Recherche Scientifique, and the Université Paris Sud XI (excellence chair to S.G.). Part of the work was funded by an Agence Nationale de la Recherche grant to S.G. (NT09_446810) and a Biocortech master grant to J.C.

REFERENCES

- Hill, J. A., Jr., Zoli, M., Bourgeois, J. P., and Changeux, J. P. (1993) Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta 2-subunit. *J. Neurosci.* **13**, 1551–1568
- Changeux, J. P., and Edelman, S. J. (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* **308**, 1424–1428
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Lena, C., Bessis, A., Lallemand, Y., Le Novère, N., Vincent, P., Pich, E. M., Brulet, P., and Changeux, J. P. (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* **374**, 65–67
- Changeux, J. P. (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 389–401
- Maskos, U. (2007) Emerging concepts: novel integration of *in vivo* approaches to localize the function of nicotinic receptors. *J. Neurochem.* **100**, 596–602
- Granon, S., Faure, P., and Changeux, J. P. (2003) Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9596–9601
- Wiklund, A., Granon, S., Cloez-Tayarani, I., Faure, P., le Sourd, A. M., Sundman, E., Changeux, J. P., and Eriksson, L. I. (2008) Sevoflurane anesthesia alters exploratory and anxiety-like behavior in mice lacking the beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Anesthesiology* **109**, 790–798
- Zoli, M., Picciotto, M. R., Ferrari, R., Cocchi, D., and Changeux, J. P. (1999) Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. *EMBO J.* **18**, 1235–1244
- Adolphs, R. Conceptual challenges and directions for social neuroscience. *Neuron* **65**, 752–767
- Amodio, D. M., and Frith, C. D. (2006) Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 268–277
- Kording, K. (2007) Decision theory: what “should” the nervous system do? *Science* **318**, 606–610
- Yoshida, W., and Ishii, S. (2006) Resolution of uncertainty in prefrontal cortex. *Neuron* **50**, 781–789
- Zahn, R., Moll, J., Paiva, M., Garrido, G., Krueger, F., Huey, E. D., and Grafman, J. (2009) The neural basis of human social values: evidence from functional MRI. *Cereb. Cortex* **19**, 276–283
- Izuma, K., Saito, D. N., and Sadato, N. (2008) Processing of social and monetary rewards in the human striatum. *Neuron* **58**, 284–294
- Deaner, R. O., Khera, A. V., and Platt, M. L. (2005) Monkeys pay per view: adaptive valuation of social images by rhesus macaques. *Curr. Biol.* **15**, 543–548
- Panksepp, J. B., and Lahvis, G. P. (2007) Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav.* **6**, 661–671
- Robbins, T. W. (1996) Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **351**, 1463–1470; discussion 1470–1461
- Besson, M., Suarez, S., Cormier, A., Changeux, J. P., and Granon, S. (2008) Chronic nicotine exposure has dissociable behavioural effects on control and beta2^{-/-} mice. *Behav. Genet.* **38**, 503–514
- Bisler, S., Schleicher, A., Gass, P., Stehle, J. H., Zilles, K., and Staiger, J. F. (2002) Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J. Chem. Neuroanat.* **23**, 187–198
- Olivio-Marin, J. C. (2002) Extraction of spots in biological images using multiscale products. *Pattern Recogn.* **35**, 1989–1996
- Paxinos, G., and Franklin, K. B. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, CA, USA
- Maskos, U., Molles, B. E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloez-Tayarani, I., Bemelmans, A. P., Mallet, J., Gardier, A. M., David, V., Faure, P., Granon, S., and Changeux, J. P. (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* **436**, 103–107
- Avale, M. E., Faure, P., Pons, S., Robledo, P., Deltheil, T., David, D. J., Gardier, A. M., Maldonado, R., Granon, S., Changeux, J. P., and Maskos, U. (2008) Interplay of beta2^{*} nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15991–15996
- Rasband, W. S. (1997–2009) *ImageJ*, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Granon, S., Save, E., Buhot, M. C., and Poucet, B. (1996) Effortful information processing in a spontaneous spatial situation by rats with medial prefrontal lesions. *Behav. Brain Res.* **78**, 147–154
- Mogensen, J., Lauritsen, K. T., Elvertorp, S., Hasman, A., Moustgaard, A., and Wortwein, G. (2004) Place learning and object recognition by rats subjected to transection of the fimbria-fornix and/or ablation of the prefrontal cortex. *Brain Res. Bull.* **63**, 217–236

27. Birrell, J. M., and Brown, V. J. (2000) Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* **20**, 4320–4324
28. Ragozzino, M. E., Detrick, S., and Kesner, R. P. (1999) Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *J. Neurosci.* **19**, 4585–4594
29. Rich, E. L., and Shapiro, M. (2009) Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *J. Neurosci.* **29**, 7208–7219
30. Gorelova, N., and Yang, C. R. (1997) The course of neural projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* **76**, 689–706
31. Vertes, R. P. (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* **51**, 32–58
32. Smith, D. V., Hayden, B. Y., Truong, T. K., Song, A. W., Platt, M. L., and Huettel, S. A. Distinct value signals in anterior and posterior ventromedial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **30**, 2490–2495
33. Moroni, M., Zwart, R., Sher, E., Cassels, B. K., and Bermudez, I. (2006) alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol. Pharmacol.* **70**, 755–768
34. Mameli-Engvall, M., Evrard, A., Pons, S., Maskos, U., Svensson, T. H., Changeux, J. P., and Faure, P. (2006) Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* **50**, 911–921
35. Floresco, S. B., Zhang, Y., and Enomoto, T. (2009) Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Res.* **204**, 396–409
36. Ito, M., and Doya, K. (2009) Validation of decision-making models and analysis of decision variables in the rat basal ganglia. *J. Neurosci.* **29**, 9861–9874
37. Granon, S., Poucet, B., Thinus-Blanc, C., Changeux, J. P., and Vidal, C. (1995) Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology (Berl.)* **119**, 139–144
38. Everitt, B. J., and Robbins, T. W. (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* **48**, 649–684
39. Sarter, M., and Bruno, J. P. (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **23**, 28–46
40. Ross, R. S., McGaughy, J., and Eichenbaum, H. (2005) Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. *Learn. Mem.* **12**, 302–306
41. Howe, W. M., Ji, J., Parikh, V., Williams, S., Mocaer, E., Trocme-Thibierge, C., and Sarter, M. (2010) Enhancement of attentional performance by selective stimulation of alpha4beta2(*) nAChRs: underlying cholinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1391–1401
42. Mansvelder, H. D., Mertz, M., and Role, L. W. (2009) Nicotinic modulation of synaptic transmission and plasticity in cortico-limbic circuits. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **20**, 432–440
43. Couey, J. J., Meredith, R. M., Spijker, S., Poorthuis, R. B., Smit, A. B., Brussaard, A. B., and Mansvelder, H. D. (2007) Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron* **54**, 73–87
44. Ballesteros-Yanez, I., Benavides-Piccione, R., Bourgeois, J. P., Changeux, J. P., and DeFelipe, J. Alterations of cortical pyramidal neurons in mice lacking high-affinity nicotinic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 11567–11572
45. Lambe, E. K., Picciotto, M. R., and Aghajanian, G. K. (2003) Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **28**, 216–225
46. Tolu, S., Avale, M. E., Nakatani, H., Pons, S., Parnaudeau, S., Tronche, F., Vogt, A., Monyer, H., Vogel, R., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Changeux, J. P., and Maskos, U. (2010) A versatile system for the neuronal subtype specific expression of lentiviral vectors. *FASEB J.* **24**, 723–730
47. Del Arco, A., and Mora, F. (2009) Neurotransmitters and prefrontal cortex-limbic system interactions: implications for plasticity and psychiatric disorders. *J. Neural Transm.* **116**, 941–952
48. Sesack, S. R., and Grace, A. A. (2010) Cortico-basal ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* **35**, 27–47
49. Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., and Kolb, B. (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* **146**, 3–17
50. Granon, S., and Poucet, B. (2000) Involvement of the rat prefrontal cortex in cognitive functions: a central role for the prelimbic area. *Psychobiology* **28**, 229–237
51. Dehaene, S., Kerszberg, M., and Changeux, J. P. (1998) A neuronal model of a global workspace in effortful cognitive tasks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14529–14534

Received for publication December 13, 2010.

Accepted for publication March 3, 2011.

Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment

Jonathan Chabout^{1,9}, Pierre Serreau^{1,2,9}, Elodie Ey³, Ludovic Bellier¹, Thierry Aubin⁴, Thomas Bourgeron³, Sylvie Granon^{1*}

1 Centre de Neurosciences Paris Sud, Team “Neurobiologie de la Prise de Décision”, Université Paris Sud 11 & CNRS UMR 8195, Orsay, France, **2** Institut Pasteur, “Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques” Unit, CNRS URA 2182, Paris, France, **3** Institut Pasteur, “Génétique Humaine et Fonctions Cognitives” Unit, CNRS URA 2182, Paris, France, **4** Centre de Neurosciences Paris Sud, Team “Communication Acoustique”, Université Paris Sud 11 & CNRS UMR 8195, Orsay, France

Abstract

Social interactions in mice are frequently analysed in genetically modified strains in order to get insight of disorders affecting social interactions such as autism spectrum disorders. Different types of social interactions have been described, mostly between females and pups, and between adult males and females. However, we recently showed that social interactions between adult males could also encompass cognitive and motivational features. During social interactions, rodents emit ultrasonic vocalizations (USVs), but it remains unknown if call types are differently used depending of the context and if they are correlated with motivational state. Here, we recorded the calls of adult C57BL/6J male mice in various behavioral conditions, such as social interaction, novelty exploration and restraint stress. We introduced a modulator for the motivational state by comparing males maintained in isolation and males maintained in groups before the experiments. Male mice uttered USVs in all social and non-social situations, and even in a stressful restraint context. They nevertheless emitted the most important number of calls with the largest diversity of call types in social interactions, particularly when showing a high motivation for social contact. For mice maintained in social isolation, the number of calls recorded was positively correlated with the duration of social contacts, and most calls were uttered during contacts between the two mice. This correlation was not observed in mice maintained in groups. These results open the way for a deeper understanding and characterization of acoustic signals associated with social interactions. They can also help evaluating the role of motivational states in the emission of acoustic signals.

Citation: Chabout J, Serreau P, Ey E, Bellier L, Aubin T, et al. (2012) Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment. PLoS ONE 7(1): e29401. doi:10.1371/journal.pone.0029401

Editor: Gemma Casadesus, Case Western Reserve University, United States of America

Received: July 18, 2011; **Accepted:** November 28, 2011; **Published:** January 6, 2012

Copyright: © 2012 Chabout et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors have no support or funding to report.

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

* E-mail: sylvie.granon@u-psud.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Social approach is one of the most basic behavioral components of all social interactions. However, the initial motivation to approach a conspecific may be independent of territory defence or mating behavior. This has been shown in juvenile mice [1] and in adult male-male interactions, when occurring in a novel environment [2,3].

One of the critical questions is to determine what the motivations behind such social approaches are and which behavioral and neurobiological mechanisms support them. Indeed, it remains currently unclear whether social approach or social proximity, when not associated to territory defence and a reproductive motivation, also impart a reward value [4].

Social interactions are frequently associated with species-specific vocalizations to transmit different types of information that may concern individual characteristics (age, sex, body size), but also the individual's emotional states and/or its social status. Rodents emit ultrasonic vocalizations -USVs- that have been mostly studied in pups as a response to maternal separation [5], or stressor exposure

[6,7], and in adults in response to stressful [8,9], or pleasurable events [8,10]. Furthermore, in rats, high frequency modulated USVs carry reward-related and positive social information [10]. This issue is nevertheless much less studied in mice and thus debatable [11]. Although it has long been believed that USVs are not emitted during male-male agonistic encounters, a recent study showed that, when placed in the home cage of another male, C57BL/6 male mice emit different types of USVs [12]. During the brief period of the resident-intruder experiment (3 minutes), a social hierarchy between the two animals was not established. Dyads were involved in “affiliative behaviors” with concomitant emission of USVs, although this task is highly stressful for intruders [13].

When animals are not focused on behavioral responses leading to reinforcements, which would be the case in conditioning or in spatial learning tasks, it is difficult to capture and identify which element(s) in the environment they use to make choices. In order to identify such elements we previously designed a social interaction task in which we can manipulate two competing motivations: the one for social contact and the one for novelty

exploration [2,3,14,15]. This experimental protocol allows the study of the establishment of social interactions in adult males, without any notion of mating and with limited aggressiveness, if any. The aim of the present study is to address how behavioral context influences the vocal behavior of adult male mice during social interaction tasks (SIT) and non-social tasks (novelty exploration and restraint stress). We also evaluated the impact of social reward modulation by prior isolation or group housing on USVs features.

Materials and Methods

Ethics Statement

The animals were treated according to the ethical standards defined by the Centre National de la Recherche Scientifique for animal health and care in strict compliance with the EEC recommendations (n°86/609). All efforts were made to minimize animal discomfort and to reduce the number of animals used. We tested 64 C57BL/6J mice purchased from Charles Rivers Laboratories France (L'Arbresle Cedex, France). They were 11 to 12 weeks old at their arrival and remained stabulated in a standard rearing facility in collective cages (4 to 5 animals per cage) during one week before any experiment. Room ventilation, temperature and humidity were controlled with a 12/12 light-dark cycle (light on at 8:00 am). They received standard chow and water *ad libitum*. For the two "isolated" experimental conditions mice were thereafter placed in individual cages three weeks before the experiment while animals from other experimental groups remained in collective cages.

Behavioral procedures

Behavioral apparatus & protocols. We combined the recording during SIT and novelty exploration within the same protocol as described hereafter. The SIT condition was conducted as described previously [2,14]. Animals were 15 weeks old at testing day. The day of the experiment each animal was allowed to visit alone the novel environment for 30 minutes consisting of a transparent Plexiglas cage containing fresh bedding (50 cm×30 cm×30 cm) placed in an unfamiliar quiet room. The experimental cage was situated on a table, under a numeric video camera connected (Hercules®) to a computer (recording at 33 frames per sec). Light was set at 100 Lux by undirected bulbs. USVs were recorded during the first 4 minutes of this exploration/habituation phase ("exploration" condition). After habituation, the "visitor" animal was gently introduced in the cage. "Visitors" were male mice unknown from the tested mouse, of the same age from the same strain. "Visitors" had always been maintained in social cages. Frequency and duration of social contacts and USVs were recorded for 4 minutes. At the end of the experiment, animals were placed back in their respective home cage. Each dyad was used only once. The restraint stress condition ("restraint" condition) was also conducted in an unfamiliar quiet room. Mice were placed for 10 minutes in a 50 ml Falcon® tube opened at one end to allow breathing. The Falcon® tube was fixed in an empty opaque cage to avoid rolling movement. In all conditions, the experimenter was out of sight of the animals.

Five conditions were then examined in five independent groups (Figure 1A):

- 1- SIT with mice isolated before the experiment ("SIT-isolated", n = 17)
- 2- SIT with mice maintained in group (4 animals per cage) before the experiment ("SIT-grouped", n = 8)
- 3- Novelty exploration with: mice isolated before the experiment ("Explo-isolated", n = 15)

4- Novelty exploration with mice maintained in group (4 animals per cage) before the experiment, ("Explo-grouped", n = 8).

5- Restraint stress with mice maintained in group (4 to 5 animals) cages ("Restraint", n = 16).

Behavioral analysis in SIT. In SIT condition, we scored the duration and number of social contacts and analysed the behavioral sequences between the two conspecifics for four minutes. Within the social contacts, we discriminated different subtypes: Oro-oral, oro-flank, oro-genital and others (which included flank-flank, genital-genital).

Ultrasonic vocalization Recording. A condenser ultrasound microphone Polaroid/CMPA was placed above the experimental chamber, high enough so that the receiving angle of the microphone covered the whole area of the test cage or attached to a tripod in front of the tube containing the restrained mice. It was connected to an ultrasound recording interface Ultrasound Gate 416H, which was itself plugged into a personal computer equipped with the recording software Avisoft Recorder USG (Sampling frequency: 250 kHz; FFT-length: 1024 points; 16-bits). All recording hardware and software were from Avisoft Bioacoustics® (Berlin, Germany).

Acoustic variables. For all behavioral conditions USVs were analysed off line with SASLab Pro (Avisoft Bioacoustic®, Berlin, Germany). Spectrograms were generated for each detected call (Sampling frequency: 250 kHz; FFT-length: 1024 points; 16-bit; Blackman window; overlap: 87.5%; time resolution: 0.512 ms; frequency resolution: 244 Hz). Audio recordings were disturbed by the background noise originating from the animals moving and/or digging in the fresh bedding. We nevertheless kept the bedding because social interactions may have been affected by its absence and we wanted to match as closely as possible to our classical experimental conditions [2].

We recorded the total number of calls emitted by each pair of mice during SIT, and manually measured different variables related to peak frequency (Pf_{start} [peak frequency at the beginning of the call], Pf_{end} [peak frequency at the end of the call], Pf_{min} [minimum peak frequency], Pf_{max} [maximum peak frequency]) for each call. We categorized the waveform pattern of each call as belonging to one of ten distinct categories based on their duration and frequency modulation (adapted from [5,8,12,16]). We calculated the proportion of each call category for each pair of mice in SIT and for each individual mouse in other conditions.

The ten categories illustrated in Figure 1C were:

1. Short: ≤ 50 ms and ≤ 10 kHz frequency modulation.
2. Flat: ≥ 50 ms and ≤ 10 kHz frequency modulation.
3. One frequency jump: instantaneous frequency step, like a vertical discontinuity with no time gap.
4. Multiple frequency jumps: multiple instantaneous frequency step.
5. U: U-shape wave ≥ 10 kHz frequency modulation.
6. Chevron: inverted-U shape ≥ 10 kHz frequency modulation.
7. Modulated: ≥ 10 kHz of modulation, several decreases and increases in frequency.
8. Composite: two or more components emitted simultaneously.
9. Upward: continuous increase in peak frequency ≥ 10 kHz frequency modulation.
10. Downward: continuous decrease in peak frequency ≥ 10 kHz frequency modulation.

Synchronization of audio and video files. We performed a "clap" with finger in the field of the camera to time-matched video

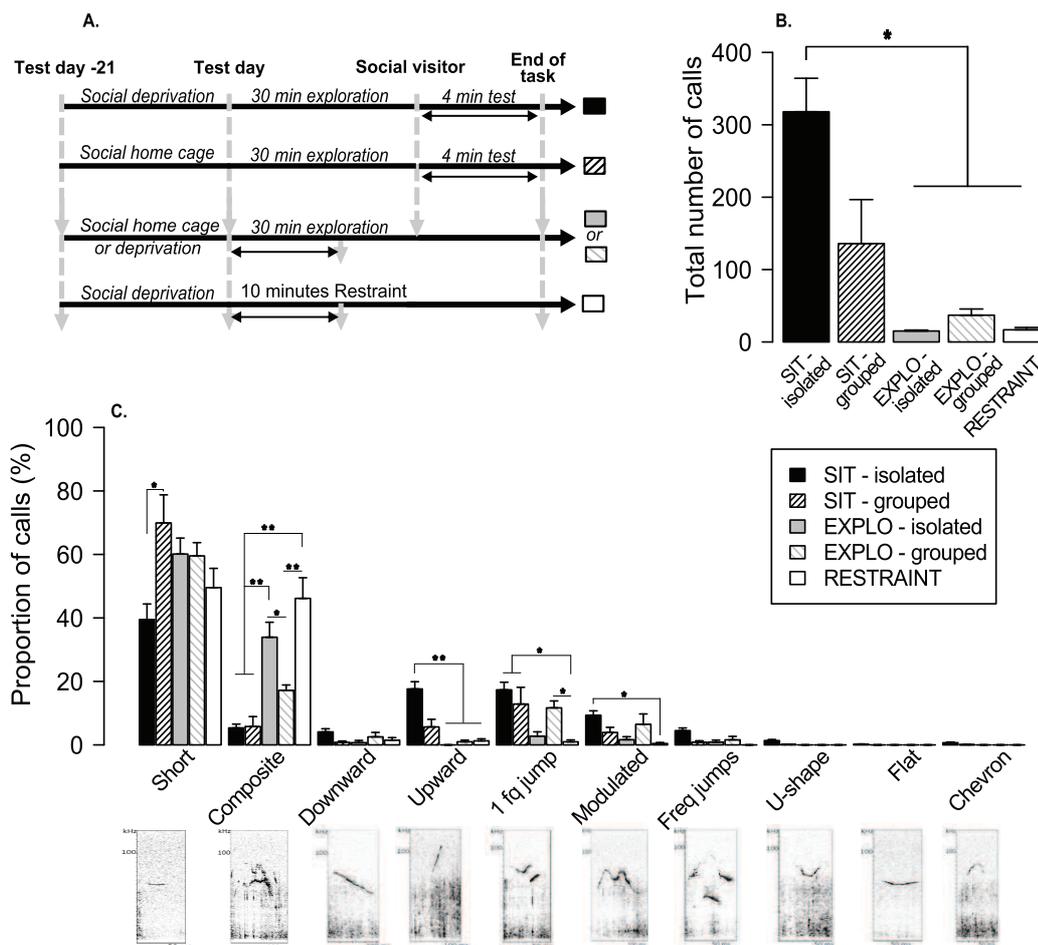


Figure 1. Number of calls and vocal repertoire uttered in five behavioral contexts. A- Calls were recorded during social interaction task, novelty exploration, and restraint stress and analyzed off line. B- Total number of calls emitted in 4 minutes: SIT-isolated ($n = 17$), SIT-grouped ($n = 8$), EXPLO-isolated ($n = 15$), EXPLO-grouped ($n = 8$) and RESTRAINT ($n = 16$). C- Distribution and spectrograms of the ten call types typically emitted by adult male mice. Data not shown, proportion of “other” calls: $1.4 \pm 0.8\%$ in SIT-isolated, $4.5 \pm 1.3\%$ in SIT-grouped, $9.5 \pm 4.1\%$ in EXPLO-grouped, $3.1 \pm 1.3\%$ in EXPLO-isolated and $16.3 \pm 3.1\%$ in Restraint stress. (Time and frequency criterion were used to distinguish these categories, see methods). Data are presented as means \pm SE. *: $p < 0.005$; **: $p < 0.0001$ for chi-square and Mann-Whitney paired comparisons. doi:10.1371/journal.pone.0029401.g001

and audio files. In the audio files, we cut the information before this sound, and in the video files we selected the exact frame of this event and started from this point. This manual synchronization permitted us to analyse which USVs were emitted during contact and non-contact events. We then further classified contact events in four categories (see above): Oro-oral, Oro-flank, Oro-genital and others.

Statistical analyses

Kruskal & Wallis non parametric tests were used for behavioral variables and USVs quantitative (number of calls) and qualitative (acoustic variables) variables in each of the five conditions. Correlation data were analysed with a Spearman correlation test between behavioral measures and number of calls uttered within each category. Dependent variables (contact versus non-contact repartitions of calls) were analysed with Wilcoxon signed-rank test. The significance threshold was set at $p < 0.05$. Post Hoc comparisons were performed using Mann-Whitney non parametric tests or Chi-square test (noted χ^2) only when appropriate (Statview software; computing and statistical software R [17]). For all post-hoc paired comparisons a Bonferroni correction was

applied because of the number of test repetitions, therefore setting the significance threshold at $p < 0.005$.

Results

In the current experiments, all mice emitted USVs in all conditions.

Mouse USV emissions are context dependent

We first quantified the amount of USVs emitted in the five different conditions tested. There was a major group effect in the number of calls emitted by adult male mice (Figure 1B & Table S1A; $H_4 = 34.303$, $P < 0.0001$). Post-hoc comparisons showed that mice in both SIT conditions emitted significantly more calls than mice in all other conditions (Table S1). In social context, mice previously isolated (SIT-isolated) tended to emit more calls than mice housed in groups (SIT-grouped), but it was not significant after correction for multiple testing ($U = 29.5$, $P = 0.024$).

We then examined the composition of the vocal repertoire in the five behavioral conditions. In all conditions, a limited proportion of call-like spectrograms (“others”) could not be

classified because of the background noise and a non discriminable shape. These “calls” were thus not included in the calculation and analyses performed thereafter (**Figure 1C & Table S1 B–K**).

Male mice emitted a large variety of calls during social and exploratory behaviors, while restraint mice show a narrower repertoire, principally composed of “short” and “composite”. Indeed restraint mice emitted more “composite” than both SIT mice (For SIT-isolated: $X^2 = 38.53$, $P < 0.0001$, for SIT-grouped: $X^2 = 31.87$, $P < 0.0001$) and EXPLO-grouped ($X^2 = 17.22$, $P < 0.0001$), less “upward” than SIT-isolated ($X^2 = 14.14$, $P < 0.0001$), less “one frequency jump” than both SIT (SIT-isolated: $X^2 = 14.99$, $P = 0.0001$, SIT-grouped: $X^2 = 10.07$, $P = 0.0015$), and less “modulated” than SIT-isolated ($X^2 = 8.11$, $P = 0.004$).

“Short” calls were the most uttered calls for all experimental conditions. SIT-isolated mice emitted less “short” than SIT-grouped (**Figure 1C**: $X^2 = 8.46$, $P = 0.003$) and used a largest vocal repertoire (i.e. all call types were represented). Specifically, SIT-isolated had a higher proportion of “upward” (compared with EXPLO-isolated: $X^2 = 17.62$, $P < 0.0001$; EXPLO-grouped: $X^2 = 14.87$, $P = 0.0001$ and Restraint: $X^2 = 14.14$, $P = 0.0001$), “one frequency jump” (for Restraint; $X^2 = 14.99$, $P = 0.0001$), “modulated” (for Restraint; $X^2 = 8.11$, $P = 0.004$). Additional categories of calls like “upward”, “flat”, “chevron” and “U-shape” emerged and the proportion of “composite” calls was relatively low (**Figure 1C & Table S1 B–J**). In some contexts, several call types were completely absent. For instance, “flat”, “chevron” and “U-shape” call types were not recorded during exploration (whether animals were isolated or not), and “multiple frequency jumps”, “U-shape”, “flat” and “chevron” calls were not recorded in the restraint condition. Interestingly, the repertoire did not vary significantly according to the housing condition (isolated vs. grouped), except for “short” during SIT and “composite” during Exploration.

Mouse USV acoustic features are context dependent

In order to better characterize the acoustic features of the USVs we analysed in depth their duration and their peak frequency

related variables. There was a significant condition effect in the total call duration (group effect, $H_4 = 36.51$; $p < 0.0001$; **Figure 2A & Table S2 A**). Call duration was the longest for SIT-isolated mice ($U = 112$; $p < 0.0001$ for SIT-grouped, $U = 120$; $p = 0.00147$ for Explo-isolated, $U = 245$; $p < 0.001$ for Explo-grouped and $U = 234$; $p = 0.002$ for restraint) and the shortest for Explo-isolated mice ($U = 112$; $p = 0.0002$ for SIT-grouped, $U = 16$; $p < 0.001$ for Explo-grouped and $U = 18$; $p < 0.0001$ for Restraint; **Table S2A**). Since this result might be due to presence of long calls emitted by SIT-isolated mice, we investigated in more details the duration of each call type separately to take into account the effect of the vocal repertoire. SIT-Isolated mice showed longer “short” calls than EXPLO-isolated ($U = 248$; $p < 0.0001$), longer “composite” calls than all the other condition ($U = 93.5$; $p = 0.0042$; for SIT-grouped, $U = 118$; $p < 0.0001$ for EXPLO-grouped, $U = 221$; $p < 0.0001$ for EXPLO-isolated, $U = 238$; $p < 0.0001$ for Restraint), and longer “one frequency jump” than EXPLO-grouped ($U = 101$; $p = 0.0014$) (**Figure 2B & Table S2 B–F**).

There was a group effect in the peak frequency (Pf min: $H_4 = 42.82$, $P = < 0.0001$; Pf max: $H_4 = 38.47$, $P = < 0.0001$; Pf start: $H_4 = 42.34$, $P = < 0.0001$; Pf end: $H_4 = 44.50$, $P = < 0.0001$, **Figure 2C & Table S3 A–D**), which was still valid when calls types were considered separately (“short” and “composite” calls; **Figure S1**). Mice tested in SIT emitted calls between 62 kHz \pm 1.3 (Pf min) and 77 kHz \pm 1.8 (Pf max) with a significant difference between “SIT-isolated” and exploration or restraint condition for all parameters (**Table S3 A & B**), whereas mice exploring the novel environment emitted calls between 40 kHz \pm 2.4 (Pf min) and 55 kHz \pm 3.5 (Pf max) with no significant difference between “Explo-isolated” and “Explo-grouped” conditions. Mice in restraint stress condition emitted calls between 30 kHz \pm 2.7 (Pf min) and 48 kHz \pm 1.8 (Pf max). For minimum peak frequency mice in restraint stress condition emitted calls significantly lower than all other conditions (see **Table S3 A–D**). Housing condition did not influence the peak frequency variables for mice tested during social interaction or exploration (see **Table S3**).

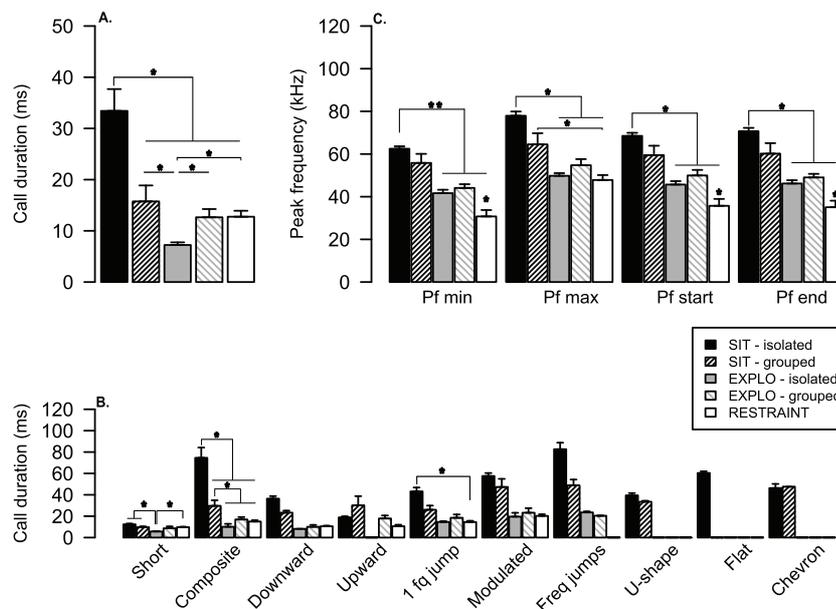


Figure 2. Acoustic characteristics of calls emitted in five behavioral contexts. A- Calls durations in all conditions. B- Calls durations for all call types in all conditions. C- Frequency features (“min”, “max”, “start” and “end” frequencies) of calls in all conditions. Data are presented as means \pm SE. *: $p < 0.005$; **: $p < 0.0001$ for Mann-Whitney paired comparison. doi:10.1371/journal.pone.0029401.g002

Isolation or group housing influences social and vocal behaviors

We analysed the correlation between the emission of the calls and the social interactions in SIT-isolated and SIT-grouped mice. The total number of calls and duration of social contacts were significantly and positively correlated in the SIT-isolated condition ($r_s = 0.778$, $n = 17$, $P = 0.0001$) but not in the SIT-grouped condition ($r_s = 0.102$, $n = 8$, $P = 0.81$). In the remaining analyses we focused on the most uttered calls, namely “short”, “one frequency jump” and “upward” calls. For mice in SIT-isolated condition, there was a strong positive correlation between the duration of social contacts and the number of “short” and “one frequency jump” calls (respectively $r_s = 0.749$, $n = 17$, $P = 0.0003$; $r_s = 0.601$, $n = 17$, $P = 0.0094$). In contrast, in SIT-grouped condition there was no evidence for correlation between these call types and the duration of social contact (“Short”: $r_s = 0.120$, $n = 8$, $P = 0.787$, NS; “one frequency jump”: $r_s = 0.044$, $n = 8$, $P = 0.922$, NS; “Upward”: $r_s = 0.119$, $n = 8$, $P = 0.788$, NS) (Figure 3).

We then examined more closely the behaviors in which “short”, “one frequency jump” and “upward” calls were uttered. SIT-isolated mice emitted the majority of their calls during contact (Figure 4, left panel): Approximately 80% of “short”, “one frequency jump” and “upward” call types were uttered during contact while only 20% were emitted when both mice were apart (respectively $z = -3.24$, $P = 0.0012$; $z = -2.82$, $P = 0.0048$; $z = -2.84$, $P = 0.0045$, Figure 4, left panel). A deeper analysis of the types of contact showed that mice previously isolated uttered

the 3 main call types equally during oro-oral, oro-side and oro-genital contacts.

We did not observe the same distribution in SIT-grouped mice (Figure 4, right panel) since “short”, “one frequency jump” and “upward” calls were emitted mostly when mice were apart (“short”: $z = -1.09$, $P = 0.271$; “one frequency jump”: $z = -1.36$, $P = 0.173$; “upward”: $z = -0.73$, $P = 0.463$, Figure 4, right panel). During contact more than 50% of the calls were uttered during oro-genital sniffing.

Discussion

The present study investigates in details the vocal behavior of adult male mice during a same-sex social interaction task, as well as in two non-social tasks (i.e., novelty exploration and restraint stress). We first showed that the number of calls emitted as well as a number of frequency parameters varied according to the behavioral context of emission. As expected, adult male mice emitted USVs in the social interaction task, but, remarkably, they also emitted some USVs in non-social tasks. Finally, housing conditions, which act as a modulator for social motivation, also appeared to influence vocal behavior during social interactions task and more unexpectedly also during exploration task.

Like rats, mice emit context-specific USVs

It's commonly known that rodents emit vocalizations particularly in presence of conspecifics [1,5,10,12,18–22]. These paradigms are,

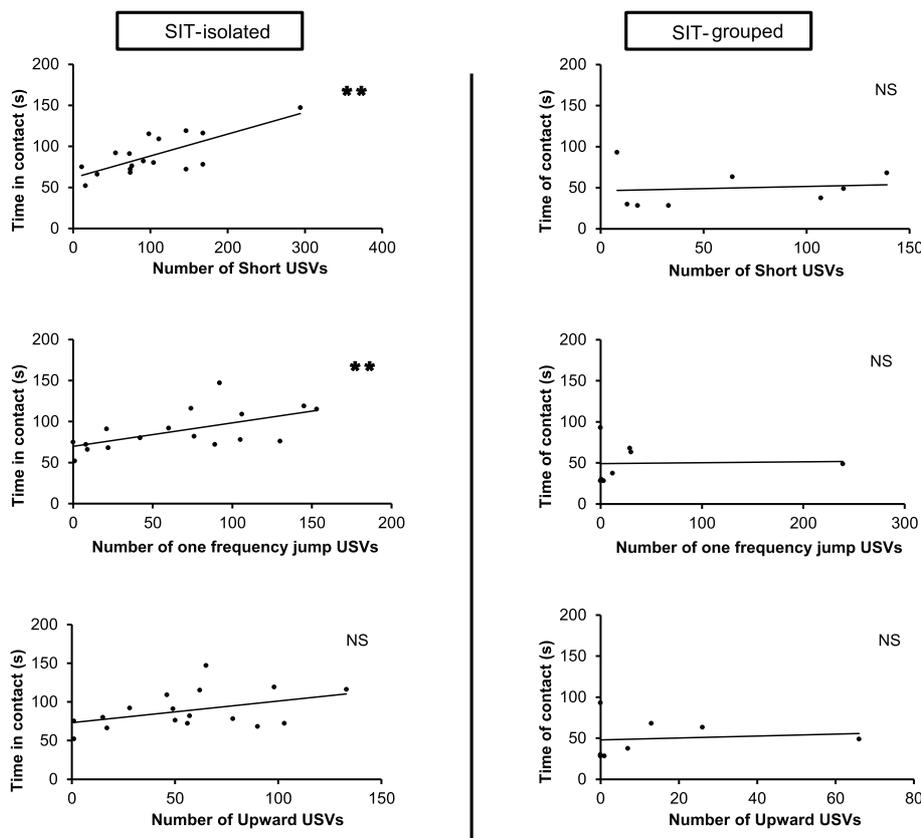


Figure 3. Correlation between behavioral contexts and calls emission. Correlation between the number of calls of the 3 main categories (“Short”, “Jump” and “Upward”) and duration of contact during social interaction in isolated or non-isolated mice. **: $p = 0.005$ for Spearman rank correlation test and NS: $p > 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0029401.g003

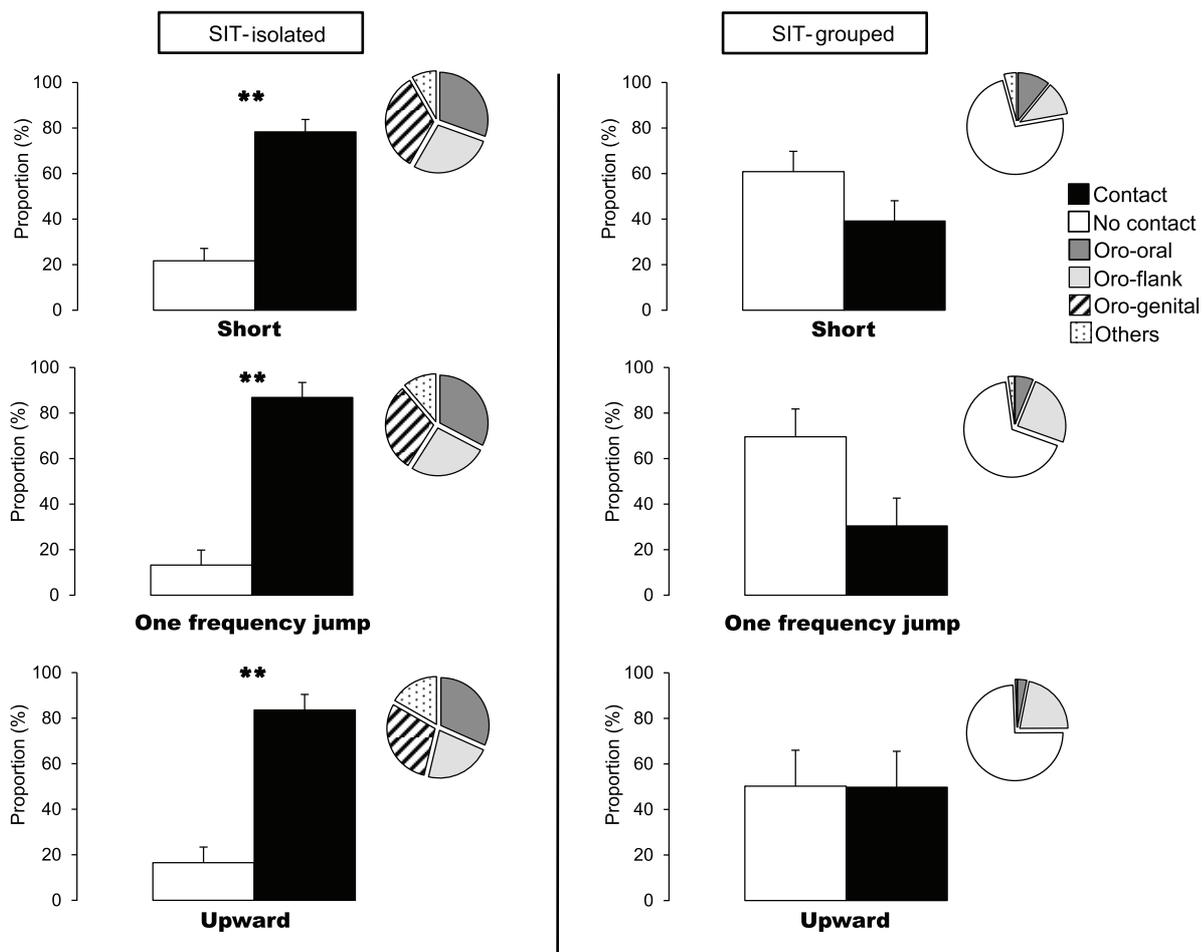


Figure 4. Behavioral contexts associated with calls emission during social interactions in isolated and non-isolated mice. Proportion of calls emitted during contacts and independently of social contact. Inset proportion of social contacts types (oro-oral sniffing, oro-flank sniffing, oro-genital sniffing and other contact) associated with the emission of the 3 main calls types (short, jump and upward). Data are presented as Means \pm SE, **: $p < 0.005$ for Wilcoxon signed-rank test. doi:10.1371/journal.pone.0029401.g004

for the most of them, associated to a social condition with direct cues (presence of conspecifics) or indirect cues (urine presentation, playback emission). It was suggested in the literature that mice would not produce USVs during aversive situations such as physical restriction or electric shock [11]. However in rats, several authors reported the recording of calls during various non-social conditions, including aversive situations or aggressive behavior [23–27]. Here we report for the first time in adult male mice the recording of USVs in different non-social contexts, such as exploration of a novel environment or restraint stress. Indeed male mice emitted calls during novelty exploration, whether they were previously maintained isolated or not, even though the total number of calls emitted during exploration was significantly lower than during SIT. The function of these USVs in novelty exploration remains to be investigated (related with a rewarding behavior, expression of anxiety...). It might be interesting to examine these calls in mouse models for autism spectrum disorders or for speech disorders (such as *FoxP2* mice for example, see [16]). Comparing the emission of such apparently “non-social” USVs between mutant and wild-type mice should allow differentiating between global impairments in emission of all types of ultrasonic signals and specific deficits in the emission of social ultrasonic signals.

The amount of calls was different between non-social and social situations. The social interaction task triggered the largest amount of USVs, which represented much more calls than the double of those recorded in the exploration or restraint conditions. This suggests that we did not simply record more calls because we tested two mice together. In SIT, we recorded from a dyad of mice, and thus cannot take for certain that only the isolated mouse vocalized. However, the restraint stress condition elicited very few calls, while the novelty exploration condition elicited an intermediate number of calls. This increasing number of calls emitted might reflect the increasing positive emotional state in these contexts, from a stressful situation (restraint stress; negative emotional state), to a neutral context eliciting limited anxiety (novelty exploration), and to a context eliciting a positive emotional state (social interactions; Figure 5). These results suggest that mice’s USVs are used predominantly as social signals, but they can be secondarily used in contexts not directly involving a conspecific. Whether the later USVs are still directed to a potentially remote conspecific (despite the limited propagation of USVs at a relatively high frequency) remains to be examined.

We also showed that the vocal repertoire was different between paradigms. Mice uttered “short” and “composite” calls in all

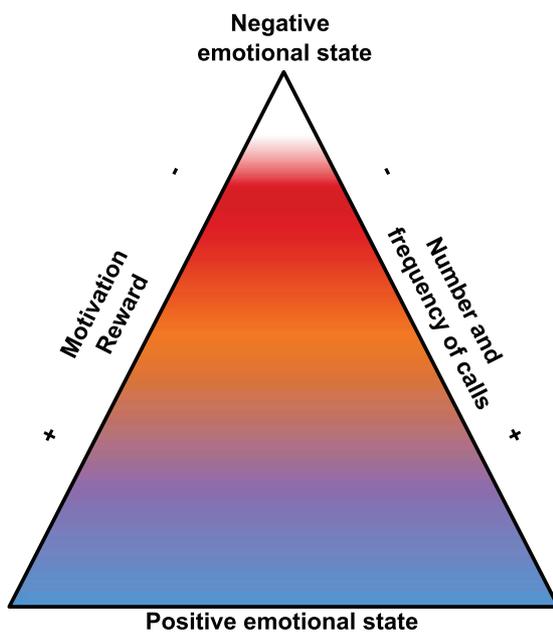


Figure 5. Interpretative schema of involvement of calls in motivational/emotional process. Proposition of the link between parameters of the calls and motivational/emotional processes in adult male mice. doi:10.1371/journal.pone.0029401.g005

paradigms. However, mice in the SIT used a richer repertoire, with more “upward”, “multiple frequency jumps”, “U-shape”, “flat” and “chevron” calls than mice in the other non-social paradigms. “short” and “composite” calls may therefore represent “basic” call types found in any behavioral contexts, while other calls may be more “informative” of the behavioral, emotional or motivational content of a situation. In restraint stress, mice emit principally “basic” calls of lower frequency, which might be similar to the 22 kHz alarm calls emitted by rats in aversive context [23,26,28]. However, the 22 kHz calls of rats appeared more stereotyped (in terms of frequency modulations at least) [27] in comparison with the “basic” calls observed in restrained mice (without footshock), underlying subtle differences in these signals between rats and mice.

Calls emitted in a social interaction task were longer in comparison with calls emitted in other non-social situations. In addition, high frequency calls were recorded in the social interaction task, while the lowest frequency calls were recorded in the stressful situation. During signal evolution, different pressures may arise in signal design depending on whether it is specialized to advertise or privatize information [29]. Thus, it is possible that calls emitted in social situations correspond to a “private” information, transmitted at short-range, as high frequencies propagate less than lower ones. Conversely, calls emitted in stressful situations, lower in frequency, should be “public” signals advertising to a wide audience at long-range.

Therefore, these frequency changes dependent of the context seem to be common to different species in which the motivational or emotional states induce prosodic changes (e.g., rats, humans, birds [7,10,23,24,27,28,30–33]). In the present study, significant frequency variations were highlighted between positive and negative motivational states. Differences related to the gradation within a positive arousal state (high arousal/motivation after social isolation and lower arousal/motivation after group housing in the

SIT) were more subtle but still significant, similarly to variations related to the degree of arousal in several species [34–36]. In these species, whether negative or positive, a higher arousal was related to higher frequency characteristics. Therefore, within a positive arousal state, the gradation is encoded similarly from mice to primates. The expression of arousal gradation in mice within a negative arousal state remains to be examined. These findings could then be applied in mouse models for autism spectrum disorders or speech disorders to check their abilities to encode arousal degree in their ultrasonic signals. In line with this reasoning, our results, obtained while recording a dyad of mice, suggest that it is mostly the mouse previously isolated -SIT isolated- which emit the most part of the USVs, as social contact constitutes a positive rewarding situation associated with high frequency calls. However, we cannot exclude the other mouse of the dyad to contribute to the USVs recorded.

Past social experiences influence social interaction and vocalization behavior

We previously showed [3] that when no animal of a dyad is isolated prior to the SIT the duration of social contact is significantly lower than when one animal of the dyad is previously isolated. In the latter case, increasing the social motivation in one mouse alters the duration of social contact within the dyad. Our present results highlight the influence of the housing conditions before the tests on USVs emission. Housing conditions act as a modulator of the motivational state of the animal: mice previously isolated are more motivated to interact with a conspecific in comparison with mice which were previously housed in groups. These data would fit with previous works showing that social reward strongly modulates the emission of USVs [1,30,34,37,38] and that socially experienced male mice produce fewer syllables than inexperienced ones [22]. Animals have to be motivated for social contact (by previous social isolation in our case) and have to be rewarded by such contact to emit calls [1]. USVs emitted by adult male mice, with specific acoustic features associated with social contact, may therefore reflect social utility, not necessarily related with reproductive [11] or aggressive purposes.

A high social motivation also seems to generate a significant correlation between the number of calls and the duration of contact. In SIT-isolated mice, more than 80 per cent of the three main call types were emitted during contact. This was not the case for SIT-grouped mice, suggesting that the motivation of one animal of the dyad for engaging in a social interaction is a positive modulator of the emission of USVs. Our results extended what has been found in adolescent and female mice for which the number of calls was positively correlated to the time spent in social investigation [18,37]. Social motivation also appeared to modulate the duration of the calls, but the direction of the effect varied according to the paradigm used. Indeed, within the SIT, mice previously isolated emitting longer calls than mice previously maintained in groups. In contrast, within the novelty exploration context, mice previously isolated emitting shorter calls than mice previously maintained in groups. The reason and the mechanisms of the influence of social motivation in the novelty exploration context remain to be investigated.

Caveats and perspectives

The main caveat of our current study is to be unable to discriminate which of the two mice vocalized during social interaction, or whether both of them did. We ruled out using devocalization to examine the quantitative contribution of both mice to the detected calls since this intervention would certainly perturb the social interactions. We never, or very rarely, recorded

overlapping calls (in the “composite” class only), which would show without any doubt that both mice vocalized at the same time. However, they could also vocalize at different times. Without an individual vocal signature or a way to estimate -either visually or by mathematical method- which of them vocalize, we have to consider them as a dyad, like other authors do [12,39–42]. Only recently are studies investigating kinship and individual specificity as well as call convergence in ultrasonic vocalizations [43,44]. More specifically on individual signatures, Hoffmann and colleagues [43] focused on courtship vocalizations of wild house mice and highlighted signatures for individuality only in a few call types, with some overlap between individuals. However, limitations of this acoustical method for discriminating caller identity might come from three points. First, individuality in laboratory mice might be much more limited in comparison with wild house mice given their relative genetic homogeneity. Second, a vocal signature may be identified in some call types but not others. Third, call individuality might be different between the different paradigms (male courtship versus same sex social interaction). According to these promising results, future studies should concentrate on a refinement of the acoustic analyses and on the development of other methods (e.g., video analyses, signal analysis with triangulation).

We proposed here a first insight in the involvement of emotional and motivational individual states on the emission of ultrasonic vocalizations in adult male mice and a way to understand how these calls could be related to social behaviors. This framework is important to explore the mouse models of social disorders such as autism spectrum disorders, that in some cases, display impaired social and acoustic communication skills [5,15,45–47]. The temporal sequence of these two types of signals should allow to determine whether calls are emitted at the beginning (initiation of

contact), or throughout the interaction (maintenance of contact). New paradigms including playback experiments should also provide information on whether mice distinguish the saliency of calls (broadcasted in unexpected situations) and whether mice discriminate the emotional content of calls.

Supporting Information

Figure S1 Details of peak frequency (min, max, start and end) for each call. Representation of the four peak frequencies for each calls types in the five different conditions. (EPS)

Table S1 Details of statistical results for group effects and for paired comparisons of total number of calls for each call types in the five different conditions. (DOCX)

Table S2 Details of statistical results for group effects and for paired comparisons of call duration for each call types in the five different conditions. (DOCX)

Table S3 Details of statistical results for group effects and for paired comparisons in each peak frequency in the five different conditions. (DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC PS SG LB. Performed the experiments: JC PS LB. Analyzed the data: JC PS EE. Contributed reagents/materials/analysis tools: SG TA EE. Wrote the paper: JC PS SG EE TB.

References

- Panksepp JB, Lahvis GP (2007) Social reward among juvenile mice. *Genes, brain, and behavior* Oct;6(7): 661–71.
- Granon S, Faure P, Changeux J-P (2003) Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Aug;100(16): 9596–601.
- Avale ME, Chabout J, Pons S, Serreau P, De Chaumont F, et al. (2011) Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* Mar;(1): 1–11.
- Trezza V, Damsteegt R, Achterberg EJM, Vanderschuren IJM (2011) Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* Apr 27;31(17): 6362–70.
- Scattoni ML, Gandhi SU, Ricceri L, Crawley JN (2008) Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PLoS one* Jan;3(8): e3067.
- Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RKW (2008) Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience letters* Apr 11;435(1): 17–23.
- Bollen B, Bouslama M, Matrot B, D’Hooge R, Van den Bergh O, et al. (2007) Learned defense response to hypoxia in newborn mice. *Neuroscience letters* Jun 15;420(3): 268–72.
- Branchi I, Santucci D, Vitale a, Alleva E (1998) Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Developmental psychobiology* Nov;33(3): 249–56.
- Ahrens AM, Ma ST, Maier EY, Duvauchelle CL, Schallert T (2009) Repeated intravenous amphetamine exposure: rapid and persistent sensitization of 50-kHz ultrasonic trill calls in rats. *Behavioural brain research* Jan;197(1): 205–9.
- Burgdorf J, Kroes Ra, Moskal JR, Pfau JG, Brudzynski SM, et al. (2008) Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of comparative psychology* Nov; 122(4): 357–67.
- Portfors CV (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* Jan; 46(1): 28–34.
- Scattoni ML, Ricceri L, Crawley JN (2010) Unusual repertoire of vocalizations in adult BTBR T+tf/J mice during three types of social encounters. *Genes, brain, and behavior* Jul: 1–13.
- Timmer M, Sandi C (2010) A role for glucocorticoids in the long-term establishment of a social hierarchy. *Psychoneuroendocrinology* Nov; 35(10): 1543–52.
- Bourgeron T, Jamain S, Granon S (2006) Animal models of autism: Focus on genetic models and behavioral test paradigms. In: GS. Fisch, J. Flint, eds. *Transgenic and knockout models of neuropsychiatric diseases* Contemporary clinic neuroscience, Humana Press Inc. pp 151–174.
- Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretius S, et al. (2008) Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc of the Natl Acad Sci U S A* Feb 5; 105(5): 1710–5.
- Enard W, Gehre S, Hammerschmidt K, Hölter SM, Blass T, et al. (2009) A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell* May; 137(5): 961–71.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Panksepp JB, Jochman Ka, Kim JU, Koy JJ, Wilson ED, et al. (2007) Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. *PLoS one* Jan; 2(4): e351.
- Holy TE, Guo Z (2005) Ultrasonic songs of male mice. *PLoS biology* Dec; 3(12): e386.
- Hammerschmidt K, Radyushkin K, Ehrenreich H, Fischer J (2009) Female mice respond to male ultrasonic “songs” with approach behaviour. *Biology letters* Oct; 5(5): 589–92.
- Fischer J, Hammerschmidt K (2010) Ultrasonic vocalizations in mouse models for speech and socio-cognitive disorders: insights into the evolution of vocal communication. *Genes, brain, and behavior* Jun: 1–11.
- Hoffmann F, Musolf K, Penn DJ (2009) Freezing urine reduces its efficacy for eliciting ultrasonic vocalizations from male mice. *Physiology & behavior* Mar; 96(4–5): 602–5.
- Brudzynski SM (2007) Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: acetylcholine-dopamine interaction and acoustic coding. *Behavioural brain research* Sep; 182(2): 261–73.
- Brudzynski SM, Ociepa D (1992) Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiology & behavior* Oct; 52(4): 655–60.
- Brudzynski SM, Chiu EM (1995) Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & behavior* Jun; 57(6): 1039–44.

26. Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW (2006) Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural brain research* Jan 30; 166(2): 271–80.
27. Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thévenet M, et al. (2011) The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience* Jan; 5: 25.
28. Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ (2007) Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural brain research* Sep 4; 182(2): 166–72.
29. McGregor PK, Dabelsteen T (1996) Communication networks. In: Kroodsma DE, Miller EH, eds. *Ecology and Evolution of Acoustic Communication in Birds*. Ithaca: Cornell University Press. pp 409–425.
30. Fendt M, Schwienbacher I, Schnitzler H-U (2006) Carbachol injections into the nucleus accumbens induce 50 kHz calls in rats. *Neuroscience letters* Jun 19; 401(1–2): 10–5.
31. Brudzynski SM, Pniak A (2002) Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *Journal of Comparative Psychology* 116(1): 73–82.
32. Elie JE, Soula HA, Mathevon N, Vignal C (2011) Dynamics of communal vocalizations in a social songbird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *The Journal of the Acoustical Society of America* Jun; 129(6): 4037.
33. Scherer KR, Zei B (1988) Vocal indicators of affective disorders. *Psychotherapy and psychosomatics* Jan; 49(3–4): 179–86.
34. Schehka S, Esser K-H, Zimmermann E (2007) Acoustical expression of arousal in conflict situations in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology* Aug; 193(8): 845–52.
35. Rendall D (2011) Acoustic correlates of caller identity and affect intensity in the vowel-like grunt vocalizations of baboons. *The Journal of the Acoustical Society of America* Jun; 113(6): 3390–402.
36. Meise K (2008) Information content of female chacma baboon grunts - The signallers potential to utter functionally referential grunts. Diploma thesis. University of Bielefeld, Germany.
37. Moles A, Costantini F, Garbugino L, Zanettini C, D'Amato FR (2007) Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability? *Behavioural brain research* Sep; 182(2): 223–30.
38. Wöhr M, Schwarting RKW (2009) Ultrasonic communication in rats: Effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* Dec; 94(2): 285–95.
39. Menuet C, Cazals Y, Gestreau C, Borghgraef P, Gielis L, et al. (2011) Age-Related Impairment of Ultrasonic Vocalization in Tau.P301L Mice: Possible Implication for Progressive Language Disorders. *PLoS ONE* Jan; 6(10): e25770.
40. Grimsley JMS, Monaghan JJM, Wenstrup JJ (2011) Development of Social Vocalizations in Mice. *PLoS ONE* Mar; 6(3): e17460.
41. Takahashi N, Kashino M, Hironaka N (2010) Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. *PLoS ONE* Jan; 5(11): e14115.
42. Hamilton SM, Spencer CM, Harrison WR, Yuva-Paylor La, Graham DF, et al. (2011) Multiple autism-like behaviors in a novel transgenic mouse model. *Behavioural brain research* Mar 17; 218(1): 29–41.
43. Hoffmann F, Musolf K, Penn DJ (2011) Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice. *Physiology & behavior* Oct; 105(3): 766–771.
44. Arriaga G, Jarvis ED (2011) *Of Mice, Birds, and Men*. Diploma thesis. Duke university, USA.
45. Moy SS, Nadler JJ, Magnuson TR, Crawley JN (2006) Mouse Models of Autism Spectrum Disorders: The Challenge for Behavioral Genetics. *Autism* 51(7146): 40–51.
46. Ey E, Leblond CS, Bourgeron T (2011) Behavioral profiles of mouse models for autism spectrum disorders. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research* Feb; 4(1): 5–16.
47. Wöhr M, Schwarting RKW (2007) Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS ONE* Jan; 2(12): e1365.



Research report

Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations

P. Serreau^{a,b}, J. Chabout^b, S.V. Suarez^a, J. Naudé^{a,1}, S. Granon^{a,b,*}^a Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, Département Neurosciences, Institut Pasteur and CNRS URA 2182, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France^b Centre de Neurosciences Paris-Sud, CNRS UMR 8195 and Université Paris-Sud 11, 15 Boulevard Clémenceau, 91405 Orsay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2011

Received in revised form 6 July 2011

Accepted 10 July 2011

Available online 20 July 2011

Keywords:

Decision-making

Motivation

Operant conditioning

Impulsivity

Delay-reward

Prefrontal cortex

ABSTRACT

Beside a critical role in nicotine addiction, the role of nicotinic receptors in cognitive or emotional processes remains difficult to elucidate, mostly because of a lack of specificity of compounds and because they up or down regulate easily. Using knockout mice may be one key to elucidate the role of nicotinic receptors stimulated by their endogenous ligand acetylcholine. We and others have previously explored the behaviour of mice knockout for the beta2-subunit containing nicotinic receptor – $\beta 2^*nAChRs$ – $\beta 2^{-/-}$ mice. These mice exhibit a particular kind of hyperactive locomotion, with profound deficits in cognitive and social interaction tasks, only when they have to show flexible choices. We wonder here whether the latter is due to a lack of motor control – i.e. motor impulsivity, a lack of estimation of reward value – i.e. cognitive impulsivity, and/or a lack of appropriate ranking or choice between different motivations.

We designed behavioural tasks allowing the study of these distinct processes in mice. Our current results highlight the important role of $\beta 2^*nAChRs$ in flexible behaviours in conflicting situations, such as social contact, spatial exploration and food consumption. They also show that the cognitive deficits exhibited by $\beta 2^{-/-}$ mice cannot be explained by impaired inhibitory behaviours.

Although social cognition is considerably enriched in humans as compared to rodents, we provide here novel data for the neurobiology of flexible social behaviours that could ultimately be useful for humans. Indeed, the ability to show flexible behaviours and to display adapted social interactions is profoundly impaired in a myriad of psychiatric disorders.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neuronal nicotinic receptors (nAChRs) are pentameric ion channels composed of protein subunits arranged in various combinations of α (2–10) and β (2–4) subunits [1] review in [2]. Principal combinations of subunits that predominate in the rodent brain are $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ [3,4]. While the role of the $\beta 2$ -containing receptors concerning nicotine addiction and nicotine reward becomes increasingly evident [5–9], the role of these receptors without exogenous nicotine stimulation remains unclear. Their normal function as ion gated channels stimulated by the release of acetylcholine *in vivo* may be of importance however, as they are

potentially located on every cell in every cell compartment, therefore participating in the release of different neurotransmitters [10].

It has been shown that mice lacking the $\beta 2$ subunits – $\beta 2$ knockout ($\beta 2^{-/-}$) mice – show abnormal passive avoidance [11] but normal spatial [12] and non-spatial [13] memory. $\beta 2^{-/-}$ mice exhibited hyperactive responses when confronted with novel environments [14–16] with abnormal spatio-temporal sequencing of the locomotor activity, as compared to WT mice [17]. In food motivated tasks as well as in more spontaneous social paradigms, we observed differences in behavioural flexibility that we hypothesized was mediated by impaired conflict resolution [14]. Indeed, and unlike WT mice, $\beta 2^{-/-}$ mice showed biased choices toward one motivation, i.e. they favoured food over novelty exploration when trained to look for food, even when confronted to a novel attractive object, or they exaggeratedly favoured social interaction over free roaming when previously deprived of social contact. However, we showed that when no conflicting motivation is in balance, $\beta 2^{-/-}$ mice exhibit unaffected cognitive behaviour ([13], see also [12]). From these studies based on non-associative tasks, we can draw two possible hypotheses about the role of $\beta 2$ -containing nicotinic receptors in the ability to show flexible and adapted behaviours: (1) $\beta 2^{-/-}$ mice exhibit disrupted inhibitory behaviours, as they inter-

Abbreviations: nAChRs, nicotinic acetylcholine receptors; $\beta 2^*nAChRs$, beta 2 containing acetylcholine receptors; $\beta 2^{-/-}$, beta 2 knock-out mice.

* Corresponding author at: Centre de Neurosciences Paris-Sud, CNRS UMR 8195, Université Paris-Sud 11, 15 Boulevard Clémenceau, 91405 Orsay, France. Tel.: +33 1 69 15 74 79; fax: +33 1 69 15 77 26.

E-mail address: sylvie.granon@u-psud.fr (S. Granon).

¹ Present address: Action-Neuroimagerie-Modélisation, INSERM: U742, Université Pierre et Marie Curie – Paris VI, 4 place Jussieu, CC 173, 75252 Paris Cedex 05, France.

rupt less frequently than WT a behaviour previously engaged, such as social, novelty or food seeking [14,18]. They would thus show either (1-a) motor impulsivity [19–22] and/or (1-b) would not estimate correctly the value of a reinforcement and so would show choice impulsivity [23] and/or (2) would be impaired when confronted with a choice between multiples conflicting motivations.

These hypotheses, not mutually exclusive, would indicate a dysfunction of distinct neural circuits as flexible behaviours, motor, or cognitive impulsivity control depend upon distinct neural circuits, and impact different psychiatric disorders in humans.

In order to test our first hypothesis, i.e., the motor hypothesis, we designed a new behavioural task to assess impulsive motor control.

Then, we adapted a conditioned delay reward task [24,25] designed to measure the ability of mice to choose between a small reward delivered immediately, and a larger reward delivered after a variable delay, and therefore to address reward value perception and choice impulsivity. Before this task, we assessed mice ability to discriminate and prefer large over small reward quantity in a T-maze. By contrast with the former task that assessed values of the same reinforcement the next task tested our second hypothesis by assessing ranking and choices between different types of rewards. For that, we adapted our social interaction paradigm [14,26,27] by adding a third reinforcement – food – to the motivation for novelty exploration and for social interaction. The motivation conflict generated in this task thus relies on free choices toward satisfaction of natural motivations.

The comparison of performance for WT and $\beta 2^{-/-}$ mice in these tasks allow to see whether dissociable processes (motor/cognitive impulsivity versus motivation conflict), known to recruit different neural circuits, can disentangle behavioural processes relying on $\beta 2$ containing nicotinic receptors function and those independent of it.

2. Materials and methods

2.1. Animals

37 male C57BL/6J (WT) mice and 36 male knock out S β OPF HO ACNB2 ($\beta 2^{-/-}$) mice obtained from Charles Rivers Laboratories France (L'Arbresle Cedex, France) were used. $\beta 2^{-/-}$ mice were generated as described previously [11]. WT and $\beta 2^{-/-}$ mice are not littermates and this could be a potential caveat of the study. However, mutant mice were generated more than 15 years ago [11]. Extensive genomic analysis has been carried out recently to determine the percentage of C57BL6/J genetic background in the beta2 line that originally derives from a 129/Sv Embryonic Stem cell line. Since then, the line has been backcrossed more than 20 generations with the wild-type C57BL6/J line. Using more than 400 genomic markers, the beta2 line was confirmed to be at more than 99.99% C57BL6/J.

Mice arrived to the animal facility at 12 weeks of age, and were housed individually for at least 3 weeks before the social interaction task. In food deprived mice, standard chow was given so as to adjust and maintain at 85% of their free feeding weight. Behavioural tasks started 1 week after a stable weight was reached. All mice had ad libitum access to water except during training and testing. The temperature (20–22 °C) and humidity was automatically controlled and a circadian light cycle of 12/12 h light–dark cycle (lights on at 8:30 am) was maintained in the animal facility. All experiments were performed during the light cycle, between 09:00 a.m. and 5:00 p.m. Experiments were conducted at the Institut Pasteur in Paris, France, and in Université Paris Sud, Orsay, France, in accordance with the local regulations for animal experiments as well as the recommendations for animal experiments issued by the European Council (directives 219/1990 and 220/1990).

2.2. Behavioural apparatus

Conditioning tasks took place in four operant chambers (Imetronic®, Bordeaux, France) 20 cm \times 24 cm \times 16 cm, equipped with one or two nosepoke holes with infrared beam which permits detection of nosepokes, one pellet dispenser and a food magazine located on the opposite wall equipped with an infrared beam detecting head entries, a house light system delivering approximately 20 lx of white diffuse light and a tone speaker. All test cages were individually enclosed in a light and sound attenuating and ventilate wood box. Each reward consisted of small food pellets (14 mg Rodents Dustless precision pellets (F0064; BioServ)).

T-maze discrimination took place in three transparent plastic arms (one starting arm: 45 cm length, two choice arms: 34 cm length). Arms were 10 cm wide and presented transparent walls of 20 cm high. The task was conducted in a small room

with 100 lx diffuse light with multiple visual cues on the walls. Reward in this task consisted of food pellets (14 mg Rodents Dustless precision pellets (F0064; Bioserv)).

Social tasks took place in a transparent plastic maze (50 cm height \times 25 cm wide \times 30 cm deep) located in a small novel experimental room with a diffuse 100 lx light.

2.3. Behavioural procedures

2.3.1. Motor Impulsive Task (MIT)

Twelve $\beta 2^{-/-}$ mice and 12 WT mice were trained in this task.

Only one hole was available for nosepoking in operant chamber. This task is composed of three distinct phases: habituation, learning, and test.

During habituation, mice associated a nosepoke with delivery of one food pellet in the magazine (Dustless 14 mg pellets). Habituation phase continued until mice earned at least 45 pellets on three consecutive daily sessions. In any case, a session ended either after 30 min or after 60 pellets earned.

During the learning phase (Fig. 1A) mice had to wait for a stimulus (a mixed sound + house light) before making a nosepoke leading to the delivery of a single food pellet. If mice failed to respond within 5 s following the stimulus, the house light went off and an omitted trial was scored. If mice visited the magazine before making a nosepoke, the house light went off and an incorrect trial was counted. Omitted and incorrect trials initiated the start of a 5 s inter-trial interval (ITI) preceding the next trial. When mice made a correct trial (nosepoke after the stimulus and within the 5 s delay), a pellet was delivered in the magazine. Perseverative responses (i.e. nosepoke before visiting food magazine) were scored but have no programmed consequence. When mice visited the magazine, the house light went off and a 3-s period started to allow consumption of the pellet, before starting the next ITI. During the eating time all actions were scored but had no programmed consequence. Premature responses were scored when mice made a nosepoke during the 5 s ITI. Premature responses restarted the current ITI.

The learning phase continued until animals reached predetermined criteria over three consecutive sessions demonstrating that mice acquired the behavioural sequence and exhibited stable levels of performance: at least 80% of correct trials, less than 20% of premature responses, and earning at least 50 pellets per session (the maximum being 60) were required. Two $\beta 2^{-/-}$ mice were discarded because they did not reach these criteria. These mice also presented a high percentage of omitted trials (>50%) and did not show stable results (in term of motivation for pellets and percent of correct responses).

The test phase followed the same behavioural sequence than the learning phase except that the ITI duration was extended, became variable (5 s, 7 s, 9 s and 12 s), and occurred in a pseudorandom order. These four variable sessions were followed by three baseline sessions (fixed 5-s ITI) and a challenge session with a long and fixed 20-s ITI.

Percentage of correct responses (number of pellets earned/(number of pellets + number of incorrect association) \times 100), omitted trials (number of omitted trials/number of trials \times 100), latency to correct respond and latency to collect were measured as control variables. Motor impulsivity was evaluated by the percentage of premature responses (number of premature responses/number of ITI presentation \times 100), and its evolution during test phase. For variables ITIs, percents of premature responses were calculated by dividing the number of premature responses made at one ITI by the number of occurrence of this ITI within the session.

2.3.2. T-maze discrimination procedure

Twelve $\beta 2^{-/-}$ mice and 13 WT mice were trained in this task.

The aim of this task was to see whether mice could discriminate between different amounts of the same reinforcement (sucrose pellets) and prefer a larger amount to a small one.

The behavioural procedure was adapted from the first steps of the effort based decision-making task [28–30]. Mice were food deprived until they steadily maintained 85% of their initial free feeding weight. The task was divided in three steps. First, during 3 days (habituation), 20 food pellets were scattered in the maze plus two pellets in each cups at end of each choice arm. Daily sessions ended after 10 min, or after mice consumed all food pellets. Then, the learning phase started. It comprised 4 sessions (one per day) with 5 trials per session. During this phase, one of the choice arm was baited with 3 food pellets in a cup (high rewarded arm-HR) while the other arm contained only one food pellet in a cup (low rewarded arm-LR). Location of HR and LR arms – fixed throughout the task – was randomly distributed on the left or right hand side (half of the mice had HR in the right arm and half on the left arm). A trial ended after a mouse had consumed all pellets or after 2 min. The inter-trial interval was 8 min. After that phase, a second step of learning started. It consisted of 4 sessions of 10 trials during which only one of the choice arms was available, the other arm being blocked. The left/right order was pseudo-randomly distributed so that mice never visited the same arm more than twice in a row. A trial ended after mice consumed all pellets or after 1 min.

The test phase consisted of three sessions of 12 trials. During this step both HR and LR arms were available. Once a mouse engaged (four paws) in one of the arm, it was closed by a transparent door. Trials 4 and 9 were forced trials in order to prevent motor routine. For that, a transparent door blocked the arm chosen during the previous trial (trials 3 and 8). Percentages of HR arm choices were calculated

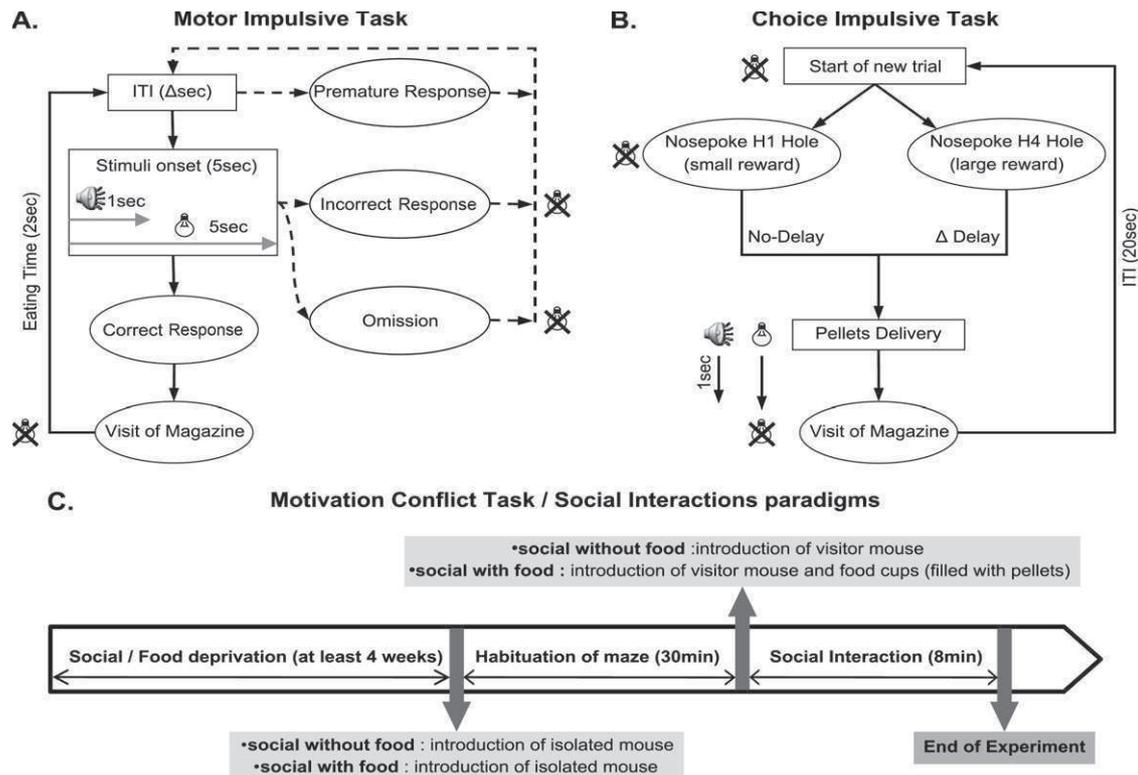


Fig. 1. Schematic representation of the different behavioural tasks. The motor (A) and cognitive (B) impulsivity tasks are conditioning tasks that request mice to wait for a signal combining auditory and light stimulus before producing a nose poke in a single hole (A) or a choice between two holes (B). Nose pokes lead to the delivery of one food pellet (A) and of either one or 4 food pellets (B) depending on the hole chosen (H1 or H4 respectively). (C) The social interaction task are conducted in mice that have been previously reared in social isolation, called experimental mice. They were habituated to the experimental device (a rectangular large transparent box) for 30 min before an unknown conspecific mouse of the same sex and age (visitor) was placed into the same experimental device for 8 min. Experimental animals were either fed ad libitum (social without food) or food deprived for 4 weeks (social with food) before the social task.

for each mouse by the number of HR choices among the 10 free choice trials (thus excluding forced trials 4 and 9).

Mice that obtained 70% of HR choice during the test phase were solely tested in the choice impulsivity test. Following this *a priori* threshold two $\beta 2^{-/-}$ mice were excluded. These mice presented also a high bias for the low rewarded arm before forced choice, a global lack of motivation to consume food pellets (high number of trials without eating pellets and very long latencies to choose an arm (between 20 to 30 s)).

2.3.3. Choice Impulsivity Test (CIT)

Ten $\beta 2^{-/-}$ mice and thirteen WT mice were trained in this task.

The behavioural procedure was adapted from [24]. Operant chambers contained two holes for nosepokes. During the training phase (7 consecutive days), making a nosepoke in one of the two holes ("small and immediate reward" hole, H1) led to the delivery of one food pellet (14 mg dustless precision pellets). A nosepoke in the other hole ("large and delayed reward" hole, H4) resulted in the delivery of 4 food pellets. Positions of H1 and H4 hole in conditional boxes were distributed among mice. Food delivery was signalled by the illumination of the house light and a 1 s sound. The light remained on until the animals visited the food magazine. Then, the house light was switched off and a 20 s ITI started (Fig. 1B). During the test session (8 consecutive days after the end of training) a delay was inserted between a nosepoke in the H4 hole and the delivery of pellets. The delay remained the same during the entire daily session and increased every day (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 s). Responses made during the delay in one of the two holes were scored but had no programmed consequence.

A shift in the choices between the hole that gives high rewards, but associated with a long delay before its delivery, and the hole that gives low rewards with a short delay reflected choice impulsivity. The measure of the number of pellets earned, the number of premature responses (nosepokes during ITI), the number of perseverative responses (nosepokes during delay or when pellets were already available in the magazine), the latency to respond and to collect the food were scored as control measures.

2.3.4. Motivational conflict task, social interaction task (SIT)

The task had two versions, one with food (WT, $n = 12$; $\beta 2^{-/-}$, $n = 12$), and one without food (WT, $n = 12$; $\beta 2^{-/-}$, $n = 12$) (see Fig. 1C).

The procedure "without food" was adapted from the one previously used [14,26]. After at least 3 weeks of social deprivation, mice were tested in the social interaction

task. The test mouse (either WT or $\beta 2^{-/-}$), thereafter called the experimental mouse, was placed in a novel environment (a transparent plastic 35 cm \times 50 cm \times 45 cm box containing clean sawdust) in an unfamiliar room with controlled (100 lx) luminosity. 30 min later, a control mouse, thereafter called the visitor (a WT mouse of the same age and sex reared in social condition), was gently placed in the box for 8 min. A different visitor mouse was used in each test.

In the "with food" version, experimental mice were chronically food deprived before the day of the experiment with their weight adjusted to 85% of their free feeding weight. They were placed in the new environment for 30 min of habituation (identical as above). During the social test (8 min), and before the insertion of the visitor mouse, cups filled with sucrose pellets were placed in two corners diagonally opposed of the experimental box. (Experimental mice were habituated and motivated to consume these pellets – see Section 2.3.1.)

Experiments were recorded on tapes or on computer for off line analyses. Data analysis consisted to measure the duration and sequences of social interaction between experimental and visitor mice. Duration of contacts was measured independently of the initiator of the contact and the percentage of time spent in contact was quantified.

In the "with food" version, we additionally recorded the number of pellets eaten during the social experiment and derived the time and percentage of time devoted to food motivation (from previous observations the mean time to eat the pellets was around 3 s). Time devoted to novelty exploration was defined as time spent in non-social interaction or non-food consumption. No aggressive or dominance behaviours have been observed in these experiments.

Our measures therefore evaluated the respective durations of novelty exploration, social interaction and food consumption, and thus reflected how mice ranked these different rewards/motivations across the social interaction task (SIT).

2.4. Statistical analysis

Statistical Analysis was made using Statview® software for ANOVA repeated measure and student *t*-test.

MANOVA was made using Tanagra® (<http://eric.univ-lyon2.fr/~ricco/tanagra/en/tanagra.html>).

Significance threshold was set at $p < 0.05$ (before Bonferroni correction). Bonferroni correction was applied when needed for multiple post-hoc comparisons ($\alpha = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$ for independent comparisons and $\alpha = \alpha/k$ for interdependent comparisons; where α is significance threshold and k the number of comparisons).

3. Results

3.1. WT and $\beta 2^{-/-}$ mice present a similar level of motor impulsivity in MIT

3.1.1. $\beta 2^{-/-}$ mice do not show motor impulsivity

WT and $\beta 2^{-/-}$ mice showed identical percentages of premature responses during the learning phase ($F_{(1,20)} = 1.72$, NS) as well as during the different sessions of the test phase ($F_{(2,20)} = 0.34$, NS), as illustrated in Fig. 2A. There was a significant effect of session during the test phase ($F_{(9,20)} = 146$, $p < 0.0001$) and no significant effect of genotype or interaction group \times session ($F_{(9,180)} = 0.90$, NS) showing that the significant evolution of the percentage of premature responses with the different sessions was identical for both genotypes. Post-hoc analysis (t -tests) showed a significant increase in premature responses in both WT and $\beta 2^{-/-}$ mice for the four sessions of the test phase as compared to the last session of the learning phase, i.e., the last sessions before which the ITI was made variable (all p s < 0.01 , significance threshold was $\alpha = 0.0125$ with Bonferroni correction).

When we broke down the sessions of variable ITI challenge phase regarding percentages of premature responses performed for the different ITIs (Fig. 2B) there was no significant effect of genotype for any session (session 1: $F_{(1,20)} = 0.164$, NS; session 2: $F_{(1,20)} = 0.23$, NS; session 3: $F_{(1,20)} = 0.06$, NS; session 4: $F_{(1,20)} = 0.01$, NS). A significant effect of ITI duration was observed (session 1: $F_{(3,20)} = 8.07$, $p < 0.0001$; session 2: $F_{(3,20)} = 12.4$, $p < 0.0001$; session 3: $F_{(3,20)} = 14.7$, $p < 0.0001$; session 4: $F_{(3,20)} = 8.28$, $p = 0.0001$) and there was no significant interaction ITI duration \times genotype for all variable sessions (session 1: $F_{(3,60)} = 0.90$, NS; session 2: $F_{(3,60)} = 0.94$, NS; session 3: $F_{(3,60)} = 0.70$, NS; session 4: $F_{(3,60)} = 1.91$, NS).

Post-hoc analyses (paired t -tests) showed that there was a significant increase in premature responses for WT and $\beta 2^{-/-}$ mice between the shorter (5-s delay) and the longer (12-s delay) ITIs for all test sessions (all p s < 0.01 , significance threshold was $\alpha = 0.0125$ with Bonferroni correction). The Motor Impulsive Task was indeed able to generate premature responses as a function of the duration of ITIs (Fig. 2B).

During the unique 20s ITI test session, WT and $\beta 2^{-/-}$ mice showed a similar evolution of their percentage of premature responses within the session (Fig. 2C) as there was no significant genotype effect ($F_{(1,20)} = 0.84$, NS) and no significant interaction genotype \times time ($F_{(11,220)} = 0.99$, NS).

3.1.2. $\beta 2^{-/-}$ mice showed normal controls measure in MIT

There was no differences between WT and $\beta 2^{-/-}$ mice regarding percent of correct responses (Fig. 3A) either during the learning phase (genotype effect: $F_{(1,20)} = 0.60$, NS) or during the test phase ($F_{(1,20)} = 0.15$, NS), and both groups also showed a similar evolution of this measure with session as there was no significant interaction genotype \times session for the learning phase ($F_{(2,40)} = 0.538$, NS) or for the test phase ($F_{(2,180)} = 0.946$, NS). Analysis of omitted trials (Fig. 3B) showed that $\beta 2^{-/-}$ mice were focalised on the task similarly to WT mice, as there was no genotype effect either for the learning phase ($F_{(1,20)} = 0.230$, NS) or for the test phase ($F_{(1,20)} = 0.609$, NS) for omission measures.

3.2. $\beta 2^{-/-}$ mice showed preference for large reward over small reward and did not present choice impulsivity

3.2.1. $\beta 2^{-/-}$ mice showed a preference for large reward in a T-maze discrimination procedure

During the last three sessions of the task (when the choice between the high and low rewarded arm was free), $\beta 2^{-/-}$ and WT

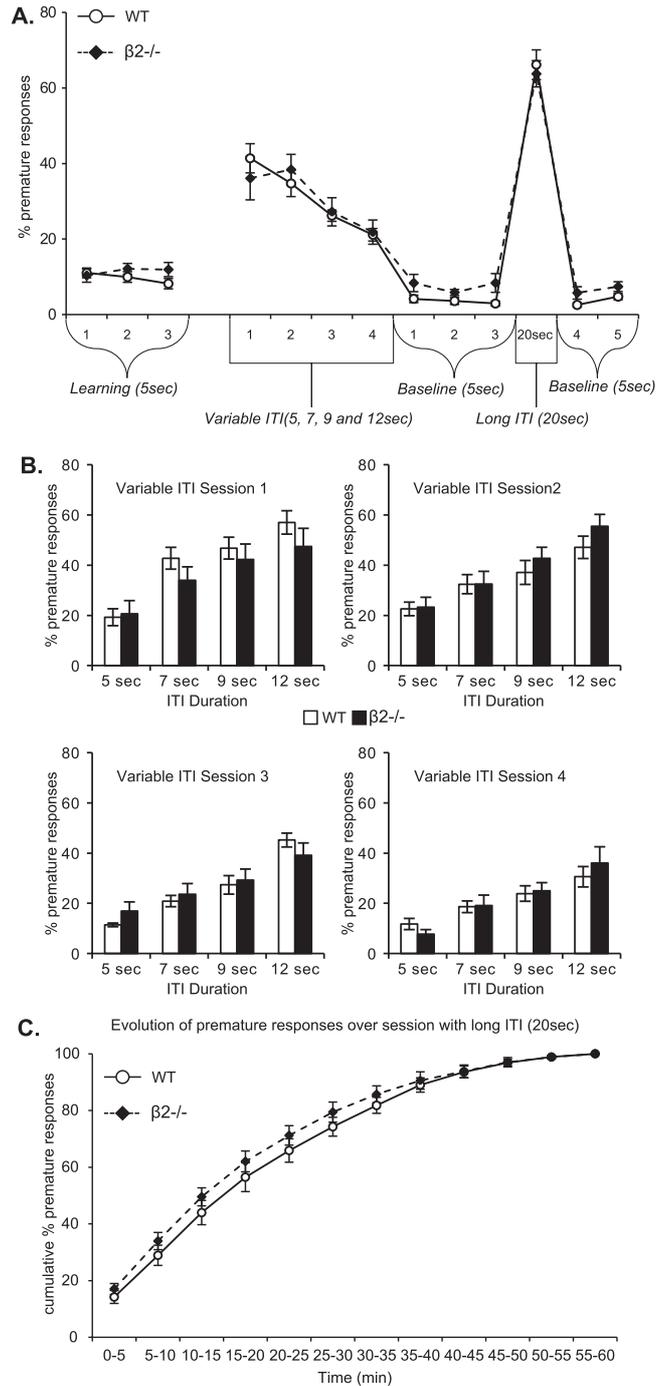


Fig. 2. Impulsivity measurements in the Motor Impulsive Task (MIT). A. Percentages of premature responses measured in the motor impulsivity task (MIT) in WT (white circle) and $\beta 2^{-/-}$ mice (black square) during the three last learning sessions for which the inter-trial-interval (ITIs) was fixed to 5-s, during the 4 challenge session during which ITIs were variable, and during a long and fixed 20-s ITI. B. Repartition of the percentages of premature responses during the 4 challenge sessions for each ITI (5, 7, 9 and 12 s). Percentage of premature responses increased for increasing ITIs in both WT and $\beta 2^{-/-}$ mice for all challenge sessions. C. Cumulative percentage of premature responses during the session of long ITI (20 s). Premature responses evolved in a similar manner in WT and $\beta 2^{-/-}$ mice. Data are presented as mean \pm SEM (WT, $n = 12$; $\beta 2^{-/-}$, $n = 10$).

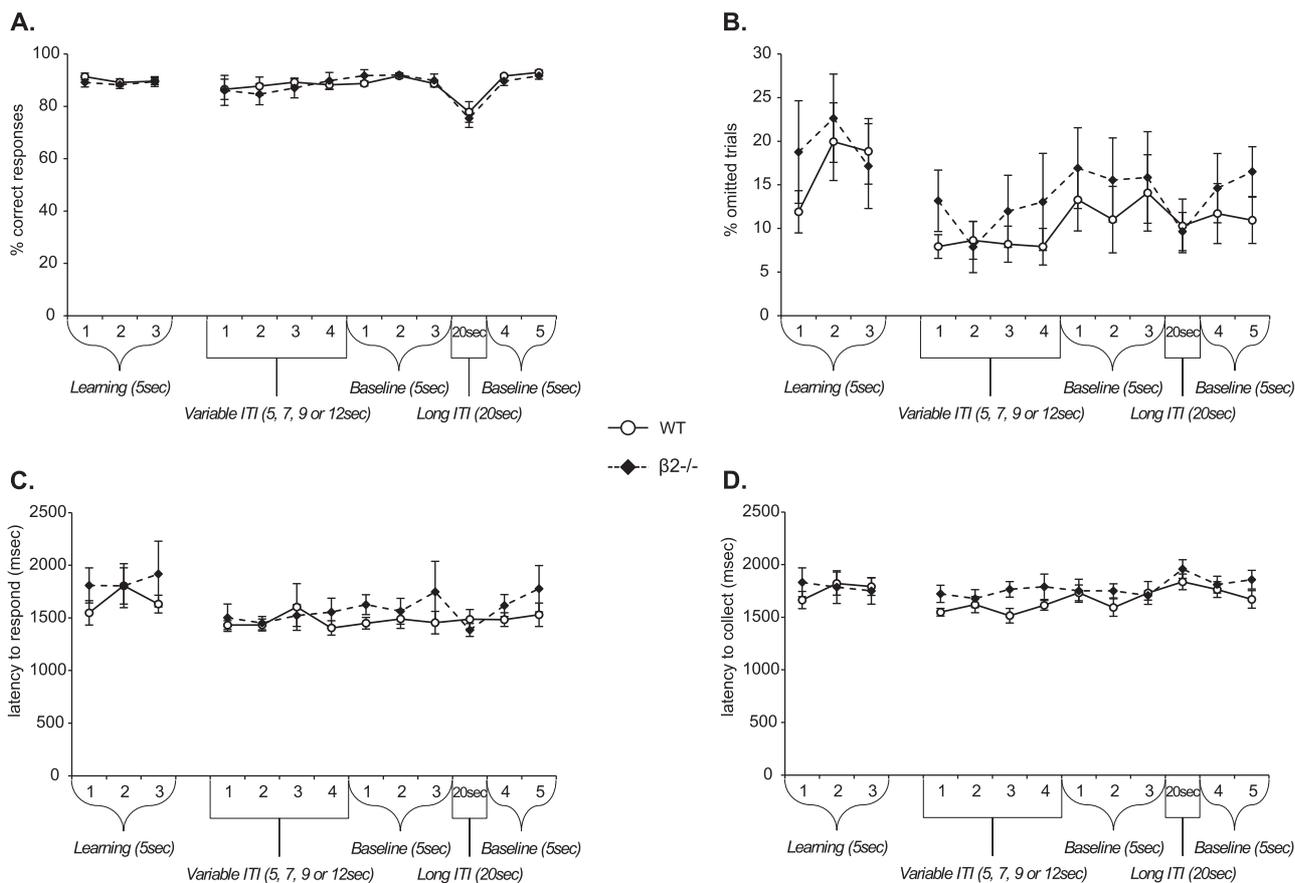


Fig. 3. Controls measurements in the Motor Impulsive Task (MIT). Evolution of percentage of correct responses (A), percentage of omitted trials (B), latency to respond (C), latency to collect the food (D) were not statistical different between WT mice (white circle, $n = 12$) and $\beta 2^{-/-}$ mice (black square, $n = 10$) either for the three last learning sessions or for the challenge sessions (with variable and/or long ITIs). Data are presented as mean \pm SEM.

mice showed a clear preference for the high rewarded arm (genotype effect, $F_{(1,21)} = 3.71$, NS; genotype \times session, $F_{(2,42)} = 0.04$, NS) suggesting that $\beta 2^{-/-}$ mice were able to discriminate between high and low reward and preferred the high one (Fig. 4A).

3.2.2. $\beta 2^{-/-}$ mice showed no impulsivity related to reward choice in CIT

When there was a delay between the nosepoke in the hole leading to a large reward (H4 hole) and the delivery of pellets, WT and $\beta 2^{-/-}$ mice showed a similar shift of their preference for the immediate but smaller reward (H1), as illustrated in Fig. 4B. Repeated measures ANOVA conducted on the percentage of choice for H4 over H1 showed no significant effect of genotype ($F_{(1,21)} = 1.41$, NS), a significant effect of session ($F_{(7,21)} = 25.11$, $p < 0.0001$) and no interaction genotype \times session ($F_{(7,147)} = 1.7$, NS).

These results suggest that $\beta 2^{-/-}$ mice evaluated correctly the amount of food reward as well as the latency of reward delivery, and that they showed normal food motivation and appropriate resistance to delay reward.

$\beta 2^{-/-}$ and WT mice showed a similar evolution of high reward choice over daily sessions (Fig. 4C). There was no main genotype effect ($F_{(1,21)} = 0.94$, NS) nor genotype \times session effect ($F_{(3,63)} = 0.367$, NS).

3.2.3. Controls measures

During CIT, WT and $\beta 2^{-/-}$ mice showed the same evolution of number of pellets earned (Fig. 5A) as there was no genotype effect ($F_{(1,21)} = 2.11$, NS) and no significant interaction genotype \times session effect ($F_{(7,147)} = 0.85$, NS) for this measure. Mice of both genotypes

also presented a similar latency to respond across sessions (Fig. 5B) as there was no genotype effect ($F_{(1,21)} = 1.97$, NS) and no significant interaction genotype \times session ($F_{(7,147)} = 0.89$, NS) for the response latency parameter. However the latency to collect the food (Fig. 5C) was different in the two genotypes ($F_{(1,21)} = 38.95$, $p < 0.05$) as was its evolution across sessions (genotype \times session: $F_{(7,147)} = 8.44$, $p = 0.0001$). $\beta 2^{-/-}$ took more time to collect food pellets than WT only during the first session of test phase (session 0 delay, $t = 3.61$, $p < 0.005$).

Moreover, evolutions of premature and perseverative responses across delay sessions were different between WT and $\beta 2^{-/-}$ mice (Fig. 5D and E). For premature responses, there was no significant genotype effect ($F_{(1,21)} = 3.94$, NS) but a significant interaction genotype \times session effect ($F_{(7,147)} = 4.10$, $p < 0.0005$). For perseverative responses, there was a significant genotype effect ($F_{(1,21)} = 6.22$, $p < 0.05$) and a significant genotype \times session effect ($F_{(7,147)} = 2.54$, $p < 0.05$). Indeed, WT mice showed a tendency to increase both premature and perseverative responses with delay durations (i.e. session) while $\beta 2^{-/-}$ mice showed stable premature and perseverative responses across sessions. These differences rely only on the premature and perseverative responses made in the low rewarded hole (see Table 1).

3.2.4. $\beta 2^{-/-}$ mice showed altered motivation ranking

3.2.4.1. Evolution of time devoted to concurrent motivations. In the social interaction task (Fig. 6A-top left panel) when only two motivations competed (social and exploration), a marginally significant difference between genotypes could be found using one-way MANOVA analysis for the whole duration of the task (0–8 min) (Rao, $F_{(2,21)} = 2.7623$; $p = 0.086$). When analysing the evolution of

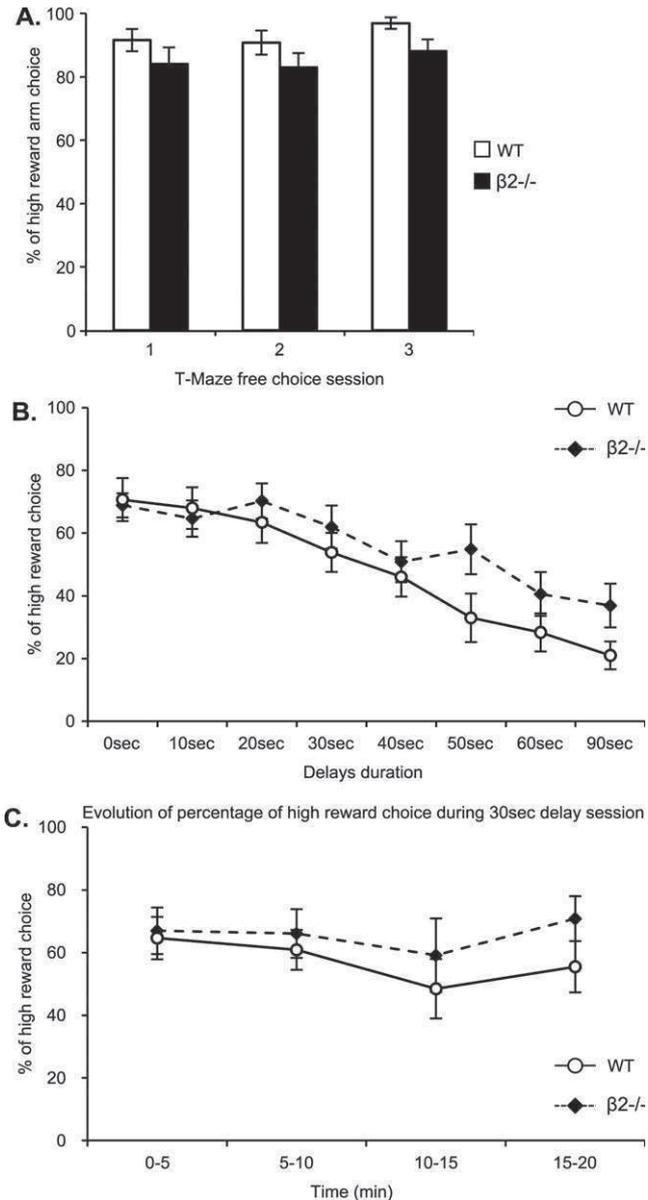


Fig. 4. Preference for large over small reward in T-maze discrimination and Choice Impulsivity Task (CIT)

Mean percent choice (\pm SEM) for the high reward in WT mice (white circle, $n=13$) and $\beta 2^{-/-}$ mice (black square, $n=10$) in the T-maze discrimination paradigm (A) and in the choice impulsive task (B). WT and $\beta 2^{-/-}$ mice showed similar preference for the high rewarded arm during the free choice phase and a similar shift from the highly rewarded hole to the low rewarded hole when a delay was inserted between the response in the hole in the effective delivery of the reward. C. Evolution toward the high rewarded choice during the 30 s-delay session was similar in the two genotypes.

time spent in exploration and social interaction across the session (Fig. 6A-bottom left panel), we confirmed our previous results showing that, $\beta 2^{-/-}$ mice spent significantly more time in social contact than WT mice during the first 4 min of the social task (t -test for genotype effect: $t=2.4$, $p=0.02$, $df=22$). This difference was only significant for the first 4 min of the task (t -test for genotype effect: $t=0.694$, $p=0.49$ NS).

When the food was introduced together with the social conspecific and that three motivations competed (Fig. 6A top right panel), we observed a marginally significant difference between both genotypes for the whole duration of the task ($F_{(3,20)}=2.74$, $p=0.07$). These differences were mostly due to the time spent in

food consumption and in social interaction. Indeed WT mice spent more time to eat food pellets than $\beta 2^{-/-}$ mice only for the first 4 min of the experiment ($t=3$, $p=0.006$, $df=22$), but not for the last 4 min of the experiment ($t=0.9$, NS) (Fig. 6A-bottom left panel). In contrast, time devoted to social interaction was much longer in $\beta 2^{-/-}$ mice than in WT mice but also only for the first 4 min of the experiment only ($t=3.5$, $p=0.002$, $df=22$) and not for the last 4 min of the experiment ($t=1.4$, NS). Time spent in novelty exploration was not different between genotypes, either during the first ($t=0.5$, NS) or the last part of the task ($t=1.9$, NS).

Altogether, these results suggest that $\beta 2^{-/-}$ mice show differences in dealing with the initial choice between concurrent motivations which would fit with a role of $\beta 2^*$ nAChRs in flexible choices.

3.2.5. Transition between three natural motivations

Transitions from the exploration state to any other states (Fig. 6B) Fig. 6 showed a genotype effect (from novelty exploration to food consumption or social interaction: $t=2.14$, $p=0.04$, $df=22$). $\beta 2^{-/-}$ mice selected preferentially social interaction after exploratory episodes (71% for $\beta 2^{-/-}$ mice versus 58% for WT mice) and less frequently food consumption (29% for $\beta 2^{-/-}$ mice versus 42% for WT mice). However, the percent time spent exploring novelty was similar in WT mice (63 ± 2.5) and in $\beta 2^{-/-}$ mice (66 ± 2.4), which was not the case when exploration competed only with social motivation (Fig. 6A and B).

These data show that when three motivations competed, behavioural differences between WT and $\beta 2^{-/-}$ mice reside in the choices made after exploratory episodes, but not in the duration of these episodes.

4. Discussion

In this paper we highlight the role of $\beta 2^*$ nAChRs in flexible choice between conflicting motivations. We further show that mice lacking $\beta 2^*$ nAChRs have normal ability to inhibit behaviours. Therefore, the cognitive deficits they exhibit cannot be explained by a tendency to show impulsive behaviours.

In previous experiments which targeted cognitive flexibility in learning and social interaction tasks, we showed a robust and specific alteration of $\beta 2^{-/-}$ mice in the spatio-temporal organisation of behaviour, particularly when conflicting motivations have to be processed [14]. We previously showed, and further replicated here, that $\beta 2^{-/-}$ mice disengage less easily from a reinforcing behaviour than WT mice, if the reinforcements are in conflict with one another. These results pointed to different working hypotheses tested here with three novel behavioural experiments: $\beta 2^*$ nAChRs would participate in the control the ability to refrain ongoing behaviour, the appropriate evaluation of reward values, the establishment of an appropriate rank or choice between concurrent motivations. All these processes have a strong influence on cognitive flexibility, the establishment of goal priority, and decision-making [31–34].

4.1. Motor impulsivity is not controlled by $\beta 2^*$ nAChRs

In order to evaluate the ability to inhibit ongoing or rewarded behaviours, independently of decision making or divided attention processes, we designed a motor impulsivity task – MIT – adapted to mice behaviour. Other tasks adapted from rats with a strong attentional component have shown that a 7 s delay was sufficient to produce impaired performance [35,36].

The MIT shows that there is a proportional increase of premature responses with the delay, suggesting that the ability to refrain behavioural responses gets more difficult when the delay increases. Indeed, challenge sessions during which ITI durations

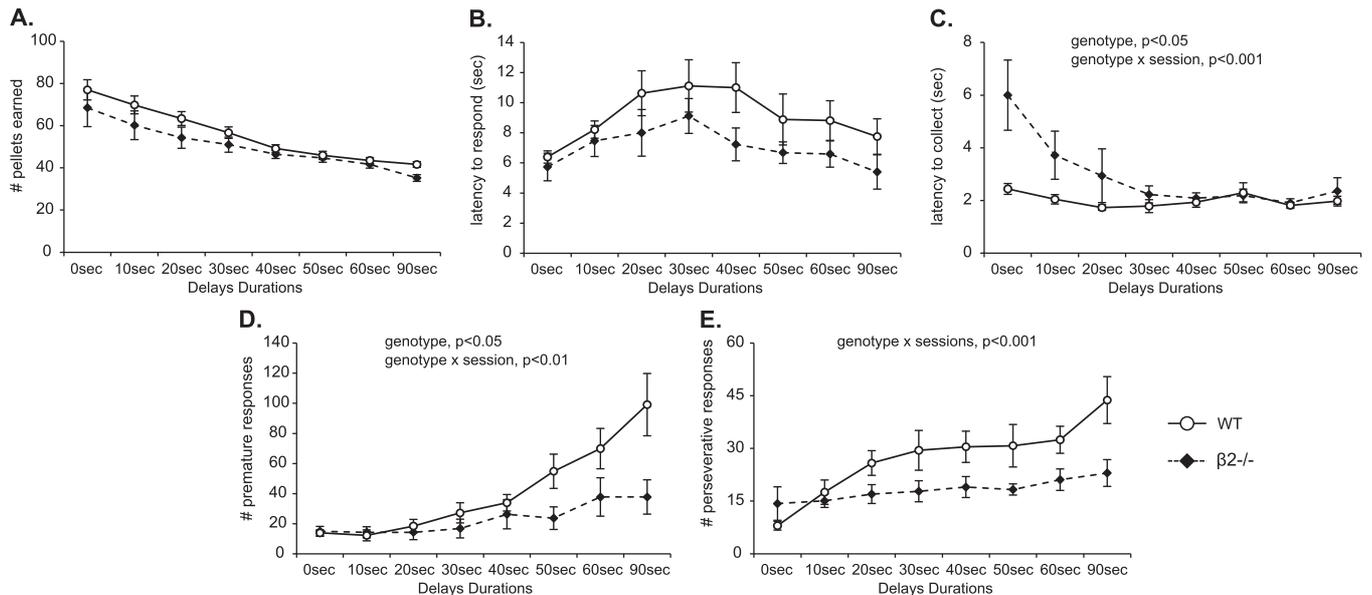


Fig. 5. Control measures during the Choice Impulsive Task (CIT). Evolution of the number of pellets earned (A), number of premature responses (B), number of perseverative responses (C), latency to respond (D) and latency to collect the food (E) in WT (white circles, $n = 13$) and $\beta 2^{-/-}$ mice (black circles, $n = 10$). Data are presented as mean \pm SEM.

increased pseudo-randomly showed a proportional increase in premature responses. Our task further showed that mice can sustain long delays, i.e., at least up to 20 s, before producing premature responses. The number of pellets earned, the total time to complete the task, and the latency to collect food were identical in the two groups, suggesting similar motivation for food reinforcement.

The results obtained in the MIT, designed to be devoid of any choice response, and which did not require any divided attention, showed similar performance in WT and $\beta 2^{-/-}$ mice. Therefore, $\beta 2^*nAChRs$ are not involved in the motor control of impulsive responses.

4.2. Choice impulsivity and reward value is not controlled by $\beta 2^*nAChRs$

A first experiment conducted in a T-maze showed that $\beta 2^{-/-}$ mice, like WT, discriminate between 1 and 4 sucrose pellets and preferred obtaining 4 than 1. $\beta 2^{-/-}$ mice thus showed normal food motivation and estimated appropriately reward values. We designed a conditioning task in which mice had to choose between a response in one hole leading to 1 pellet (H1) with no delay between response and food delivery, and in another hole leading to 4 pellets (H4), with an increasing delay between response and food delivery. This experiment was designed to investigate the ability of $\beta 2^{-/-}$ mice to discount temporally distant events. Temporal discounting describes a decrease in the subjective value of a reward as a function of the amount of, and delay to, the reward [37,38]. The

temporal discounting procedure thus involves the choice between two rewards separated in times. Our results showed that $\beta 2^{-/-}$ mice did not make impulsive choices when different amounts of reward were in competition, and shifted appropriately from large to small reward when the delay increased. We show here that organizing behavioural responses as a function of different amounts of the same reward does not depend on $\beta 2^*nAChRs$.

Non rewarded nose pokes numbers were different for the two genotypes, with WT mice making more premature and perseverative responses across sessions. This evolution, seen only in WT mice can be interpreted as an attempt to find a more rewarding strategy with time, while $\beta 2^{-/-}$ mice did not adapt their premature or perseverative responses. This result support the fact that $\beta 2^{-/-}$ exhibit a stable strategy, even when the parameters of the task change, as has been already shown [14].

4.3. Choice between different motivations

In our previous works we showed that $\beta 2^{-/-}$ mice spent an increased time in social interaction as compared to the WT's [14,18,39]. From the experiments described above, we can now tell that this behaviour is not due to a general impulsive phenotype. Here, we first replicated our previous results in the social task. In addition, integrating a third motivation (food) provided an interesting challenging situation. It shows that all mice frequently switch from one motivation to the other but the frequency of these transitions were biased in $\beta 2^{-/-}$ mice in favour of social motiva-

Table 1

Show repartition of premature and perseverative responses during Choice Impulsive Task between high rewarded related hole (H4) and low rewarded related hole (H1).

Genotype	Premature (H1)		Premature (H4)		Perseverative (H1)		Perseverative (H4)	
	WT	$\beta 2^{-/-}$	WT	$\beta 2^{-/-}$	WT	$\beta 2^{-/-}$	WT	$\beta 2^{-/-}$
0 s	5.2 \pm 1.4	5.6 \pm 1.6	8.7 \pm 1.3	9.4 \pm 2.4	3.15 \pm 0.7	6.8 \pm 3.5	4.8 \pm 1.1	7.5 \pm 1.7
10 s	4.8 \pm 2.1	5.2 \pm 1.2	7.4 \pm 2.1	9.1 \pm 3.0	4.5 \pm 1.0	4.7 \pm 1.4	13.1 \pm 3.1	10.4 \pm 1.4
20 s	8.2 \pm 2.7	5.1 \pm 1.7	10.2 \pm 2.1	9.2 \pm 3.3	7.5 \pm 1.3	5.6 \pm 1.7	18.3 \pm 3.2	11.4 \pm 2.3
30 s	17.4 \pm 5.8	9.1 \pm 4.0	9.8 \pm 1.8	7.7 \pm 2.5	11.9 \pm 2.4	7.5 \pm 1.7	17.5 \pm 4.4	10.3 \pm 2.2
40 s	24.5 \pm 4.9	16.5 \pm 6.4	9.5 \pm 1.7	9.8 \pm 3.4	16.5 \pm 2.9	11.0 \pm 2.4	14.0 \pm 3.0	8.0 \pm 1.1
50 s	44.1 \pm 10.1	17.1 \pm 6.0	10.7 \pm 2.1	6.6 \pm 1.7	18.1 \pm 4.5	10.4 \pm 1.8	12.6 \pm 3.3	7.9 \pm 1.4
60 s	60.1 \pm 12.7	29.0 \pm 10.4	9.8 \pm 1.6	8.8 \pm 1.4	24.2 \pm 3.8	14.4 \pm 1.8	8.2 \pm 1.5	6.7 \pm 1.6
90 s	91.5 \pm 20.5	31.2 \pm 10.6	7.6 \pm 1.5	6.6 \pm 4.7	33.9 \pm 5.6	15.5 \pm 3.5	9.8 \pm 2.0	7.5 \pm 1.7

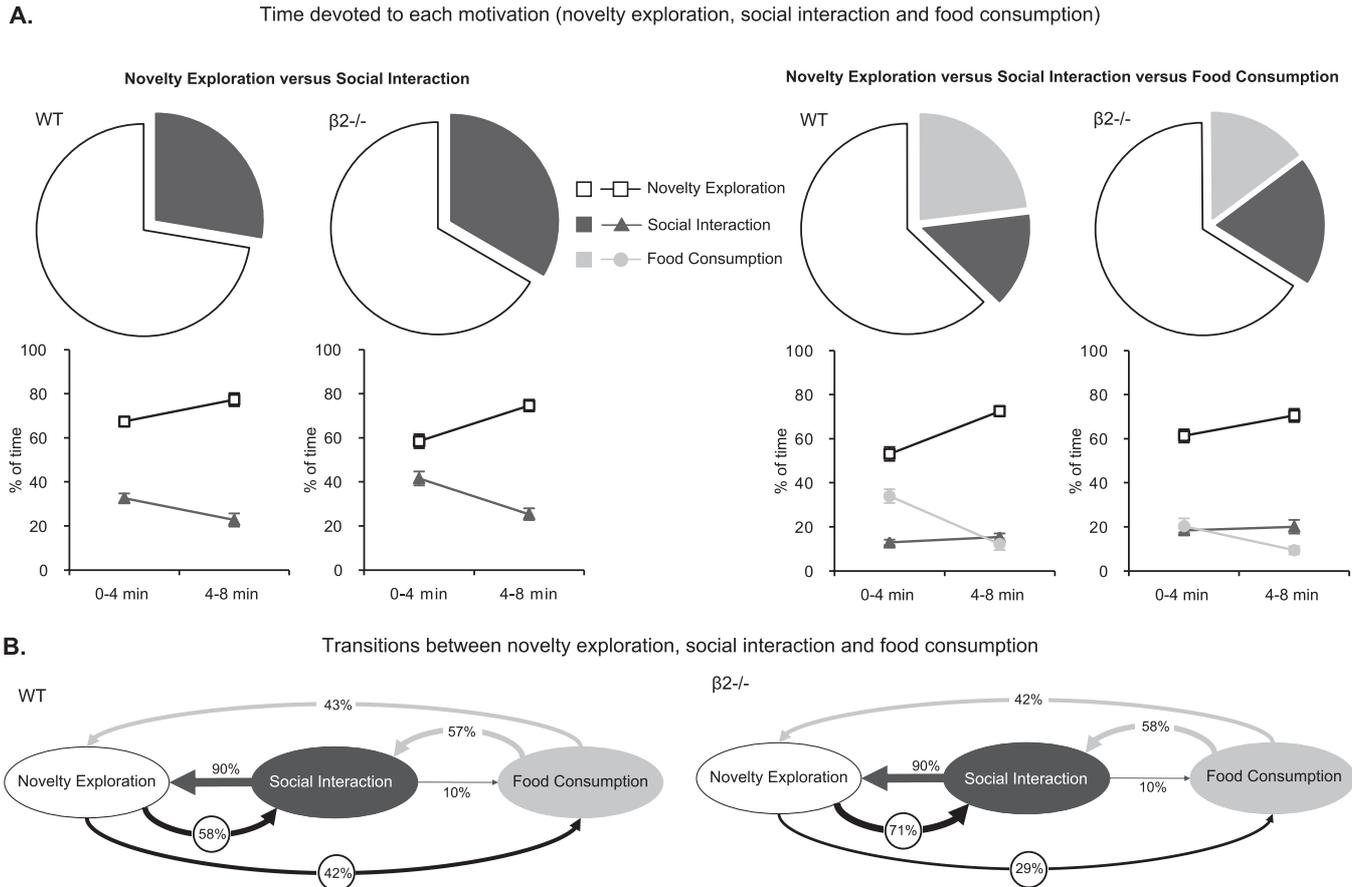


Fig. 6. A. Repartition (top) and evolution (bottom) of the time devoted to social versus novelty exploration (left panels) and of the time devoted to social versus novelty exploration versus food consumption (right panels) in WT and $\beta 2^{-/-}$ mice. B. Percentages of transitions made between each motivational state for WT (left) and $\beta 2^{-/-}$ mice (right).

tion while WT mice exhibited more balanced choices (see Fig. 6B). Novelty exploration was always the preferred motivation, i.e., the most represented quantitatively, in both $\beta 2^{-/-}$ and WT mice and it increased with time in all experimental conditions. This further supports the notion that $\beta 2^{-/-}$ mice do not exhibit a lack of interest for novelty exploration *per se* [14,18] but suffer from a lack of behavioural organization [17], strongly modulated by the reward system [15,16].

We further show here that social interaction evolved similarly with time in WT and $\beta 2^{-/-}$ mice: when novelty competed only with the social motivation, both genotypes exhibited a decrease for the social motivation. However, when, food, novelty, and social motivations competed, social motivation remained stable with time in both genotypes while food motivation similarly decreased. We collected additional data (not shown) showing that social interaction *per se* was not altered in $\beta 2^{-/-}$ mice. Indeed, when experimental animal was not isolated before the social task, $\beta 2^{-/-}$ and WT mice exhibited identical social interaction time (*t*-test for genotype effect, time spent in social interaction for the first 4 min of the experiment: $t=1.22$, $p=0.24$, $df=16$, NS and the last 4 min of the experiment: $t=0.89$, $p=0.39$, $df=16$, NS). We know from previous work that $\beta 2^{-/-}$ mice do not exhibit food reward problems, as they preferred food reward to novelty in a maze learning task [14]. This has been also evidenced here in the delay reward choice task and in the T-maze discrimination procedure.

Altogether, these data show that $\beta 2^{-/-}$ mice do not show constitutive impairment in any of these motivations *per se* but rather lack

the ability to integrate motivational information for behavioural planning.

Our current data provide evidence for an important role of $\beta 2^*$ nAChRs in tasks involving motivation ranking.

More generally, the behavioural particularities of $\beta 2^{-/-}$ mice cannot be accounted for by a general lack of impulsivity control, either motor or cognitive, but could be explained by an inappropriate balance between concurrent motivations or in the switch between them. We evidenced here that this balance is context dependent, and is independent of the coding of different values of the same reinforcement.

The adequate integration of reward and decision-related information provided by the environment is critical for behavioural success and is impaired in many psychiatric disorders [40,41]. Goal-directed behaviours represent the foundation upon which the motivation-behaviour structure is built [33,42]. Motivational repertoires have long been proposed to provide links between successive behavioural responses [42]. The switch or shift between actions or strategies has been shown to involve prefrontal regions [43,44,45, review in 46] whereas reward features are mediated by the meso-cortico-limbic circuits [47,48, review in 49] and specific prefrontal subareas [40,49,50]. The role $\beta 2^*$ nAChRs at the interface of motivation and decision, shown here for the first time, remains to be fully understood. The development of behavioural tasks specific to mice constitutes unique tools for the understanding of molecular bases of such processes impaired in psychiatric disorders [22,51–54].

Acknowledgments

This work was supported by a post-doc grant to SVS by the French Association pour la recherche sur les Nicotinanées, a PhD grant to PS from the French Ministry of Research – Doctoral school ED3C Université Pierre & Marie Curie, and a Master E grant from Biocortech to JC. The CNRS, the Institut Pasteur, an ANR grant and an Excellence chair to SG from Université Paris Sud 11 supported this research.

References

- [1] Le Novère N, Corringier P, Changeux J. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 2002;53:447–56.
- [2] Changeux J, Edelstein SJ. Nicotinic acetylcholine receptors: from molecular biology to cognition. New York: Odile Jacob; 2005.
- [3] Saba W, Valette H, Granon S, Xiao Y, Kellar KJ, Dollé F, et al. [18f]zw-104, a new radioligand for imaging alpha2-alpha3-alpha4/beta2 central nicotinic acetylcholine receptors: evaluation in mutant mice. *Synapse* 2010;64:570–2.
- [4] Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, et al. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 1989;284:314–35.
- [5] Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM, et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 1998;391:173–7.
- [6] Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Léna C, Le Novère N, de Kerchove d'Exaerde A, et al. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 1999;398:805–10.
- [7] Grabus SD, Martin BR, Brown SE, Damaj MI. Nicotine place preference in the mouse: influences of prior handling, dose and strain and attenuation by nicotinic receptor antagonists. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;184:456–63.
- [8] David V, Besson M, Changeux J, Granon S, Cazala P. Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic d1 receptors. *Neuropharmacology* 2006;50:1030–40.
- [9] Besson M, Granon S, Mameli-Engvall M, Cloëz-Tayarani I, Maubourguet N, Cormier A, et al. Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:8155–60.
- [10] Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:482–91.
- [11] Picciotto MR, Zoli M, Léna C, Bessis A, Lallemand Y, Le Novère N, et al. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotinic receptor in the brain. *Nature* 1995;374:65–7.
- [12] Zoli M, Picciotto MR, Ferrari R, Cocchi D, Changeux JP. Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. *EMBO J* 1999;18:1235–44.
- [13] Wiklund A, Granon S, Faure P, Sundman E, Changeux J, Eriksson LI. Object memory in young and aged mice after sevoflurane anaesthesia. *Neuroreport* 2009;20:1419–23.
- [14] Granon S, Faure P, Changeux J. Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9596–601.
- [15] Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux J, et al. Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 2005;436:103–7.
- [16] Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, et al. Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15991–6.
- [17] Maubourguet N, Lesne A, Changeux J, Maskos U, Faure P. Behavioral sequence analysis reveals a novel role for beta2* nicotinic receptors in exploration. *PLoS Comput Biol* 2008;4:1–11.
- [18] Avale ME, Chabout J, Pons S, Serreau P, De Chaumont F, Olivo-Marin JC, et al. Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J* 2011;25:2145–55.
- [19] Evenden JL. Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;146:348–61.
- [20] Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:771–84.
- [21] Dalley JW, Fryer TD, Brichard L, Robinson ESJ, Theobald DEH, Lääne K, et al. Nucleus accumbens d2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 2007;315:1267–70.
- [22] Fineberg NA, Potenza MN, Chamberlain SR, Berlin HA, Menzies L, Bechara A, et al. Probing compulsive and impulsive behaviors, from animal models to endophenotypes: a narrative review. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:591–604.
- [23] Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ. Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 2001;292:2499–501.
- [24] Adriani W, Laviola G. Elevated levels of impulsivity and reduced place conditioning with d-amphetamine: two behavioral features of adolescence in mice. *Behav Neurosci* 2003;117:695–703.
- [25] Winstanley CA, Theobald DEH, Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW. Double dissociation between serotonergic and dopaminergic modulation of medial prefrontal and orbitofrontal cortex during a test of impulsive choice. *Cereb Cortex* 2006;16:106–14.
- [26] Bourgeron T, Jamain S, Granon S. Animal models of autism: focus on genetic models and behavioral test paradigms. In: Fisch GS, Flint J, editors. *Transgenic and knockout models of neuropsychiatric diseases*. Humana Press Inc; 2006.
- [27] Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K, Granon S, Boretz S, Varoqueaux F, et al. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1710–5.
- [28] Walton ME, Bannerman DM, Rushworth MFS. The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci* 2002;22:10996–1003.
- [29] Walton ME, Bannerman DM, Alterescu K, Rushworth MFS. Functional specialization within medial frontal cortex of the anterior cingulate for evaluating effort-related decisions. *J Neurosci* 2003;23:6475–9.
- [30] Floresco SB, Ghods-Sharifi S. Amygdala-prefrontal cortical circuitry regulates effort-based decision making. *Cereb Cortex* 2007;17:251–60.
- [31] Ursin H. Press stop to start: the role of inhibition for choice and health. *Psychoneuroendocrinology* 2005;30:1059–65.
- [32] Bickel WK, Miller ML, Yi R, Kowal BP, Lindquist DM, Pitcock JA. Behavioral and neuroeconomics of drug addiction: competing neural systems and temporal discounting processes. *Drug Alcohol Depend* 2007;90(Suppl. 1):S85–91.
- [33] Chambers RA, Bickel WK, Potenza MN. A scale-free systems theory of motivation and addiction. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:1017–45.
- [34] Körding K. Decision theory: what should the nervous system do? *Science* 2007;318:606–10.
- [35] Hoyle E, Genn RF, Fernandes C, Stolerman IP. Impaired performance of alpha7 nicotinic receptor knockout mice in the five-choice serial reaction time task. *Psychopharmacology (Berl)* 2006;189:211–23.
- [36] Robinson ESJ, Eagle DM, Economidou D, Theobald DEH, Mar AC, Murphy ER, et al. Behavioural characterisation of high impulsivity on the 5-choice serial reaction time task: specific deficits in 'waiting' versus 'stopping'. *Behav Brain Res* 2009;196:310–6.
- [37] Johnson MW, Bickel WK. The behavioral economics of cigarette smoking: the concurrent presence of a substitute and an independent reinforcer. *Behav Pharmacol* 2003;14:137–44.
- [38] Isles AR, Humby T, Walters E, Wilkinson LS. Common genetic effects on variation in impulsivity and activity in mice. *J Neurosci* 2004;24:6733–40.
- [39] Besson M, Suarez S, Cormier A, Changeux J, Granon S. Chronic nicotine exposure has dissociable behavioural effects on control and beta2-/- mice. *Behav Genet* 2008;38:503–14.
- [40] Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8:1481–9.
- [41] McEvoy PM, Nathan P. Perceived costs and benefits of behavioral change: reconsidering the value of ambivalence for psychotherapy outcomes. *J Clin Psychol* 2007;63:1217–29.
- [42] McFarland DJ, Sibly RM. The behavioural final common path. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1975;270:265–93.
- [43] Shafritz KM, Kartheiser P, Belger A. Dissociation of neural systems mediating shifts in behavioral response and cognitive set. *Neuroimage* 2005;25:600–6.
- [44] Kim J, Ragozzino ME. The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiol Learn Mem* 2005;83:125–33.
- [45] Block AE, Dhanji H, Thompson-Tardif SF, Floresco SB. Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting. *Cereb Cortex* 2007;17:1625–36.
- [46] Granon S, Floresco SB. Functional neuroanatomy of flexible behaviors in mice and rats. In: Granon S, editor. *Endophenotypes of psychiatric and neurodegenerative disorders in animal models*. Transworld Research Network; 2009. p. 83–103.
- [47] Dreher J, Kohn P, Berman KF. Neural coding of distinct statistical properties of reward information in humans. *Cereb Cortex* 2006;16:561–73.
- [48] Ito M, Doya K. Validation of decision-making models and analysis of decision variables in the rat basal ganglia. *J Neurosci* 2009;29:9861–74.
- [49] Haber SN, Knutson B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:4–26.
- [50] Kounieher F, Charron S, Koehlin E. Motivation and cognitive control in the human prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2009;12:939–45.
- [51] Minassian A, Paulus M, Lincoln A, Perry W. Adults with autism show increased sensitivity to outcomes at low error rates during decision-making. *J Autism Dev Disord* 2007;37:1279–88.
- [52] Luman M, Oosterlaan J, Knol DL, Sergeant JA. Decision-making in ADHD: sensitive to frequency but blind to the magnitude of penalty? *J Child Psychol Psychiatry* 2008;49:712–22.
- [53] Heerey EA, Bell-Warren KR, Gold JM. Decision-making impairments in the context of intact reward sensitivity in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008;64:62–9.
- [54] Koob GF. New dimensions in human laboratory models of addiction. *Addict Biol* 2009;14:1–8.

Computerized video analysis of social interactions in mice

Fabrice de Chaumont¹, Renata Dos-Santos Coura², Pierre Serreau^{2,3}, Arnaud Cressant², Jonathan Chabout², Sylvie Granon^{2,4} & Jean-Christophe Olivo-Marin^{1,4}

The study of social interactions in mice is used as a model for normal and pathological cognitive and emotional processes. But extracting comprehensive behavioral information from videos of interacting mice is still a challenge. We describe a computerized method and software, MiceProfiler, that uses geometrical primitives to model and track two mice without requiring any specific tagging. The program monitors a comprehensive repertoire of behavioral states and their temporal evolution, allowing the identification of key elements that trigger social contact. Using MiceProfiler we studied the role of neuronal nicotinic receptors in the establishment of social interactions and risk-prone postures. We found that the duration and type of social interactions with a conspecific evolves differently over time in mice lacking neuronal nicotinic receptors (*Chrn2*^{-/-}, here called $\beta 2^{-/-}$), compared to C57BL/6J mice, and identified a new type of coordinated posture, called back-to-back posture, that we rarely observed in $\beta 2^{-/-}$ mice.

A long-standing and fundamental question in neuroscience is whether, and if so, how, the uncertainty generated by new situations affects the brain's perception and the resulting behavioral choices and learning patterns. Making a choice involves multiple neural systems such as those implicated in the evaluation of reward, memory and emotions. Distortions in the psychological metrics that influence choices are observed in psychiatric disorders such as addictive behaviors, depression, impulsive and personality disorders^{1,2}. Mice that show dysfunctional choices can constitute models of this aspect of the pathology. As more mouse strains become available for the study of the molecular basis of complex brain processes, we need efficient behavioral methods that reflect and encompass the behavioral complexity that integrative brain processes can generate³. One of the central issues when analyzing complex behaviors in animal models is the capacity to capture their unfolding. With time, some behaviors become more frequent whereas others become less frequent or stop, and their temporal dynamics reflect the way internal and external stimuli are integrated and memorized. The understanding of this temporal evolution of behaviors can give access to the animal's way of processing of information.

During social interactions, mice make multiple and fast behavioral changes and exhibit a rich behavioral repertoire that integrates information coming from their own motivations and emotions as well as from the behavior of the conspecific. It is common to characterize social behaviors in mice by visually analyzing videos of interacting mice⁴⁻⁷. However, human visual inspection cannot follow complex sequential behaviors performed concurrently by two mice: the large number of criteria to be observed simultaneously and the precision required saturate the capacity of human analysis. Prior work⁸⁻¹¹ has addressed this problem by applying computer-vision methods that automatically track multiple animals⁹⁻¹¹ (ants and fruit flies) and their body parts⁸ simultaneously and enable the study of the relative positions and interactions between the animals⁹⁻¹¹. However, existing methods to track mice do not make use of a priori knowledge when tracking the mouse body parts and cannot therefore deal with situations when two mice are in close contact, for example. We developed a mouse-tracking method and software that provides information concerning the position, orientation, distance and speed of each mouse's body part and can resolve interacting mice that are in close contact^{12,13}. Using this low-level geometrical and positional data, we categorized behavioral states and monitored their temporal evolution. With this information, we built hierarchical spatiotemporal data representations in the form of chronograms and motivation graphs, and merged behavioral data with data from the field of view of the mice. This approach can help uncover which elements of the distal and proximal space mice take into account when making behavioral choices.

To validate MiceProfiler we compared social interactions between mice with high levels of affiliative social behaviors (C57BL/6J mice) and mice with high levels of aggressiveness (129SV and DBA2 strains). We then compared social interactions in C57BL/6J mice and knockout mice that lack the gene coding for the neuronal nicotinic receptor containing the beta2 subunit ($\beta 2^{-/-}$). We found that the duration and type of social interactions evolved differently over time in these two mouse strains and identified a new type of coordinated posture, called back-to-back posture, that we rarely observed in $\beta 2^{-/-}$ mice. By representing the temporal

¹Institut Pasteur, Unité d'Analyse d'Images Quantitative, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 2582, Paris, France. ²Centre de Neurosciences Paris Sud XI, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8195, Université Paris Sud 11, Orsay, France. ³Institut Pasteur, Unité de Neurosciences Intégrative des Systèmes Cholinergiques, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité de Recherche Associée 2128, Paris, France. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to J.-C.O.-M (jcolivo@pasteur.fr) or S.G. (sylvie.granon@u-psud.fr).

RECEIVED 13 JULY 2011; ACCEPTED 10 FEBRUARY 2012; PUBLISHED ONLINE 4 MARCH 2012; DOI:10.1038/NMETH.1924

sequence of events as decision graphs, we identified key elements that triggered or interrupted social contact between the mice.

RESULTS

Automated tracking of mouse behaviors

We defined a model of a mouse through a set of geometrical primitives linked by physical constraints and used physics engines to solve the adaptation of the model's parts to the moving mouse (Fig. 1a,b, Online Methods, Supplementary Notes 1–3 and Supplementary Figs. 1–4). Two touching mice are tracked¹⁴ simultaneously and explicitly distinguished in case of contacts by collision detection strategies, with precise detection of contact points and timing (Fig. 1c–h, Online Methods and Supplementary Note 1). We named this tracking solution MiceProfiler and implemented it in a specific plugin running on the Icy platform (Online Methods, Supplementary Note 1, Supplementary Software and <http://icy.bioimageanalysis.org/>); MiceProfiler is distributed under a GNU General Public License. For tracking, we placed two adult male mice of the same strain and age in a new environment (a transparent rectangular cage) with clean bedding. One of them (called the isolated-host mouse), previously reared alone in its home cage for 3 weeks was placed in the new environment for 30 min and allowed to explore it freely. The other one (called the social-visitor mouse), previously reared in a 'social' cage with three other conspecifics, was introduced in the environment for 8 min. Using this approach we constructed a repertoire of social interactions that occur between two adult mice and quantified in real time the chronogram of actions executed by the two mice during their interaction (Fig. 1i,j). This enabled us to automatically distinguish which mouse initiates an action, the type of action and the response from the conspecific as well as the duration of each action and its temporal evolution. From the tracking of mouse position, speed and motion before social contact, we extracted antecedents of relevant behavioral events. We also obtained physical geometric information about the orientation of a mouse's head from which we computed its visual field (Online Methods) and correlated visual cues with behavioral sequences (Fig. 1h). We summarized the timeline of the social interactions between the two mice using chronograms (Online Methods and Supplementary Fig. 1).

Behavioral repertoire of social interactions in mice

Using the social interaction paradigm introduced above and the MiceProfiler software we established a comprehensive repertoire of mouse behaviors during affiliative social interaction (Fig. 1i). This repertoire is composed of contact and position events 1–10 that have been described previously^{15–17} and more elaborate events 11–25 that originate from the analysis of chronograms such as the one displayed in Figure 1j.

The contact events 1–6 are defined as any position in which mice are at whiskers distance or less apart. During contact events mice show 'affiliative' behaviors that include different types of contact, that is, oral-oral, oral-genital and side-by-side contacts.

Relative position events 7–10 are defined by the posture that the mice have *vis-à-vis* each other without touching. Within these, we identified one particular type of behavior in which both mice are looking in opposite directions, are relatively static (motion speed less than 1.75 cm s^{-1} (0.15 pixels frame)), are not touching each other (>3 cm apart) and have their heads at an angle of 0.5 radius

that does not allow them to see each other. This posture, hereafter called back-to-back posture, requires that both mice tolerate each other without seeing each other.

Dynamic events 11–25 are subcategorized into three types. First-order events 11–15 encompass a single continuous and consistent move of one mouse toward, away or following the other. They are defined by the relative speed of movement and evolution of the distance between the two mice. These events distinguish when the movements are made by each mouse (isolated-host mouse or social-visitor mouse). Second-order events 16–19 encompass the temporal concatenation of two events: a first-order event is followed by a contact event that is different from the one occurring at the beginning of the sequence. They identify separately which mouse initiated an approach that lead to a contact or which mouse terminated a contact. Third-order events 20–25 encompass two successive second-order events and comprise five states. They identify approaches made by one or the other mouse that are followed by contact and which mouse initiates an escape thereafter. They also take into account whether the mouse that does not initiate the escape moves or not.

The complexity of the events above, especially events 8–25, makes it extremely hard for a human operator to identify and label these types of behavior in a consistent and reproducible manner within practical and reasonable time limits mainly for three reasons: (i) the events often span a large field of view, making it difficult to concentrate simultaneously on different locations (for example, events 8–10 require monitoring both mice while they can be in opposite positions in the cage); (ii) they may require the precise evaluation of quantitative values such as absolute or relative speeds and angles (for example, events 12–15 require the relative speed of the mice to be determined with accuracy, irrespective of the location or duration of the scene); (iii) some events result from the temporal and/or logical concatenation of the previous ones, thus increasing the complexity of the analysis (for example, event 15 is the logical concatenation of events 5 and 8 conditioned on a distance threshold).

Validation of the method and the MiceProfiler software

To validate the model and the software, we first compared results from this system with those obtained by human visual inspection¹⁵. We compared social behaviors between two interacting C57BL/6J mice (isolated-host mouse and social-visitor mouse) and an isolated-host $\beta 2^{-/-}$ mouse with a C56BL/6J social-visitor mouse. We focused on these mice because we have previously studied their social and exploratory behaviors in detail using manual approaches and because mice with C57BL/6J background do not exhibit aggressive tendencies. We looked at the two main social interaction parameters known to differ substantially between C57BL/6J mice and $\beta 2^{-/-}$ mice: the time spent in social contact and the number of 'follow' behaviors that are non-aggressive pursuits that end with a social contact from the isolated-host mouse toward the social-visitor mouse^{15–18}. We also included in our analysis two mouse strains that show more aggressive and less affiliative behaviors compared to C57BL/6J mice, the 129SV and DBA2 strains. Duration of social contacts and number of follow behaviors were analyzed manually by two different experimenters and by the MiceProfiler (Fig. 2). To assess the performances of the tracker and measure the quality of the tracking, we used a metric¹⁹ based on counting the number of interventions or corrections

made by the operator during the automatic tracking. This metric is well adapted to supervised tasks, as it scores the differences in opinion between the computer method and the expert. It should be noted that the number of interventions (see **Supplementary Fig. 5** for data for each strain) is directly related to the complexity of the scenes (that is, propensity of the mice to mount, fight or

crawl under or over one another; see **Supplementary Note 3** for a discussion of the method's limitations).

The duration of contacts data showed that both experimenters obtained similar results either between them or when compared to the automatic software MiceProfiler. In contrast, MiceProfiler captured a higher number of follow behaviors than the manual

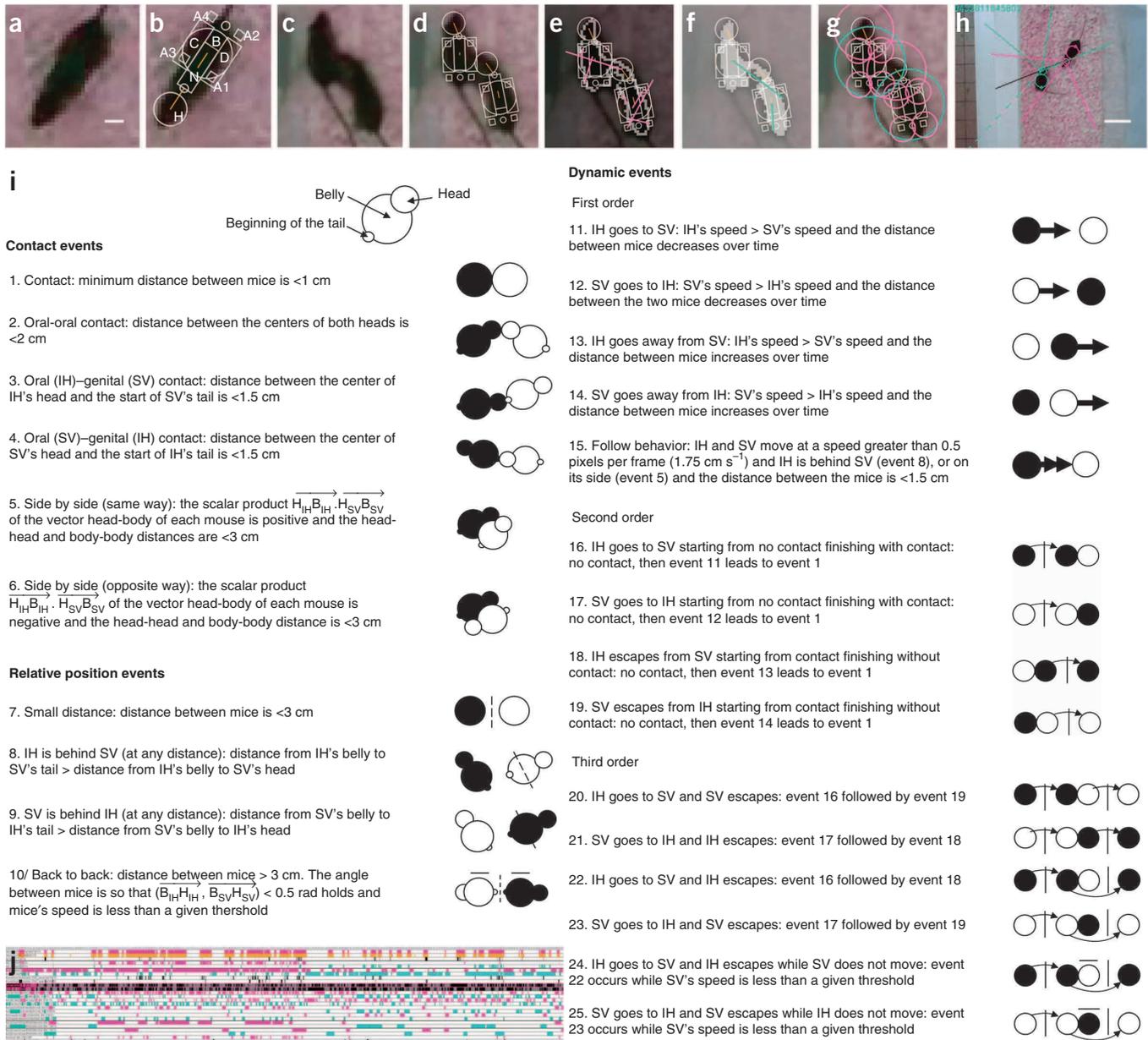


Figure 1 | Physics model and repertoire of social interaction. **(a)** Image of a tracked mouse. **(b)** Superposition of the physics model of a mouse on the image in **a**. H, B and N mark the mouse's head, belly and neck, respectively. The neck can slide along the belly, constrained between parts C and D, to account for elongation or contraction of the mouse; a sliding joint restricts the distance between belly and neck; head and neck are linked by a distance joint. A1–A4 are anchors that drive the model with respect to the edges. **(c–g)** Image of two mice that are touching and superimposition of the physics model **(d)**, of the edge map and the force vectors applied to H and A1–A4 **(e)**, of the map computed from the mouse imprint and force vectors applied to the bellies **(f)** and of the area of attraction of anchors **(g)**. **(h)** Image generated by MiceProfiler representing a frame from the video of an experiment. The video is overlaid with data: head position, beginning of the tail and the belly. The color reflects the identity of each mouse. The black line represents the current position of the head in the field of view of one mouse toward the conspecific. The three green and red lines reflect the current coordinate system of the field of view of both mice. Lines are drawn for -60° , 0° and 60° . We displayed the 60° lines because the center of the field of vision of each eye is at 60° . Scale bars, 1 cm **(a–g)** and 10 cm **(h)**. **(i)** Repertoire of social interaction events between isolated-host mouse (IH; black symbols) and social visitor mouse (SV; white symbols). **(j)** Example repertoire representing all the labeled events of one experiment with two C57BL/6J mice over the 8 min of experimentation (1 event per line). The two dark lines in the middle reflect the speed of both mice (three thresholds from stopped to slow and fast in black, light gray and dark gray, respectively).

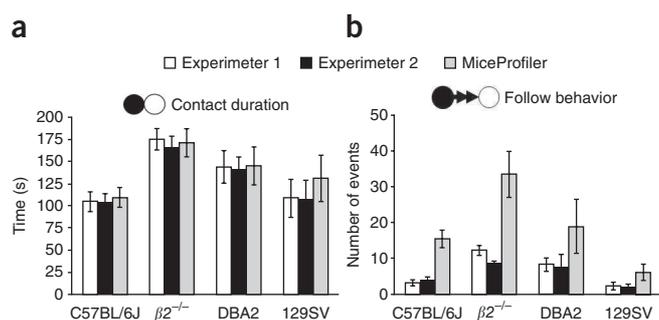


Figure 2 | Comparison of manual and automatic tracking using MiceProfiler. (a,b) Two independent experimenters and MiceProfiler (gray bars) scored the duration of social contacts and of follow behaviors in C57BL/6J ($n = 9$), DBA2 ($n = 5$) and 129SV ($n = 6$) mouse strains as well as in $\beta 2^{-/-}$ mice ($n = 7$). Error bars, s.e.m.

analysis (Fig. 2). This difference might be due to the fact that the estimation of the start and end of a follow event, although consistent within and between experimenters, is quite subjective. In contrast, the software uses fixed distance thresholds.

Study of social behaviors in C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice

We compared contact, relative position and dynamic behaviors in interacting C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice and quantitatively assessed their number, duration and temporal evolution using the MiceProfiler software (Figs. 3 and 4). To quantify the number and duration of events, we looked at two time periods (0–4 min and 4–8 min), because in our previous experiments, we have shown that a 4-min period is both necessary and sufficient for male mice to initiate nonaggressive social contacts¹⁸. By increasing this period, we here aim to measure how behavioral sequences evolve with time.

We found that $\beta 2^{-/-}$ mice make a similar number of social contacts compared to C57BL/6J mice (genotype effect: $F < 1$, $P = 0.6$) (Fig. 3a), but they overall spend more time in these interactions with the new conspecific (genotype effect: $F_{(1,14)} = 26.5$, $P < 0.0001$) both from 0 min to 4 min ($P = 0.0003$) and from 4 min to 8 min ($P = 0.0001$) (Fig. 3b), in agreement with our previous results¹⁸. Moreover, when distinguishing between the different types of social contacts, we found that $\beta 2^{-/-}$ mice spent longer durations of time in oral-oral, oral-genital and side-by-side contacts than C57BL/6J mice, particularly at the later time points analyzed (0–4 min: oral-oral, $P = 0.1$; oral-genital, $P = 0.09$; side-by-side, $P = 0.05$; and 4–8 min: oral-oral, $P = 0.02$; oral-genital, $P = 0.0002$; side-by-side, $P = 0.001$). (Fig. 3c). We represented the temporal evolution of all contact behaviors in the two mice as plots and chronograms (Fig. 3d). These show that the time span devoted to contact behavior evolves with time, particularly in C57BL/6J mice. This significant decrease reflects the spontaneous normal extinction of flexible behaviors owing to habituation¹⁵. By contrast, $\beta 2^{-/-}$ mice showed a milder decrease in the time span devoted to social interactions (Fig. 3d) and exhibited a steady interest for the conspecific (genotype effect, $F_{(1,14)} = 26.8$, $P < 0.0001$; time effect, $F_{(11,154)} = 10.34$, $P < 0.0001$; interaction genotype \times time, $F_{(11,154)} = 2.06$, $P = 0.02$). In addition, $\beta 2^{-/-}$ mice showed marked differences in the number (0–4 min, $P = 0.01$; 4–8 min, $P = 0.001$), duration (0–4 min, $P = 0.01$; 4–8 min, $P = 0.001$) and temporal evolution (Fig. 3e–g) of follow behaviors compared to C57BL/6 mice (genotype effect,

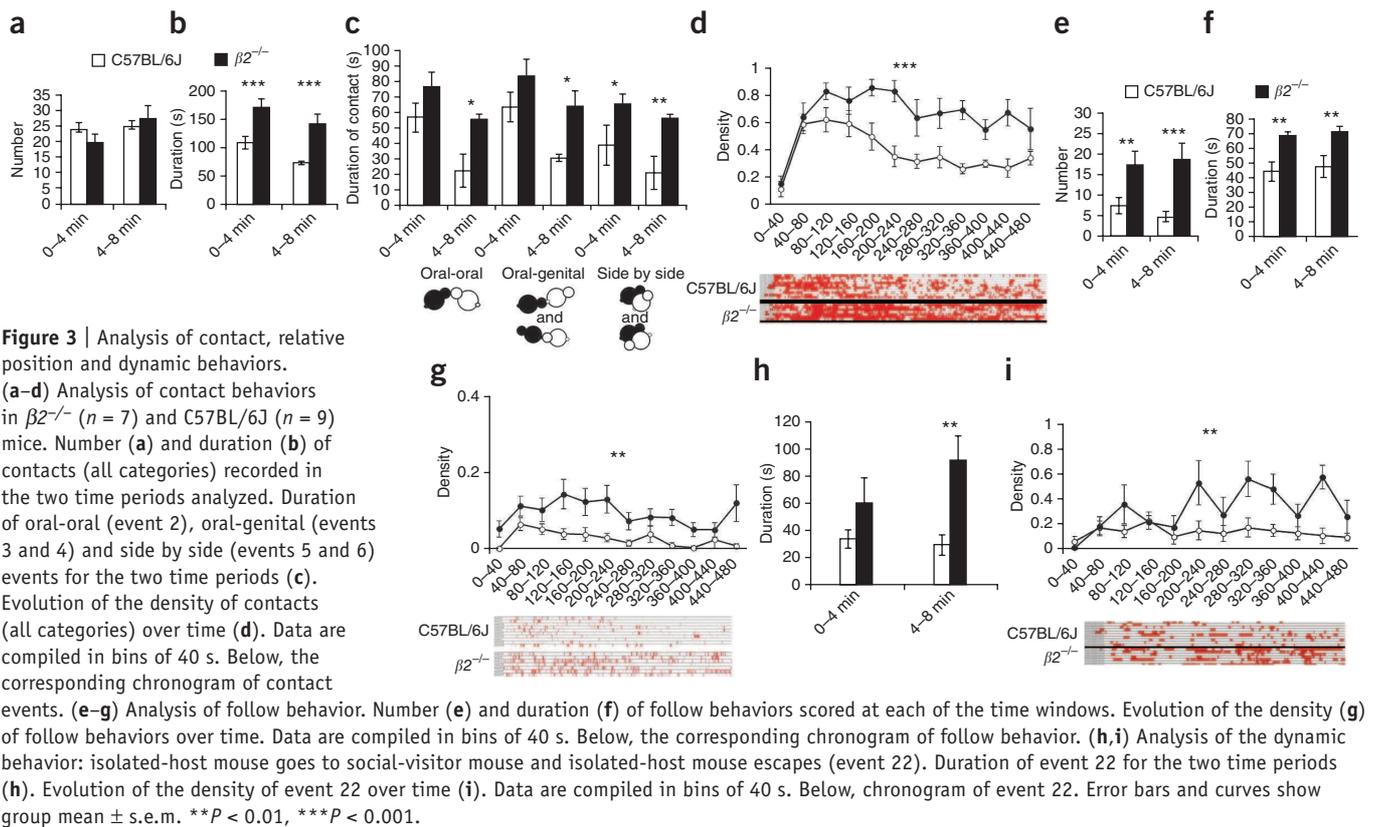
$P = 0.0003$). Temporal analysis showed that the time spent in follow behaviors also decreased regularly for C57BL/6J mice from the second minute of the experiment whereas it did not decrease for $\beta 2^{-/-}$ mice (Fig. 3g; significant genotype effect ($F_{(1,14)} = 22.4$, $P = 0.0003$), time effect ($F_{(11,154)} = 3.1$, $P = 0.0007$) and no significant interaction genotype \times time ($F_{(11,154)} = 1.2$, NS). Approaches from the rear (follow behaviors) typically elicit fight or escape¹⁶. As reported previously¹⁸, we rarely observed any fights either between C57BL/6J or $\beta 2^{-/-}$ mice.

We then studied third-order events and in particular the isolated-host mouse approaches followed by social-visitor escapes after contact (event 22; Fig. 1i). This behavior showed marked differences between C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice either for its frequency (data not shown; genotype effect, $F_{(1,14)} = 15.6$, $P = 0.001$; time effect, $F_{(1,14)} = 7.3$, $P = 0.02$; interaction genotype \times time, $F_{(1,14)} = 7.5$, $P = 0.02$), duration (Fig. 3h; genotype effect, $F_{(1,14)} = 8.2$, $P = 0.01$; time effect, $F_{(1,14)} = 3$; interaction genotype \times time, $F_{(1,14)} = 7.4$, $P = 0.02$) or evolution with time (Fig. 3i; genotype effect, $F_{(1,14)} = 8.7$, $P = 0.01$; time effect, $F_{(11,154)} = 3.5$, $P = 0.0004$; interaction genotype \times time, $F_{(11,154)} = 3.4$, $P = 0.0006$).

In accordance with previous studies^{15,18,20}, these results provide evidence that $\beta 2^{-/-}$ mice show signs of less behavioral flexibility and exhibit more stereotyped behaviors.

We then quantified the positions and types of behaviors of both mice *vis-à-vis* each other, in absence of any contact. We found that $\beta 2^{-/-}$ mice stayed longer than C57BL/6J mice at short distance from the conspecific (3 cm) even when there was no contact (time spent in close vicinity for the 8-min experiment, C57BL/6J, $3,842 \text{ s} \pm 173 \text{ s}$ (s.e.m.), $\beta 2^{-/-}$, $5,191 \text{ s} \pm 337$, genotype effect, $P = 0.0002$; data not shown). We then analyzed back-to-back postures in both mice (Fig. 4). This behavior was significantly increased in C57BL/6J mice as compared to $\beta 2^{-/-}$ mice in terms of duration (genotype effect, $F_{(1,14)} = 11.2$, $P = 0.002$; time effect, $F_{(1,14)} = 15.2$, $P = 0.002$; interaction genotype \times time $F_{(1,14)} = 8.2$, $P = 0.01$; *post hoc t-test* showed no significant genotype effect for 0–4 min: $P = 0.22$; and significant genotype effect for 4–8 min: $P = 0.007$). The density of back-to-back posture evolved differently with time in C57BL/6J mice and in $\beta 2^{-/-}$ mice (genotype effect, $F_{(1,14)} = 22.2$, $P = 0.0003$; time effect, $F_{(11,154)} = 3.5$, $P = 0.0002$; interaction genotype \times time, $F_{(11,154)} = 2.3$, $P = 0.01$). It progressively replaced or overlapped with contact events in C57BL/6J mice (Fig. 4c). In contrast in $\beta 2^{-/-}$ mice, both behavioral sequences evolved independently (Fig. 4d). These findings, first based on geometrical considerations, were confirmed by computing the visual field of each mouse and assessing the location of the conspecific within the visual field of a mouse (Online Methods). The back-to-back posture is a risk-prone posture and it provides the dyad with a full panoramic view of the external environment. This behavior, potentially associated with a collective vigilance pattern shown in other rodent and non-rodent species^{21,22}, was never observed in either 129SV or DBA2 strains that show low levels of affiliative contact (particularly for 129SV mice, Online Methods and Supplementary Fig. 6a–c), no temporal evolution of major behavioral sequences (Online Methods and Supplementary Fig. 6a–f) and higher level of aggressiveness compared to C57BL/6J mice (number of attacks for C57BL/6J, 0; for 129SV, 11.5 ± 6.3 ; DBA2, 5.8 ± 5.6 ; data not shown).

Finally, we also used the MiceProfiler software to quantify ‘stop’ events (instances in which the mice exhibit speeds inferior to



1.75 cm s⁻¹) and found that in $\beta 2^{-/-}$ mice, stop events were significantly shorter than in C57BL/6J mice (for the global 8-min experiment C57BL/6J, 204 s \pm 11 s; $\beta 2^{-/-}$, 129 s \pm 19 s; genotype effect, $P = 0.002$; data not shown).

Representation of mouse behavioral choices

We represented the entire behavioral choices made by each group of mice using a high-level graph representation of transitional behavioral graphs (Fig. 5a,b). This type of analysis summarizes the sequence of actions within a group, and represents the changes

between the beginning and the end of the experiment (Online Methods). It also integrates probabilistic information about the likelihood of a given event to be followed by others. This probabilistic prediction is intended to capture key events that participate in the choice of the subsequent action. These graphs can also integrate information from both C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ interactions to help analyze how the behaviors in the different mice differed (Fig. 5c–e).

This type of representation shows several differences between C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice and between isolated-host mice and social-visitor mice. For example, in isolated-host $\beta 2^{-/-}$ mice stop events were never followed by a complex third-order event such as approaching the social-visitor mice (event 20), and this only occurred if the conspecific social-visitor mouse has also made a stop. In contrast, isolated-host C57BL/6J mice initiated this approach behavior directly, after they

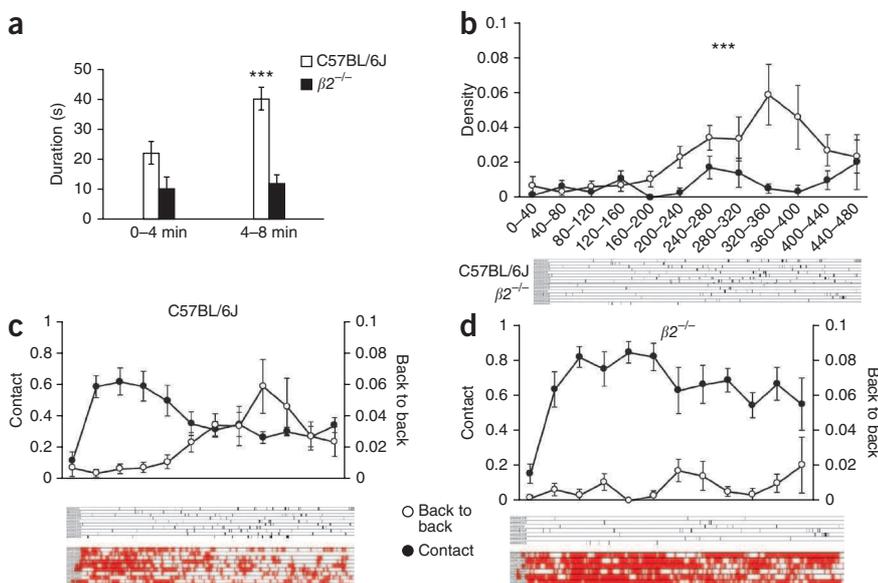


Figure 4 | Analysis of back to back postures. (a) Duration of back-to-back postures in C57BL/6J ($n = 9$) and $\beta 2^{-/-}$ ($n = 7$) mice. (b) Evolution of back-to-back postures over time. Data are compiled in bins of 40 s. Below, chronogram of back-to-back postures. (c,d) Temporal evolution of back-to-back postures represented together with contact events (all categories) in C57BL/6J mice (c) and in $\beta 2^{-/-}$ mice (d). Error bars and curves show group mean \pm s.e.m. $***P < 0.001$.

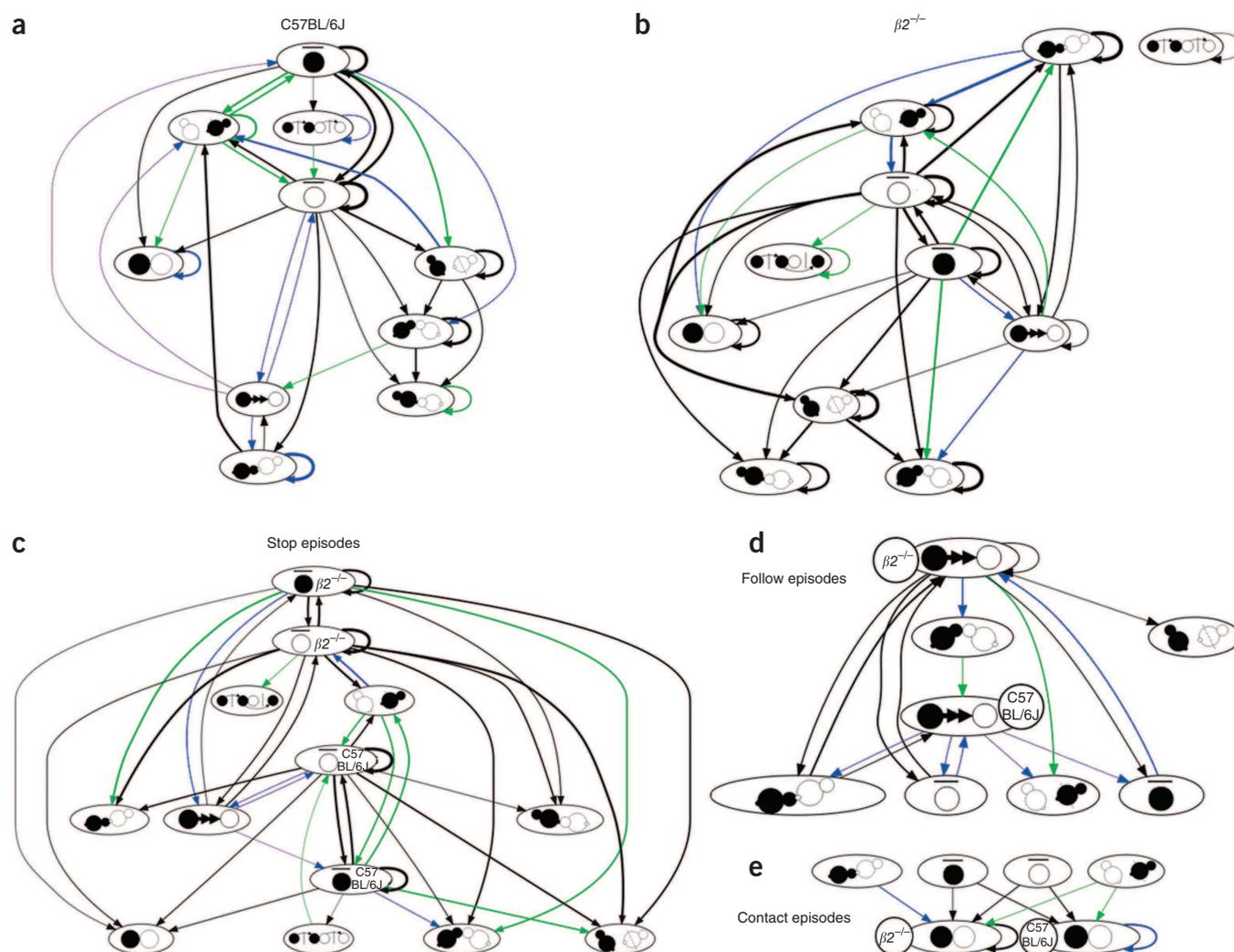


Figure 5 | Transitional behavioral graphs. **(a,b)** Compiled view of all mice and all event transitions for C57BL/6J ($n = 9$) **(a)** and $\beta 2^{-/-}$ ($n = 7$) **(b)**. Transitional graphs represent the probability of a mouse transitioning from one event to another. The arrows represent the string of events: preceding event to succeeding event. The transition is computed for the first 4 min and the last 4 min of the experiment. Black arrows represent events that occur steadily (with the same probability with an overlap of one sigma of their respective s.d.) for the first and the last 4 min. Colored arrows represent events that occur only in the first 4 min (blue) and the last 4 min (green). The thickness of the arrow is proportional to the probability of the event transition (see Online Methods). **(c–e)** Cross-linked transitional behavioral graphs for the major behavioral events or states for which C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice differed: stop **(c)**, follow **(d)** or contact **(e)** behaviors.

stopped (**Fig. 5a–c**). This suggests that stop events constitute behavioral choice points, as has been observed in exploratory behavior²³ and that C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice are likely to integrate differently in their decisions the actions performed by the conspecific, a pattern that is deficient in mice with a mutation associated with autistic-like disorder²⁴.

Follow behaviors had three different origins in C57BL/6J mice: oral-genital contact, oral-oral contact and social-visitor stop, and were themselves the origin of different behavioral sequences (**Fig. 5a,b,d**). In contrast, in $\beta 2^{-/-}$ mice, follow behaviors often induced further follow behaviors, supporting the hypothesis of the behavioral rigidity of $\beta 2^{-/-}$ mice.

Contact events originated from other contacts in C57BL/6J and in $\beta 2^{-/-}$ mice (**Fig. 5a,b,e**), thus creating a loop that suggests a repetitive interest and a strong motivation for establishing contacts with a new conspecific. This repetitive pattern ended,

however, after the first half of the experiments in C57BL/6J whereas it remained constant in $\beta 2^{-/-}$ mice.

Finally, we show how information about the visual field of the mice can be integrated into the analysis of a particular behavioral sequence. During follow behaviors, both C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ mice used only their central visual field (**Fig. 6a** and Online Methods) showing that both strains of mice used similar visual strategies for this behavior. In contrast, during stop sequences C57BL/6J mice used equally their left, right and central field of view (**Fig. 6b**), whereas $\beta 2^{-/-}$ mice used a larger central field of view than C57BL/6J and neglected the right side of their visual field (**Fig. 6b**). Note however, that the binocular field of view is 40% larger in $\beta 2^{-/-}$ mice than in C57BL/6J mice²⁵, and this anatomical difference could explain the different visual strategies used by both strains during stop sequences.

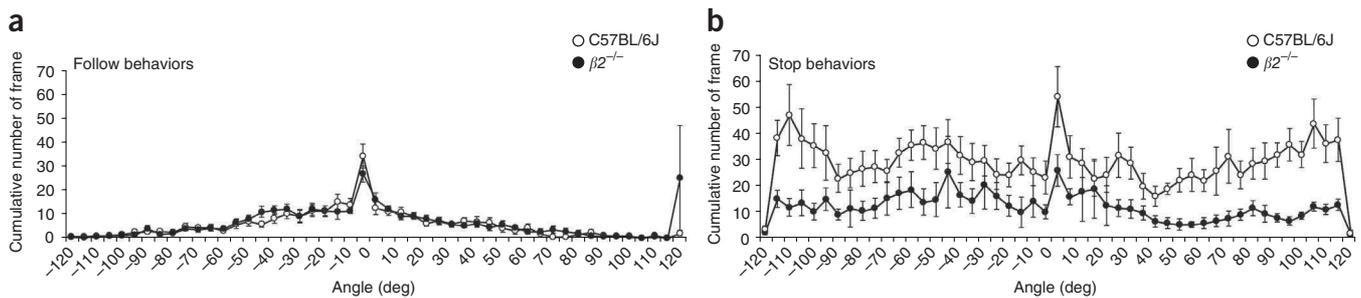


Figure 6 | Analysis of the mouse visual field of view during specific behaviors. (a,b) Field of view of isolated-host C57BL/6J ($n = 9$) and $\beta 2^{-/-}$ ($n = 7$) mice during follow (a) and stop (b) behaviors. x axis represents the angle of the vision field for the isolated-host mouse and y axis gives the cumulative number of frames during which the conspecific mouse is at any given position within the vision field. Error bars, s.e.m.

DISCUSSION

Here we presented software designed to score sequences of social interactions between two mice without the need to tag them. Like any other method, MiceProfiler does not cover all situations and some specific sequences may compromise the output of the tracking. For example, when the mice are in very close contact or partly overlap (one mouse is completely or partially on top of the other), the model might not be properly fitted, leading to swaps or early terminations. In that case, the possibility of a manual intervention is provided, and the operator can supervise the software and perform a frame-by-frame correction of the tracking by manually readjusting the position of the models over the mice. This tracking supervision may also be needed in case of fast movements, jumps or long-lasting rearings, when a mouse buries itself under the sawdust or in fights (Supplementary Note 3). However, in most cases, the method can cope with a certain degree of overlap between the tracked objects thanks to its built-in properties: if one part of a mouse is not visible at some point in the sequence (therefore making its attachment to a part of the model not possible), the physics engine will displace all the other parts in the model and drag the unlinked part with respect to the others.

In the current setup, we filmed mice with a camera located above the cage because the social behaviors we wish to characterize are easier to understand from a top view than from a side view. Also, because of the extension of the cage in the x - y plane, occlusions are much more likely to happen in a side view, impairing the automatic tracking. Future developments of MiceProfiler will combine top and side views to help resolve some of the challenging behavioral scenarios described above, in particular fights or crawl under or over.

Coupled with other techniques such as those that allow the recording of neuronal field potential²⁶, neurotransmitter release²⁷, or ultrasonic vocalizations²⁸ in behaving mice, our method is a unique tool for the study of decision-making and flexible behaviors as well as the temporal evolution of complex behaviors in mouse models of neurological disease. Identifying key points in action sequences might contribute to our understanding of cognitive processes that are altered in psychiatric disorders such as depression, schizophrenia or autism. Also, the generalization of automated methods for social behavior studies in mice could lead to a reduction in the number of mice used (Supplementary Note 4), thereby increasing the societal acceptance of such studies.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Methods website.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Institut Pasteur, by the Centre National de la Recherche Scientifique (URA 2582 and UMR 8195), by the Université Paris Sud 11 (Chaire d'Excellence to S.G., post-doctoral fellowship to R.D.-S.C. and PhD grant (Bourse de la Présidence) to J.C.), and the Université Paris 6 (PhD grant to P.S.). It was also supported in part by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLAN-0340-02 FLEXNEURIM).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.d.C. created the tracking and analysis methods, and developed the software. R.D.-S.C. and A.C. performed and analyzed experiments. P.S. and J.C. analyzed experiments. S.G. designed the behavioral repertoire, performed and analyzed experiments, and conducted statistical analyses. J.-C.O.-M. supervised the design of the tracking method. F.d.C., A.C., S.G. and J.-C.O.-M. conceived the project and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemethods/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Robbins, T.W. & Arnsten, A.F. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 267–287 (2009).
- Chandler, R.A., Wakeley, J., Goodwin, G.M. & Rogers, R.D. Altered risk-aversion and risk-seeking behavior in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* **66**, 840–846 (2009).
- Baker, M. Inside the minds of mice and men. *Nature* **475**, 123–128 (2011).
- Blanchard, D.C., Griebel, G. & Blanchard, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur. J. Pharmacol.* **28**, 97–116 (2003).
- Crawley, J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol.* **17**, 448–459 (2007).
- Panksepp, J., Siviy, S. & Normansell, L. The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **8**, 465–492 (1984).
- Insel, T.R. Mouse models of autism: report from a meeting. *Mamm. Genome* **12**, 755–757 (2001).
- Metaxas, D. & Terzopoulos, D. Shape and nonrigid motion estimation through physics-based synthesis. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **15**, 580–591 (1993).
- Khan, Z., Balch, T. & Dellaert, F. MCMC-based particle filtering for tracking a variable number of interacting targets. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **27**, 1805–1819 (2005).
- Dankert, H., Wang, L., Hoopfer, E.D., Anderson, D.J. & Perona, P. Automated monitoring and analysis of social behavior in *Drosophila*. *Nat. Methods* **6**, 297–303 (2009).

11. Branson, K., Robie, A.A., Bender, J., Perona, P. & Dickinson, M.H. High-throughput ethomics in large groups of *Drosophila*. *Nat. Methods* **6**, 451–457 (2009).
12. de Chaumont, F. *et al.* Using physics engines to track objects in images. *In Proceedings IEEE Intern. Symp. on Biomedical Imaging* (Boston, 2009).
13. de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N. & Olivo-Marin, J.-C. Tracking multiple articulated objects using physics engines : improvement using multiscale decomposition and quadtrees. *In Proceedings IEEE Intern. Conf. on Image Processing* (Hong Kong, 2010).
14. Chenouard, N., Dufour, A. & Olivo-Marin, J.-C. Tracking algorithms chase down pathogens. *Biotechnol. J.* **4**, 838–845 (2009).
15. Granon, S., Faure, P. & Changeux, J.P. Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9596–9601 (2003).
16. Arakawa, H., Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. Colony formation of C57BL/6J mice in visible burrow system: identification of eusocial behaviors in a background strain for genetic animal models of autism. *Behav. Brain Res.* **176**, 27–39 (2007).
17. Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C. & Crawley, J.N. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Natl. Rev.* **11**, 490–502 (2010).
18. Avale, M.E. *et al.* Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J.* **25**, 2145–2155 (2011).
19. Khan, Z., Herman, R., Wallen, K. & Balch, T. An outdoor 3D visual tracking system for the study of spatial navigation and memory in rhesus monkeys. *Behav. Res. Methods* **37**, 453–463 (2005).
20. Serreau, P., Chabout, J., Suarez, S.V., Naudé, J. & Granon, S. Beta2-containing neuronal nicotinic receptors as major actors in the flexible choice between conflicting motivations. *Behav. Brain Res.* **225**, 151–159 (2011).
21. Ebensperger, L.A., Hurtado, M.J. & Ramos-Jiliberto, R. Vigilance and collective detection of predators in Degus (*Octodon degus*). *Ethology* **112**, 879–887 (2006).
22. Roberts, G. Why individual vigilance declines as group size increases. *Anim. Behav.* **51**, 1077–1086 (1996).
23. Maubourguet, N., Lesne, A., Changeux, J.P., Maskos, U. & Faure, P. Behavioral sequence analysis reveals a novel role for beta2* nicotinic receptors in exploration. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000229 (2008).
24. Jamain, S. *et al.* Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 1710–1715 (2008).
25. Rossi, F.M. *et al.* Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6453–6458 (2001).
26. Peyrache, A., Khamassi, M., Benchenane, K., Wiener, S.I. & Battaglia, F.P. Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. *Nat. Neurosci.* **12**, 919–926 (2009).
27. Schulz, D. *et al.* Simultaneous assessment of rodent behavior and neurochemistry using a miniature positron emission tomograph. *Nat. Methods* **8**, 347–352 (2011).
28. Chabout, J. *et al.* Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment. *PLoS ONE* (in the press).

ONLINE METHODS

Computerized animal tracking using physics engines. To track articulated bodies such as those of mice, we define a model of the body using geometrical primitives that are connected and bound via physical constraints. Basic primitives include rectangles, circles and other convex polygons that are combined to construct the model (**Fig. 1a,b**). A physics engine mouse model $M_{O,C}$ is defined by a set $O = \{o_i\}_{i=1\dots n}$ of basic primitive objects (also called ‘bodies’) and a set C of constraints in a world W . Bodies are characterized by three parameters: an anchor, which is the point where displacement forces are applied, a mass (default value 1 in arbitrary units) and a damping (for example, friction) factor (default value 0.1). The elastic constraints have a k coefficient set to 0. These three parameters are the only free parameters in the model. Primitives of the model are related to the image data (**Fig. 1a,b**) through an improved mean-shift process²⁹. The global deformation of the model is computed by a physics engine solver³⁰ (software or hardware toolkits for the realistic simulation of physical systems governed by Lagrangian dynamics). More precisely, the primitives are attracted by specific force maps (edge and mass maps) created from the image: primitives on the outer part of the mouse model are attracted by the edge map, while primitives in the center are attracted by the full mass of the mouse (**Fig. 1c–f** and **Supplementary Note 1**). The degrees of freedom between primitives are defined by a set of four types of constraints called joints: distance, angle, elastic and slider. The physics engine deals with collisions between individual primitives or between independent groups of joints through built-in procedures. To prevent confusions between two mouse models, a constraint of non-overlap between primitives of different bodies is imposed (**Fig. 1g**). Each part of the model seeks to fit itself best to the data it recognizes and aims to place itself according to its constraints. In case of misplacements, an interactive mechanism is provided for the operator to correct the tracking. The movements of the subparts in the model are generated by the visible data attached to each element. The physical constraints force the hidden parts to move consistently with the overall model. This helps detect all the subparts of the model (side, head, eyes, nose, belly and beginning of tail) without requiring physical markers. When two animals are in contact, each model is attached to a mouse and cannot overlap with the other. The proposed approach therefore can be used to track isolated or pairs of mice, to maintain the identity of the different mice in case of close contacts, to provide local shape information both at the geometrical primitives and articulation levels and to perform motion prediction (**Supplementary Note 1**, **Supplementary Figs. 1–4** and **Supplementary Software**). Updates and latest version of the software will be available at <http://icy.bioimageanalysis.org/>.

For the physics model to move toward the object and match its position and orientation, it is necessary to exert forces on the model. These forces are applied at specific points called anchors. An anchor a is defined by a point p_a and an attraction map M_a computed from the original image I . The attraction map represents the link between an anchor and the image data. Depending on the underlying image information (intensity, gradient, texture and others), different types of attraction maps can be defined. Different maps can be used for different anchors. Here we use two maps: a binary map (**Fig. 1f**) of the original image after thresholding of the image, and an edge map, computed as the Laplacian

of the binary map (**Fig. 1e**). The edge map is used to attract the anchors linked to the silhouette of the animal while the binary map is used to drive the central belly anchor. The area of attraction of an anchor is restricted to a disk centered on p_a and of radius r (**Fig. 1g**). This reduces the computation domain of the force applied to an anchor to the subregion of the original image covered by this map M_a (for example, in **Fig. 1f** only the pixels within the subregion defined by the pink circles will be used to compute edge forces). Finally, for each anchor a , the resulting attraction force is computed as

$$\vec{f}(a) = \sum_{q \in M_a} M_a(q) \overrightarrow{p_a q},$$

where q describes all the pixels within the attractive map (**Supplementary Note 1**).

The final step consists in computing the forces \vec{f} for all the objects in W , and making the physics engine solve the system. The solver proceeds by integrating the forces with the physical properties of each object and with the physical constraints. The attraction forces are computed iteratively, until convergence. Convergence is detected by monitoring when the system reaches a steady-state, that is, when the displacement (or speed) of all the models falls below a small set value ϵ .

One interesting property of the physics model approach is to allow for the definition of an arbitrary number of models belonging to the same world and deform them simultaneously with the physics engine solver. It is therefore possible to have several models that track simultaneously several objects, where each model tracks its own target by tracking the displacement of each of its constituent bodies. When two animals come into contact, the physics engine automatically detects and handles the ambiguities related to model overlapping, through collision detection and feedback strategies.

Motion prediction. Tracking animals that do not move substantially from one frame to another is straightforward as the final state of a model at a given frame is used as the initial state in the next frame. In cases when the acquisition frame rate is not sufficient, it could happen that the animals move too fast from one image to the next, and that the new position is not within reach of the model, by no longer being able to attract the anchors. In this case, a prediction of the position of an animal at frame $t + 1$ is obtained by computing first the instantaneous displacement vector for each anchor from frame $t - 1$ to frame t , and then applying this vector at frame t to predict the new position at frame $t + 1$.

Location of a conspecific within the visual field of a mouse. When dealing with two mice in a large environment, tracking the head primitive in the mouse model allows the computation, for each mouse, of the location of the conspecific in its field of view. The vision field is defined as an angle of 240° originating at the center of the primitive head, where the origin 0° is the exact front of the mouse and the complete vision field computation goes from –120° to 120°, taking into account the possible motility of the eye into the orbit (**Fig. 1h**). For each mouse a histogram is created where the x axis represents the angle in the vision field. The y axis gives the cumulative number of frames during which the conspecific mouse is at any given position within the vision field of the mouse.

Chronograms of events. At the end of the tracking procedure, the location of each of the mouse's body parts is known for each time point. By applying the rules defined in **Figure 1i**, a frame-by-frame labeling of the events is computed over the whole sequence. The list of labeled events can then be displayed in the form of a chronogram, where the temporal occurrences of the events are plotted either by displaying all the events for one experiment (**Fig. 1j**) or by displaying the same event sorted by strains over different experiments (**Supplementary Fig. 1**).

Construction of temporal graphs. The temporal graphs represent the same information as chronograms but grouped in bins of 40 s. The graph is then computed separately for both mouse types (C57BL/6 and $\beta 2^{-/-}$). The data represent the density, which is the sum of the time in which the event is happening, versus the total time of the bin.

Computation of the transitional behavior graphs. For each mouse category, we compute all transitions possible between all the events. The program analyses all the combinations between the events and detects a transition if an event finishes as soon as another event starts. As the events may not start at the exact next frame, we add a parameter to relax the accuracy between the end of an event and the start time of its successor. We aim at finding the probability of an event succeeding a previous one, but we also need to compute the probability of an event to be the predecessor of the next event so that the graph can be read both ways. The successor transition and predecessor transition are respectively noted by *ST* and *PT*.

E_i and E_j represent the set of events for the event nature i and j ; $\text{card}(E_i)$ is the cardinality of E_i , that is, the number of events. We compute all possible pairs of events including the case where $i = j$; that is the probability of an event looping over itself. The probability is computed as

$$\left(T_{E_i E_j}\right) = \frac{\text{card}\left(ST_{E_i E_j}\right)}{\text{card}\left(E_i\right)} \times \frac{\text{card}\left(PT_{E_j E_i}\right)}{\text{card}\left(E_j\right)}$$

This computation is performed independently for the first 4 min, and then for the last 4 min. The graph is composed of blue, green or black arrows representing a temporal color code: blue arrows are events specific to the first 4 min, green for the last 4 min and black for the whole 8 min. If the probability for the first 4 min and the last 4 min overlap by 1 sigma, we consider there is no evolution in time and set the connection arrow between the two events to black. If the difference is higher, both green and blue arrows will be represented on the graph. The color code blue therefore represents an event that is significant over the first 4 min.

The complexity and richness of the final graph can be tuned by keeping the n best candidates leading to an event. As n increases, the number of inputs for each event increases and the graph gets more complex. We also add a threshold to avoid the creation of very thin arrows that are created by very low-probability event succession. For the ease of reading and comparison of the probability of transition, we represent the probability by the thickness of the arrow: the thicker the arrow is, the most likely is the event. The generated graph description is then computed for rendering the final figure using the free software Graphviz (<http://graphviz.org/>).

Cross-linked transitional behavioral graphs. To compare specific event transitions on two different strains, a single transitional behavioral graph is constructed by merging the original graphs of each strain and by pruning all links that are not directly related to the studied events, that is, at one degree. This is necessary to avoid the creation of mixed strain antecedents and successors of second degree or higher. The graph is also displayed using Graphviz.

MiceProfiler software. All the analyses have been performed using the free and open source image analysis Icy platform (**Supplementary Software** and <http://icy.bioimageanalysis.org/>) in which we developed the plugin MiceProfiler. The application is made of three plugins (or modules) working in pipeline (see **Supplementary Video 1** for a demonstration): a tracking module, a chronogram generator module and a temporal analysis module.

The tracking module (**Supplementary Fig. 2**) hosts the physics engine and performs the tracking procedures. It takes MPEG4 or DivX movies as input. It is a highly interactive plugin and helps the user monitoring the tracking by displaying the physics models over the image in real time. Each mouse is uniquely identified to avoid swaps. The interface incorporates a video player to navigate over the video and control with an accuracy of one frame the quality of the tracking. In case of errors or confusions, the user can stop the tracking, drag the physics models to the correct positions, and resume the automatic tracking. Adjustments are automatically updated on the viewer. The output of the plugin is the set of all the positions of the different parts of the body for each mouse, at each frame.

The second plugin is the chronogram generator (**Supplementary Fig. 3**). This plugin takes the raw tracking data as an input and performs the computation of the chronogram for each event described in the repertoire. In this plugin one can load one or several animal tracking data and the plugin computes the corresponding chronogram instantly. The user can also change a number of parameters and recompute the chronograms. It is possible to load the chronograms of several mice at the same time. The chronograms are displayed, browsed and also compared to those of other mice. The video is played as the user is seeking into the data to display the original video with the tracking witness. Extra information such as bodies parts display, current field of view for each mouse referential is also displayed. This plugin also exports all the plain-text data needed for the behavior transition graphic, which can then be directly used in software to build the final graph. We used here the free software Graphviz (<http://graphviz.org/>).

The third plugin (**Supplementary Fig. 4**) uses the chronograms as an input and creates the temporal graphics. The user can select the mouse to add in the final graph and the events to be plotted. The data are then pooled together by mouse type and time bins, considering either the number of events or the length of the events. The final graph is directly displayed with the s.d. This plugin also computes all the data of all events using either length or number of events for the first 4 min, and last 4 min. See **Supplementary Note 2** for a discussion of existing software for automatic mouse tracking in relation to the MiceProfiler.

Behavioral protocol. The day of the experiment, an isolated-host male mouse was put in a new experimental environment (a transparent plexiglass cage, 50 cm \times 20 cm, covered with clean sawdust)

placed in a new quiet room (light set at 100–110 lx) and was allowed to freely roam alone in the new environment for 30 min. After this period, a social-visitor male mouse of the same age and sex was introduced into the experimental environment. A different social-visitor mouse was used in each test. Social interactions between the isolated-host mouse and the social-visitor were recorded with a webcam placed directly above the cage. The webcam was controlled by a computer located outside of the experimental room so that the social interaction between the mice occurred in the absence of any human experimenter.

Mice. $\beta 2^{-/-}$ mice were generated as described previously³¹ and backcrossed onto the C57BL/6J strain for 20 generations, which is above the ten backcrosses recommended by the Banbury conference (Banbury conference on genetic background in mice, 1997). A genomic analysis has been carried out to determine the percentage of C57BL/6J genetic background in the $\beta 2^{-/-}$ line that originally derives from a 129/Sv embryonic stem cell line. Using more than 400 genomic markers, the $\beta 2^{-/-}$ line was confirmed to be at more than 99.99% C57BL/6J. The mice were treated according to the ethical standards defined by the Centre National de la Recherche Scientifique for animal health and care in strict compliance with the EEC recommendations (86/609).

Male $\beta 2^{-/-}$, C57BL/6J, DBA2 and 129SV mice used in this study were obtained from Charles River Laboratories at 8–11 weeks of age.

They were housed in transparent plastic cages (15 cm × 30 cm) in groups of four or five, in a temperature-controlled (20–22 °C) and humidity-controlled room under a 12-h light–12-h dark cycle (lights on at 8:00 a.m.). They received food pellets and water ad libitum. Rearing was considered as standard (no enrichment on cages). One week after arrival, isolated-host male mice were socially isolated for four weeks before the experiment whereas social-visitor mice (C57BL/6J mice for C57BL/6J and $\beta 2^{-/-}$ isolated-host mice and same strains than for isolated-host mice for 129SV and DBA2 mice) were maintained in cages with 4–5 mice.

Statistical analysis. Behavioral parameters were analyzed with the Statview software. We used simple or repeated measures of variance (ANOVAs) with genotype (comparison of the behavioral parameters between animals of different genetic strains (either C57BL/6J versus $\beta 2^{-/-}$ or C57BL/6J versus 129SV versus DBA2) and time as main factors. We used *t*-tests for *post hoc* analyses or main comparisons when only one main factor was analyzed.

29. Comaniciu, D., Ramesh, V. & Meer, P. Kernel-based object tracking. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. **25**, 564–577 (2003).
30. Millington, I. *Game Physics Engine Development* (Elsevier, 2010).
31. Picciotto, M.R. *et al.* Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* **374**, 65–67 (1995).

Résumé

La prise de décision est un processus indispensable et vital pour les mammifères. Elle permet à l'individu de s'adapter aux changements qui s'opèrent dans son environnement et résulte de l'intégration d'informations sensorielles, émotionnelles, motivationnelles et exécutives (qui peuvent être internes ou externes à l'individu). Des études, à la fois chez le sujet humain (sujet sain, patients cérébrolésés ou atteints de pathologies psychiatriques), et sur les modèles animaux singe, rats ou souris, ont permis d'identifier le cortex préfrontal comme acteur crucial dans ces processus exécutifs complexes. La mise en place au sein de notre laboratoire d'un test d'interaction sociale permettant de générer des prises de décision rapides et adaptées en présence d'un congénère nouveau, nous a permis d'étudier les bases neurobiologiques et comportementales sous-jacentes à la prise de décision et à la flexibilité comportementale. Il est connu que les rongeurs émettent des USVs dont le rôle et les mécanismes motivationnels et/ou émotionnels restent largement inconnus à ce jour. Mon travail de thèse repose principalement sur l'identification des acteurs cérébraux de cette interaction sociale, et sur le rôle putatif des USVs. D'autre part, je me suis employé à comprendre comment les motivations naturelles (telles que la nourriture, l'exploration d'objet ou de l'environnement, et l'interaction avec un congénère) sont intégrées au canevas de prise de décision et comment elles l'influencent.

Dans un premier temps, en utilisant des procédures d'imagerie cellulaire basée sur l'expression de gènes précoces (*c-fos*), et ce, à la fois chez des animaux contrôles et chez des animaux présentant des troubles des comportements sociaux (β 2KO), nous avons pu mettre en évidence l'implication différentielle de sous-parties du cortex préfrontal chez la souris. Par la suite, la mise en place d'un logiciel spécifique d'analyse, ainsi que la modulation de l'état de motivation de l'animal lors de la tâche d'interaction sociale, nous a permis de mieux comprendre l'établissement de comportements adaptés lors de l'interaction sociale. Pour finir, en variant les contextes comportementaux, nous avons montré qu'il existe une relation étroite entre état émotionnel et motivationnel de l'animal et émission d'USVs. Notamment, les USVs semblent porter une information spécifique lors de l'interaction sociale qui reste encore largement à déterminer.

Mots-clés: Prise de décision / Motivation / Interaction sociale / Cortex préfrontal / Vocalisations

ultrasonores / Etat émotionnel