



HAL
open science

Rôle de l'acétylcholine préfrontale dans les comportements sociaux

Cyril Lhopitallier

► **To cite this version:**

Cyril Lhopitallier. Rôle de l'acétylcholine préfrontale dans les comportements sociaux. Sciences cognitives. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL043 . tel-04148046

HAL Id: tel-04148046

<https://theses.hal.science/tel-04148046v1>

Submitted on 2 Jul 2023

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

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

Rôle de l'acétylcholine préfrontal dans les comportements sociaux

Role of prefrontal acetylcholine in social behavior

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 Signalisation et réseau intégratif en biologie, BioSigne d'accréditation,
dénomination et sigle
Spécialité de doctorat : Neurosciences
Graduate School : Science de la vie et de la santé Référent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche Institut des neurosciences Paris-Saclay
(Université Paris-Saclay, CNRS), sous la direction de **Sylvie GRANON**, Professeure des
Universités et la co-direction de **Alexis FAURE**, Maître de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, 01 juillet 2022 par

Cyril LHOPITALIER

Composition du Jury

Alain GARDIER Professeur, Université Paris Saclay	Président ou Présidente
Vincent DAVID Chargé de recherche, HDR, CNRS UMR 5287	Rapporteur & Examineur
Elodie EY Chargé de recherche, HDR, CNRS UMR 7104	Rapporteur & Examinatrice
Isabelle FEREZOU Directrice de recherche, CNRS, Université Paris Saclay	Examinatrice
Armelle RANCILLAC Chargé de recherche, CNRS UMR 7241	Examinatrice
Sylvie GRANON Professeure, Université Paris Saclay	Directrice de thèse
Alexis FAURE Maître de conférences, Université Paris Saclay	Co-Directeur de thèse

Remerciements

La thèse ce n'est pas la fin d'un cycle ce n'est que le début. Et même si la thèse est le début d'un cycle, elle se termine. Je profite donc de ce moment pour vous exprimer mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont encouragé de près ou de loin au cours de ces quelques années.

Je souhaite tout d'abord remercier ma directrice de thèse, la professeure Sylvie Granon et mon co-directeur de thèse Dr Alexis Faure. Tout d'abord merci de m'avoir fait confiance du master 2 à ces quatre ans de thèse. Merci pour toutes les connaissances, rigueurs, compétences que vous m'avez transmises durant ces quelques années. Merci aussi à vous pour toutes ces discussions scientifiques ou non, ces moments de convivialité et toutes ces choses qui rendent la thèse comme une aventure unique. Ces années de thèse m'ont beaucoup appris en terme scientifique mais aussi sur moi-même. J'espère que je me monterais digne de votre apprentissage pour ma future recherche et que moi aussi à mon tour, un jour je saurais transmettre les connaissances que vous m'avez apporté.

Merci à toi, Sylvie Granon, qui même si elle est ma directrice de thèse, est aussi directrice de l'équipe. Je tenais aussi à te remercier personnellement des différents échanges mais aussi des cours de sophrologie que tu m'as permis de réaliser. Merci pour cet enseignement et même si j'ai encore beaucoup de questions je continue à pratiquer.

Merci aussi à toi, Alexis Faure, pour m'avoir permis d'intégrer ton projet, de m'avoir fait confiance, merci de ces passionnantes discussions, merci de tes conseils.

Je remercie aussi le Dr Elodie Ey ainsi que le Dr Vincent David d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner mon travail de thèse par la lecture de ce manuscrit. Je remercie également Pr Alain Gardier le Dr Armelle Rancillac ainsi que le Dr Isabelle Ferezou d'avoir fait également partie de mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Armelle Rancillac ainsi que le Dr Gisella Vetere de m'avoir suivie et conseillée durant les différents comités de suivie.

Je remercie également Jean-Marc Edeline, Valerie Doyere, Gleen Dallerac de m'avoir accueillie au sein du département, anciennement, « cognition et comportement » et nouvellement « CNN ».

Je remercie également tous les collaborateurs. Merci à Laurent Tritschler, Céline Defaix, Alain Gardier pour m'avoir permis d'apprendre la technique de microdialyse. Merci pour vos conseils et votre expertise. Merci également à Jean Marie Launay d'avoir réalisé les dosages de microdialyse. Merci également à Sylvie Berrard et à Françoise Saurini de m'avoir permis durant quelques jours d'intégrer

votre laboratoire afin d'assister à la réalisation des qPCR. Merci de vos conseils et de votre contribution durant votre travail. Je voudrais aussi remercier chaleureusement Fred Chauveau, chercheur à l'IRBA et membre éternel de l'équipe sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été possible. Merci aussi de tes conseils. Je remercie également Adam Hamed pour les différentes discussions que nous avons pu avoir.

Je tiens également à remercier Louise Coutanceau et Nastasia Mirofle. Merci à vous, d'avoir pris de votre temps pour corriger la syntaxe, le vocabulaire ainsi que l'orthographe de ce manuscrit. Je sais très bien que ce n'était pas une tâche facile.

Je souhaite remercier aussi toute mon équipe « Neurobiologie de la prise de décision » pour leurs discussions, leurs bonne humeur, les pauses café chose extrêmement importante dans la vie d'un laboratoire. Merci à toi Anne Nosjean pour tes questions pertinentes, tes encouragements et tes conseils. Merci aussi à toi Pascale et Brigitte pour vos encouragements.

Je tiens aussi à remercier l'ancienne thésard Héloïse pour m'avoir soutenue, supporter et aider à travers des joutes verbale de Kaamelott, et les taquineries sans cesse l'un envers l'autre et pas l'un derrière l'autre ;-p du café, ou des discussions sérieuses (un peu quand même) et autres discussions autour du café ou autres. Les fameux « c'est pas faux », « faut que t'arrête de dire des trucs », ou je suis fatiguée me manque. Merci également à Dounia, membre de l'équipe. Merci à toutes tes répliques « cyril, j'en ai marre » à n'importe quel moment et pour n'importe quelle raison. Merci aussi pour certaines de tes explications sur la génétique et autres. Cela reste pour moi quand même un autre monde. Merci aussi à toi Nastasia Mirofle pour tes discussions, nos taquineries réciproques. Même si tu n'es qu'en première année à l'heure où j'écris ces lignes, ça fait déjà un moment que tu fais partie de l'équipe. Merci Chloris aussi pour tout ce que l'on a partagé, ton soutien et nos discussions toutes plus intéressantes les unes que les autres. Je remercie également Vanessa bien que fraîchement arrivée toujours de bonne humeur. Merci à Lora aussi qui a fortement contribué à faire de cette thèse un bon moment.

Je remercie également les autres doctorants et stagiaires pour ces échanges et soutient Emma, Elie, Amandine, Anais, Xia, Laurine, Manon, Juliette, Fanny, Elie, Sloanne, Sambre, Diego, Emanuel, Maxime et tous les autres que je n'ai pas cités. Merci à vous

Je remercie également tout mes amis et particulièrement Quentin, Emeline, Benjamin, Dylan, Evan, Aurélie, Thomas, Sophie, Marion qui me permette de m'évader du monde scientifique et de passer des bons moments simple et conviviale.

Je remercie également l'ensemble de mon équipe de hand qui m'a permis aux termes de ces quatre années de hand de m'évader, de me défouler et de me clarifier l'esprit.

Je remercie aussi de tout cœur, mes parents, mes frères de m'avoir soutenue. Et permis aussi de me déconnecter. Merci également aux grand-pères, grand-mères, cousins, cousines, oncles, tantes. Et tous les autres membres de la famille. Merci d'être présent et d'être là.

Je souhaite également remercier Louise. Merci de m'avoir soutenue en particulier durant ces dernières semaines pas toujours simples à gérer. Merci tout simplement d'être là.

Je remercie toutes les personnes que j'ai oublié de citer. Merci de m'avoir aidé.

Maintenant il est temps de prendre mon envol, d'aller vers d'autres aventures et de découvrir de nouvelles choses, car la thèse ce n'est que le début de quelque chose mais avant de partir je tenais à vous remercier vous tous une dernière fois.

MERCI !

Table des matières

Introduction	2
1. Qu'est ce que l'interaction sociale	2
1.1. Les étapes de l'interaction sociale sont similaires aux étapes de la prise de décision	2
1.1.1. Les étapes de l'interaction sociale	2
1.1.2. Les étapes de la prise de décision	4
1.1.3. A quel type d'interaction nous intéressons nous ?	6
1.2. Circuit influençant le cerveau social	7
1.2.1. Principales structures impliquées dans le cerveau social	8
1.2.1.1. Exemple du cas Phineas Gage	11
1.2.1.2. Anatomie du cortex préfrontal chez le rongeur	12
1.2.2. Fonction du cortex préfrontal et de ses sous structures anatomiques	13
1.2.2.1. Le cortex orbitofrontal (COF)	14
1.2.2.2. Le cortex cingulaire antérieur	15
1.2.2.3. Les cortex prélimbique (PRL) et infralimbique (IL)	16
1.2.3. Le cortex préfrontal est impliqué dans la flexibilité comportementale	18
1.2.3.1. La flexibilité comportementale dans le cas de l'interaction sociale	19
1.2.3.2. Mesure de la flexibilité comportementale	20
1.2.3.3. Implication du cortex préfrontal et circuit neuronal impliqué dans les comportements flexibles	23
1.2.4. Le cortex préfrontal est impliqué dans les processus attentionnels	25
1.3. Paramètre influençant les interactions sociales	27
1.3.1. La perception des stimuli sociaux peut influencer notre interaction sociale	27
1.3.1.1. Les informations olfactives	27
1.3.1.2. Les informations tactiles	30
1.3.1.3. Les informations visuelles	31
1.3.2. Etat interne de l'individu	32
1.3.2.1. La reconnaissance sociale	33
1.3.2.2. La hiérarchie sociale	35
1.3.2.3. La motivation sociale	39
1.3.3. Les émotions	41
1.3.3.1. Les vocalisations ultrasonique comme marqueur émotionnel chez la souris	42
1.3.3.1.1. Circuit impliqué dans la production des sons	42
1.3.3.1.1.1. Anatomie du larynx	43
1.3.3.1.1.2. Pourquoi les souris vocalisent elles ?	44
1.3.3.1.2. Les différents type de vocalisations chez le rongeur	46
1.3.3.1.2.1. Les type de vocalisations chez le rat	46
1.3.3.1.2.2. Les types de vocalisations chez la souris	47
1.3.3.1.3. Circuit de production des vocalisations chez le rats	50
1.3.3.2. L'expression émotionnelle chez la souris	52
1.3.3.3. Discrimination des émotions	54
1.3.4. Existe t'il des structures spécifiques au social ? ou un circuit spécifique	55
1.4. Pathologie perturbant l'interaction sociale	56
2. L'Ach dans le CPF neuromodulateur important du comportement social et de la prise de décision	58
2.1. Pourquoi l'ACh est t'elle importante dans l'interaction sociale	58
2.2. Biosynthèse et dégradation de l'ACh	59
2.3. Localisation des différents noyaux cholinergiques et projection des neurones cholinergiques	62
2.3.1. Les neurones cholinergiques	62
2.3.2. Les autres neurotransmetteurs au cortex préfrontal	65
2.4. Les récepteurs de l'acétylcholine : nicotiniqes et muscariniqes	66

2.4.1.	Les récepteurs muscariniques (mAChR)	66
2.4.2.	Les récepteurs nicotiniques (nAChR)	67
2.5.	Les récepteurs à l'Ach dans le microcircuit du PFC	69
2.5.1.	Microcircuit du Préfrontal	69
2.5.2.	Balance E/I	71
2.6.	Co libération d'Ach	71
2.7.	Libération d'Ach volumique ou transitoire	73
2.7.1.	L'Ach peut être mesurée de manière transitoire	73
2.7.2.	L'Ach peut être libéré de manière volumique	74
2.7.3.	Libération d'un point de vu biologique	74
2.8.	Vieillessement du système cholinergique	76
2.9.	Effet de la libération d'Ach	78
2.10.	Méthode pour étudier le système cholinergique	82
2.10.1.	Méthode pharmacologique	82
2.10.2.	Modèle de souris KnockOut (KO)	84
2.10.3.	L'optogénétique technique permettant la libération des neurotransmetteurs	86
2.10.3.1.	Les opsines	87
2.10.3.2.	Le système Cre-Lox permet de cibler les neurone d'intérêt	90
2.10.3.3.	Les lignée Cre	91
2.10.3.3.1.	Quelques lignées Cre	91
2.10.3.3.2.	Les souris ChAT-Cre permettent l'étude du système cholinergique	93
	Objectif de ma thèse	96
1.	Chapitre premier caractérisation des ChAT-IRES-Cre	100
1.1.	Matériel et méthode	101
1.1.1.	Animaux	101
1.1.2.	Le test des trois chambres	103
1.1.3.	Test d'interaction sociale (IS)	104
1.1.4.	L'enregistrement des vocalisations ultrasoniques (USVs)	105
1.1.6.	Test olfactif d'habituation/déshabitude	106
1.1.7.	PCR quantitative à transcriptase inverse	107
1.1.8.	Analyse statistique	108
1.2.	Résultat des ChAT-IRES-Cre	108
1.2.1.	Motivation sociale dans le test de trois chambres	108
1.2.2.	Organisation du comportement social dans le test d'interaction sociale	111
1.2.3.	Réaction face aux stimuli visuels menaçants	116
1.2.4.	Expression des gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse de l'Ach dans le striatum dorsal	120
1.2.5.	Analyse en composante principale (ACP)	121
2.	Chapitre 2 : Effet de la libération de l'Ach sur l'interaction sociale	126
2.1	Matériel et méthode	126
2.1.1.	Animaux et éthique	126
2.1.2.	Les étapes de la chirurgie pour réaliser l'expérience d'optogénétique et de microdialyse	127
2.1.2.1.	1ère étape : Infusion du virus	127
2.1.2.2.	2ème étape : la chirurgie des fibres optiques	128
2.1.2.3.	Protocole de stimulation optogénétique	129
2.1.2.4.	Implantation des sondes de microdialyse et de la fibre optique	130
2.1.3.	Validation de l'expression d'opsine par méthode immunohistochimique	131
2.1.4.	Validation de l'effet de la stimulation optogénétique	133
2.1.4.1.	Protocole expérimental du c-Fos	133
2.1.4.1.1.	Protocole	134
2.1.4.1.2.	Analyse	135
2.1.4.2.	Validation de l'effet de la stimulation optogénétique	136
2.1.4.2.1.	La microdialyse	136
2.1.4.2.2.	Protocole de microdialyse	137

2.1.5.	Expérience comportementale	140
2.1.5.1.	Test d'interaction sociale	140
2.1.5.2.	Le test de 3 chambre	142
2.1.5.3.	Enregistrement des USV	143
2.1.6.	Analyse statistique	144
2.2.	Résultat	146
2.2.1.	Validation de la méthodologie optogénétique	146
2.2.1.1.	Vérification de l'expression et diffusion du virus et localisation des emplacements des fibres optiques	146
2.2.1.2.2.	La microdialyse comme mesure de la libération d'Ach	152
2.2.2.	Résultats comportementaux de la modulation d'Ach	155
2.2.2.1.	Test de trois chambres	155
2.2.2.2.	Effet lumière dans le test d'interaction sociale.	156
2.2.2.3.	Effet de la modulation d'Ach sur le comportement social	163
2.2.2.4.	Vocalisation ultrasonique	172
2.3.	Synthèse des résultats	186
Discussion		Erreur ! Signet non défini.
1.	Validation de la méthodologie	189
1.1.	Les souris ouris ChAT-IRES-Cre présentent une altération de la voie de biosynthèse de l'Ach	189
1.1.1.	Altération de la voie de biosynthèse de l'Ach	189
1.1.2.	Vieillessement du système cholinergique	190
1.2.	Les altérations comportemental des ChAT-IRES-Cre	191
1.2.1.	Les souris ChAT -IRES Cre présentent t'elle un augmentation de l'anxiété ?	191
1.2.2.	Les souris ChAT-IRES-Cre ont-elles un déficit olfactif ?	192
1.2.3.	Les souris ChAT IRES-Cre ont t'elles des troubles locomoteurs ou exploratoires ?	194
1.2.4.	Altération de la décision :	195
1.2.5.	Effet de la stimulation lumineuse sur le comportement	196
1.3.	Conclusion	197
2.	Implication du CPF dans les comportements	198
3.	Effet du microcircuit local sur la libération d'Ach	202
4.	La modulation de l'Ach entraîne une mauvaise communication vocale au cours des interactions sociales	205
Conclusion et perspective		211
1.	Modulation spécifique de l'Ach pendant un comportement spécifique.	211
2.	Compréhension et Dissection du microcircuit du cortex préfrontal	212
3.	Une meilleure compréhension des émotions permettrait une meilleure compréhension de l'analyse du comportement social.	215
3.1.	Voir états émotionnelle de l'autre animal	215
3.2.	Ressentir les émotions de l'autre	217
3.3.	Rôle des vocalisations ultrasoniques : Seulement un marqueur émotionnel ?	221
Conclusion		222

Liste des figures :

Figure 1. Les différents processus des interactions sociales	4
Figure 2. Les étapes de la prise de décision.....	5
Figure 3. Schéma simplifié du cerveau social représentant la majorité des connexions entre différentes structures et le CPF.	8
Figure 4. Reconstruction en 3D du trajet de la barre de fer à partir du cas de Phinéas Gage..	12
Figure 5. Schéma représentant le cortex préfrontal chez le rat.....	13
Figure 6. Schéma expliquant le principe de différents tests évaluant la flexibilité comportementale.....	22
Figure 7. Circuit cérébral impliqué dans les comportements flexibles.....	24
Figure 8. Courbe en U inversé représentant l'état de vigilance.....	26
Figure 9. Circuit neuronal permettant la détection des indices sensoriels chez la souris.....	30
Figure 10. Circuit de la reconnaissance sociale chez les rongeurs	35
Figure 11. Circuit impliqué dans la dominance.....	38
Figure 12. Quelques tests réalisés en laboratoire montrant les comportements de dominance chez la souris.....	38
Figure 13. Schéma simplifié de la motivation.....	41
Figure 14. Etude anatomique du larynx des rats	43
Figure 15. Les principales vocalisations émises chez les rats.....	47
Figure 16. Classification des USV de souris émises lors de l'interaction sociale.	50
Figure 17. Les principales voies modulant la production des USVs.....	52
Figure 18. Les différentes expressions faciales chez la souris.....	54
Figure 19. Synthèse et dégradation du système cholinergique.....	62
Figure 20. Principales voies cholinergiques chez le rongeur et répartition des récepteurs nicotiniques (nAChRs).....	64
Figure 21. Les principales voies de projection des neurones cholinergiques.	64
Figure 22. Schéma simplifiée du microcircuit du cortex préfrontal.....	70
Figure 23. Exemple des deux modes de libération dans la synthèse de l'Ach.....	75
Figure 24. Schéma montrant les conséquences de la libération d'acétylcholine.....	81
Figure 25. Les agonistes et antagoniste nicotinique et muscarinique	84
Figure 26. Niveau de monoamines et d'Ach dans le PrL de souris C57BL/6 et $\beta 2$ KO.....	86
Figure 27. Développement et quelques opsines utilisées en optogénétique.	88
Figure 28. Principe du système Cre-LoxP.....	91
Figure 29. Génération des souris transgéniques ChAT-IRES-Cre.....	94
Figure 30. Chronologie de nos expériences.....	103
Figure 31. Comportements dans le test de trois chambres.	110
Figure 32. Corrélation entre le temps d'immobilité et la distance parcourue dans le test de 3 chambres.	111
Figure 33. Comportements de contact, stop et d'exploration dans l'interaction sociale.....	113
Figure 34. Comportement dans l'interaction sociale	114
Figure 35. Vocalisations ultrasoniques (USVs) émises durant l'IS.	115
Figure 36 . Réponse comportementale au stimulus menaçant.....	117

Figure 37. Résultats d'une tâche olfactive.....	120
Figure 38. Analyse de l'expression des gènes CHT, ChAT et VACHT dans le striatum dorsal.	121
Figure 39. Illustration de l'analyse en composantes principales sur les paramètres d'expression de gènes et de comportements.	124
Figure 40. Schéma du plan expérimental et du nombre d'animaux utilisés dans nos expériences	127
Figure 41. Coupe stéréotaxique représentant la zone infusion du virus.....	128
Figure 42. Implantation des fibres optiques.....	129
Figure 43. Représentation de l'implantation des sondes de microdialyse.	131
Figure 44. Méthode de mesure du c-Fos.	135
Figure 45. Principe de la microdialyse.....	136
Figure 46. Protocole de microdialyse.....	139
Figure 47. Stratégie utilisée pour analyser nos données	145
Figure 48. Validation de la méthode optogénétique.....	148
Figure 49. Validation de la méthode optogénétique (localisation du virus et de la fibre optique).....	149
Figure 50. Les résultats du c-Fos.....	151
Figure 51. Résultats des dosage de microdialyse.....	154
Figure 52. Résultat du test des trois chambres	156
Figure 53. Effet de la lumière sur le nombre d'interactions sociales.....	161
Figure 54. Effet de la lumière sur la durée de l'interaction sociale	163
Figure 55. Modulation de l'Ach sur le nombre de comportement durant l'interaction sociale.	166
Figure 56. Modulation de l'Ach sur la durée des comportement durant l'interaction sociale.	168
Figure 57. Distance parcourue par la souris hôte et la souris visiteuse dans le SIT.	170
Figure 58. Corrélacion entre le nombre d'USV et le temps de contact.....	173
Figure 59. Vocalisation ultrasonique des lumières bleues et des lumières vertes.....	174
Figure 60. Vocalisation ultrasonique des ChR2 et des Halo.....	175
Figure 61. Fréquence maximale des USVs émises en pourcentage selon le groupe contrôle et en fonction du type de comportement.....	178
Figure 62. Probabilités de transition.	179
Figure 63. Protocole expérimental permettant de mesurer le choix de l'animal dans une tâche de choix ou la récompense est incertaine.....	203
Figure 64. Hypothèse du rôle de la sérotonine dans les comportements sociaux.....	205
Figure 65. Hypothèse mécanistique permettant d'expliquer l'augmentation de la production des USV.	210
Figure 66. Implantation permettant de visualiser l'activité des neurones pyramidaux au sein du cortex préfrontal.....	213
Figure 67. Senseur cholinergique utilisé	215
Figure 68. Expérience permettant de discriminer l'état émotionnel d'un congénère chez la souris.	216
Figure 69. Les différents modèles théoriques de l'empathie.....	219

Liste des tableaux :

Tableau 1. Caractéristique général de la transmission classique et volumique.....	76
Tableau 2. Exemple de différentes lignées de Cre.....	92
Tableau 3. Résultats significatifs de l'ACP effectuée sur les principaux paramètres mesurés dans les expériences de comportement et d'expression génétique.....	123
Tableau 4. Comportement enregistrés avec Mice Profiler.....	142
Tableau 5. Résumé des principales caractéristiques permettant de visualiser le virus.....	147
Tableau 6. Résumé des principales données comportementales.....	172
Tableau 7. Tous les résultats statistiques de l'effet lumière dans l'IS sur le nombre d'événements 0-4 et 4-8 minutes.....	180
Tableau 8. Tous les résultats statistiques de l'effet lumière dans l'IS sur la durée d'événements 0-4 min and 4-8 min.....	181
Tableau 9. Tous les résultats statistiques de Chr2 stim vs 100% et Halo stim vs 100% sur le nombre de comportement 0-4 min et 4-8 min.....	182
Tableau 10. Tous les résultats statistiques de Chr2 stim vs 100% et Halo stim vs 100% sur la durée de comportement 0-4 min et 4-8 min.....	183
Tableau 11. Tous les résultats statistiques des effets lumière sur la synchronisation des USV et du comportement.....	184
Tableau 12. Tous les résultats statistiques sur le résultat de la modulation d'Ach sur la synchronisation des USV et du comportement.....	185

Liste des abréviations :

3-CH : 3 chambres

AAV : virus adéno-associé

Ach : Acétylcholine

ACHE : Acétylcholinestérase

Amy : Amygdale

AP : Antéro-postérieur

AVP : Vasopressine

Balance E/I : Balance Excitation/inhibition

BLA : Noyau basolatéral de l'amygdale

BNST : Noyaux basaux de la strie terminale

CCA : Cortex cingulaire antérieur

CeA : Amygdale central

ChAT : Choline acétyltransférase

ChR2 : Channelrhodopsine

CHT : Transporteur de la choline

COF : cortex orbitofrontal

CPF : Cortex préfrontal

CPFdm : cortex préfrontal dorsomédian

CPFm : cortex prefrontal median

DV : Dorso-ventral

EYFP : Enhanced Yellow Fluorescent Protein

GFP : Green Fluorescent Protein

Halo : Halorhodopsine

IL : Infralimbique

IS : interaction social

KO : KnockOut

LA : Amygdale Latéral

LDT : Noyau Tegmental Latéro Dorsal

mAChR : Récepteur muscarinique à l'acétylcholine

M.A : Age moyen
MeA : Amygdale médiane
ML : Médio latéral
Nac : Noyaux accubens
nAchR : Récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NBM : Noyau basal de Meynert
NTR : Neurotranmetteur
OT : Oxytocine
OVN : Organe voméronasal
PAG : Substance grise périaqueducale
PBS : Phosphate buffer saline
PBST : Posphate buffer saline triton
PPT : Pédonculo Pontins Tegmental (PPT)
Prl : Prélimbique
PV : *Parvalbumine*
SOM : Somatostatine
USV : Ultrasonique Vocalisation
VACHT : Transporteur vésiculaire de l'Ach
VIP : Peptide vasoactif intestinal
VTA : Aire tegmental ventral
WT: Wilde type

Introduction

Introduction

1. Qu'est ce que l'interaction sociale

1.1. Les étapes de l'interaction sociale sont similaires aux étapes de la prise de décision

1.1.1. Les étapes de l'interaction sociale

Les animaux sociaux interagissent en permanence avec leurs congénères, que ce soit pour se reproduire, se battre, défendre son territoire, prendre soin des jeunes ou encore échanger des informations. Interagir socialement est un processus qui se déroule en plusieurs étapes (Chen and Hong, 2018; Fernández et al., 2018; Yizhar and Levy, 2021). La première de ces étapes repose sur la perception d'une information sociale. Les animaux sont sans cesse confrontés à une grande variété de stimuli tels que la lumière, les odeurs, ou la température. Afin de réaliser une interaction sociale avec un de ses congénères, la souris doit parvenir à distinguer les stimuli sociaux des stimuli non sociaux et non pertinents pour l'interaction. La distinction entre ces différents stimuli est rendue possible grâce à des indices olfactifs, visuels, auditifs ou somatosensoriels.

Une fois perçus, les stimuli sociaux sont intégrés, permettant ainsi d'identifier l'individu et l'environnement : qui est-ce congénère ? M'est-il familier ? Quel est son sexe ? Que me veut-il ? Veut-il se reproduire ? A-t-il besoin d'aide ? Quel est son statut social ? L'environnement est-il dangereux ? Quel est l'état émotionnel de ce congénère ? Le traitement des indices sociaux et non sociaux permet à l'animal de prédire le comportement possible de son congénère. Après avoir décodé tous les stimuli sociaux et avoir anticipé le possible comportement du congénère, l'animal va intégrer ses éléments à son propre état interne ainsi qu'à son histoire personnelle. Par exemple, quel a été le résultat de mes précédentes interactions ? Que veut-il à cet instant précis ? Quel est mon état de motivation ? Que peut déclencher cette action chez mon congénère ? Après avoir intégré toutes ces informations, l'animal choisira sa réponse comportementale. Ainsi, en fonction du contexte, l'animal peut choisir de fuir, de s'approcher, de s'accoupler, d'aider l'autre souris et ainsi de suite. Dans tous

les cas, après avoir choisi le comportement adapté au contexte, la souris devra s'adapter à la réponse de l'autre. Par exemple, si l'animal a décidé d'approcher son congénère, celui-ci peut en retour avoir un comportement agressif, ce qui pourra entraîner un changement comportemental : répliquer par l'agression, fuir s'immobiliser...

Ainsi, au cours de chaque interaction sociale, les souris doivent être capables de développer un comportement flexible, c'est-à-dire d'être s'adapter en permanence à son environnement et à son congénère. Cette notion de flexibilité comportementale sera développée un peu plus loin dans le manuscrit. Une fois l'interaction sociale terminée, ses conséquences seront mémorisées et serviront à moduler, ou construire les interactions futures. Par exemple, après une défaite sociale (la souris a subi un comportement agressif de la part de son congénère lors d'une interaction), les souris ont tendance à moins approcher un congénère (Larrieu et al., 2017). Ce comportement montre donc que l'animal est capable de discerner les conséquences de ses actions passées et d'adapter sa réponse lors du prochain comportement similaire survenant. L'animal aura donc appris la bonne réaction à avoir dans cette situation ainsi qu'à mieux interpréter les signaux sociaux, comme le "mouvement de queue" ou les expressions faciales, afin d'éviter de subir d'autres comportements agressifs lors d'une situation similaire (voir **Figure 1**).

Il convient de préciser ici que dans la suite de ce manuscrit, je me focaliserai principalement sur le rongeur afin d'étudier les différents paramètres qui sous-tendent les interactions sociales. Quelques exemples pourront être pris chez les autres mammifères mais seulement dans le but d'illustrer certains propos.

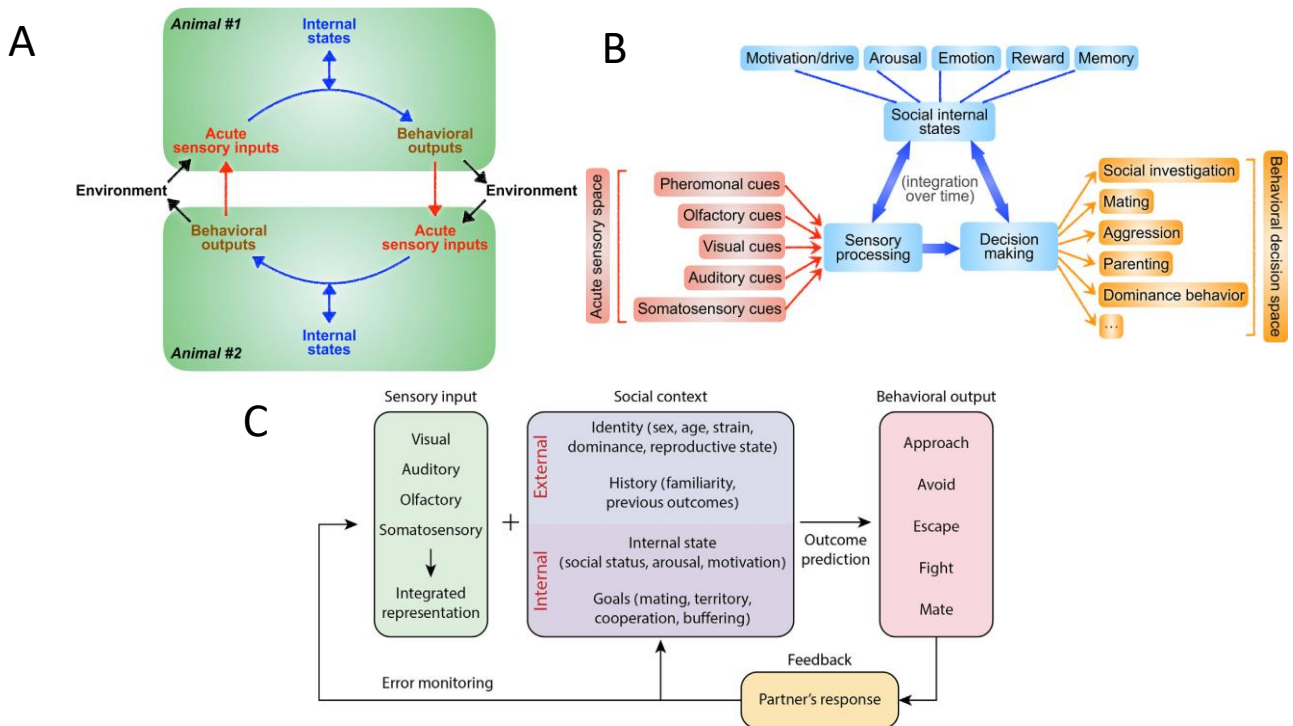


Figure 1. Les différents processus des interactions sociales (A) Représentation schématique de deux cerveaux décideurs. Les informations perçues sont intégrées et une réponse comportementale va être effectuée. Cette réponse prend en compte les comportements de l'autre animal (d'après Chen & Hong 2018) (B) Exemple d'informations sensorielles perçues qui vont être intégrées à l'état interne de l'animal. En fonction des paramètres internes et externes, l'animal va choisir la réponse comportementale qui lui semble la plus appropriée. (D'après Chen & Hong 2018) (C) Processus engagés dans les interactions sociales : détection et intégration des informations sensorielles, intégration aux informations internes avant de choisir le comportement approprié. Après la réalisation de son comportement, l'animal reçoit un retour de son interaction (D'après and Levy, 2021).

1.1.2. Les étapes de la prise de décision

La prise de décision peut être décomposée en plusieurs étapes (voir **Figure 2**, Doya, 2008; Ernst and Paulus, 2005; Rangel et al., 2008).

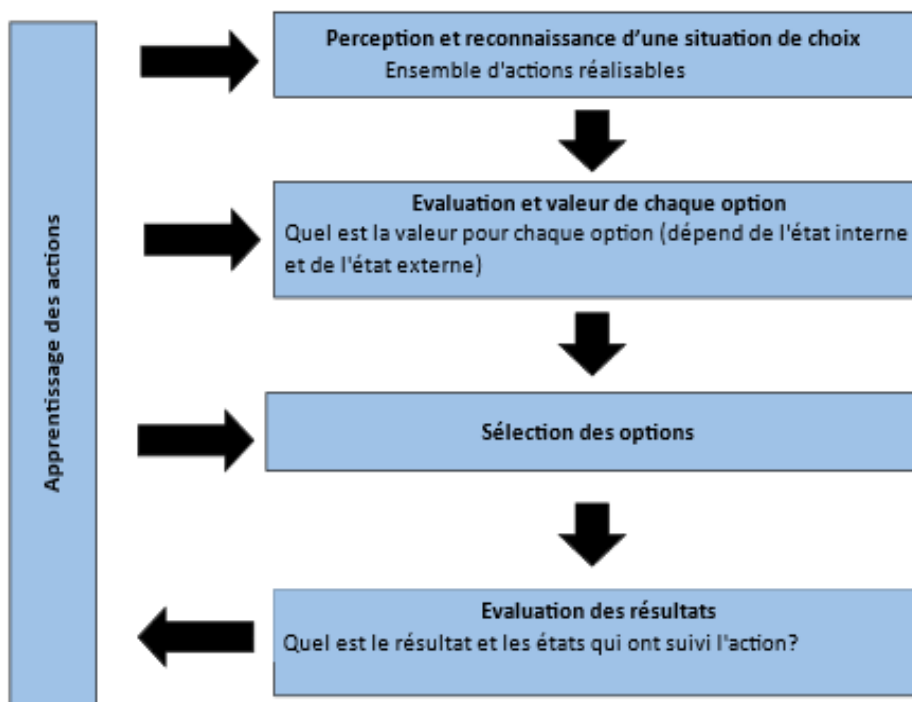


Figure 2. Les étapes de la prise de décision (d'après Rangel et al, 2008)

La première étape est la perception et la reconnaissance des différentes actions possibles lorsqu'un individu est confronté à une situation. Il va donc intégrer différentes informations provenant de son état interne (motivation, émotion, état physiologique), ainsi que des informations provenant de l'environnement externe (ressources disponibles, congénère présent, environnement stressant...). Cette intégration permet à l'animal d'aboutir aux différentes options et actions possibles pour répondre à la situation.

La deuxième étape consiste à évaluer les différentes options et notamment le ratio coût/bénéfice de chaque action. Par exemple, l'individu va estimer l'effort que lui demande cette action en fonction de la récompense, le temps nécessaire pour l'obtenir et le risque lié à celle-ci. Toutes ces actions vont donc être analysées et une valeur sera attribuée à chacune d'entre elles.

La troisième étape se définit par le choix de l'individu de l'option la plus avantageuse dans le contexte donné.

L'étape suivante comprend l'évaluation des conséquences de ce choix et de déterminer si la valeur obtenue correspond aux bénéfices attendus.

L'ensemble de ces étapes aboutit à un apprentissage qui modifiera et influencera les décisions suivantes et permettra d'améliorer les choix quand une situation similaire se présentera.

Comparaison entre les étapes de l'interaction sociale et l'étape de la prise de décision

Nous pouvons remarquer que les étapes permettant de réaliser une interaction sociale sont similaires à celles d'une prise de décision non sociale. Les interactions sociales peuvent donc constituer de bons modèles de prise de décision. Il existe cependant quatre différences : la première est que lors des interactions sociales, la décision est principalement focalisée sur le domaine social, c'est-à-dire la détection de stimuli sociaux, parfois au détriment de stimuli non sociaux, la deuxième distinction est que lors d'une interaction sociale, il y a un phénomène de réciprocité car deux individus ou plus décident de ce qu'ils vont faire. Ainsi, les interactions sociales peuvent être considérées comme la résultante de deux cerveaux décisionnaires (Chen and Hong, 2018), un dernier élément très important est le phénomène de flexibilité comportementale qui est la capacité d'adapter son comportement en fonction du contexte. Dans le cadre des interactions sociales, cette flexibilité se définit aussi par le fait que les deux individus doivent s'adapter en fonction de ce que l'autre fait. En effet, si l'animal A décide d'approcher et que l'animal B montre un comportement agressif, l'animal A doit prendre en compte cette information et modifier son comportement d'approche en évitant le risque de morsures, par exemple. Le fait de devoir s'adapter aux comportements de son congénère sous-entend une incertitude lors des choix entre plusieurs actions. En effet, dans une interaction sociale on ne peut prédire avec certitude la réaction du congénère. Cette notion d'incertitude est donc très importante dans une interaction sociale. Avec ces éléments, nous pouvons considérer que l'interaction sociale est un modèle spécifique de prise de décision.

1.1.3. A quel type d'interaction nous intéressons nous ?

Les interactions sociales recourent un ensemble de comportements : reproducteurs, agressifs, entre congénères du même sexe, ou bien encore la relation parent-jeune. De plus, certaines interactions sociales se déroulent différemment à des moments distincts de la vie, comme par exemple avant la puberté, à l'adolescence, à l'âge adulte ou à un âge plus avancé.

Nous pouvons aussi voir des comportements entre deux espèces différentes, par exemple entre proies et prédateurs.

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressé uniquement aux interactions mâle-mâles de souris adultes. Nous avons fait le choix d'étudier la souris car c'est un animal social ainsi qu'un modèle permettant de réaliser des modifications génétiques, ce qui facilite la compréhension des mécanismes neurobiologiques. Plus précisément, j'ai étudié des souris jeunes adultes afin d'étudier le comportement lorsque le développement cérébral est totalement terminé. De plus, nous n'avons pas voulu utiliser des souris trop âgées afin d'éviter les conséquences du vieillissement. Ainsi, nous allons nous intéresser aux interactions sociales libres et réciproques entre deux animaux adultes durant lesquelles ils devront s'adapter aux comportements de l'autre et, ainsi, mettre en œuvre toutes les étapes de la prise de décision.

1.2. Circuit influençant le cerveau social

Le cerveau social, ou "social brain" en anglais, réfère à toutes les structures cérébrales engagées dans les processus cognitifs sociaux (Fernández et al., 2018) dont les principales structures sont représentées en **Figure 3**. Le but de cette partie est de présenter succinctement les circuits qui sont impliqués dans le cerveau social afin d'obtenir un aperçu global, même si bien évidemment, d'autres structures auraient pu être ajoutées. De plus, les flèches mises en **Figure 3** indiquent les principales connexions entre ces structures.

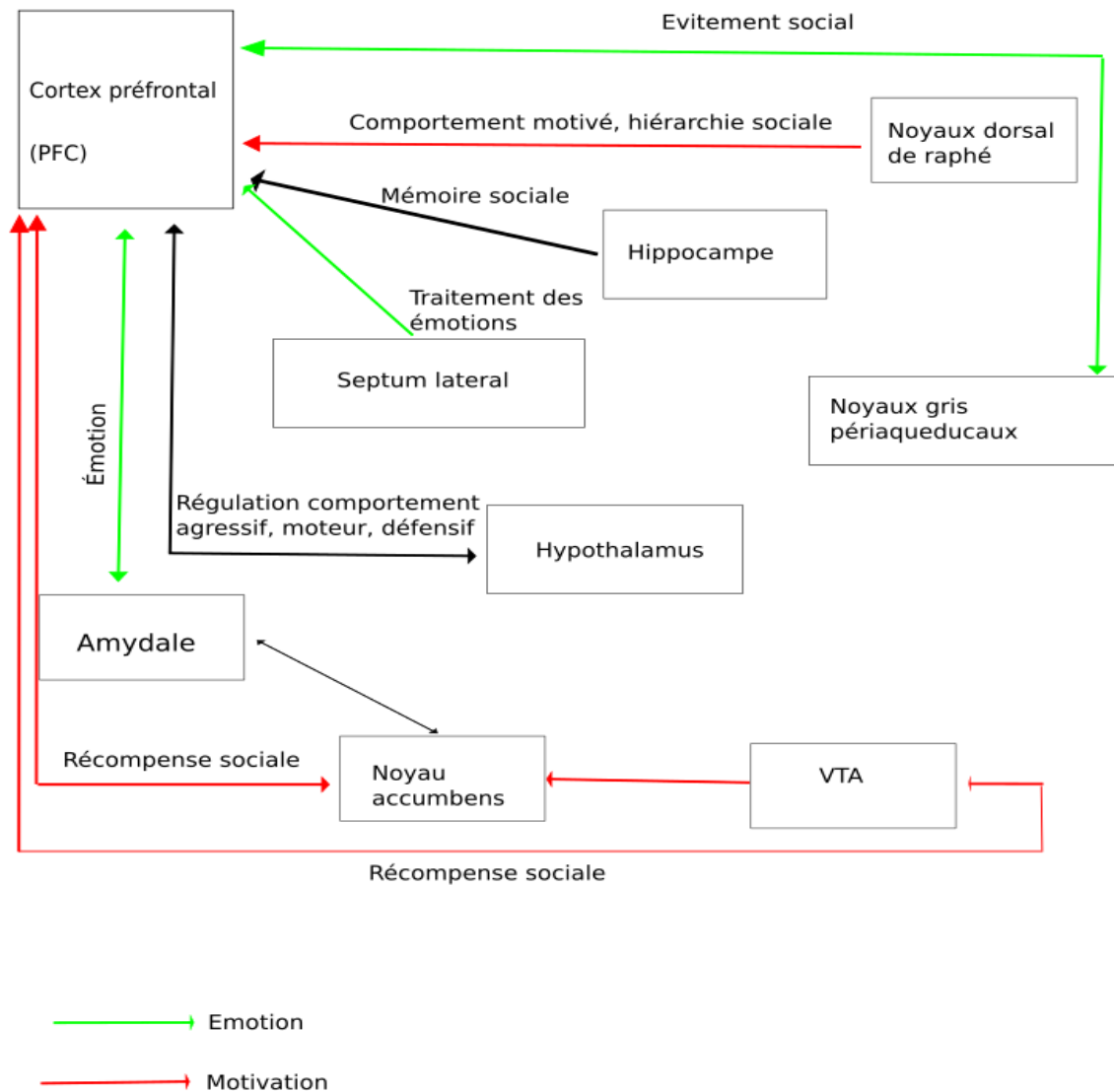


Figure 3. Schéma simplifié du cerveau social représentant la majorité des connexions entre différentes structures et le CPF. _Les flèches vertes constituent principalement des projections impliquées dans les processus émotionnels alors que les flèches rouges constituent des projections impliquées dans les processus de motivation (D'après Yizhar and Levy (2021)).

1.2.1. Principales structures impliquées dans le cerveau social

L'amygdale

L'amygdale est une structure complexe localisée dans le lobe temporal qui contient approximativement 13 noyaux chez le primate. Les noyaux les plus connus sont l'amygdale basolatérale (BLA), l'amygdale médiane (MeA) et l'amygdale central (CeA).

Cette structure reçoit des entrées du noyau thalamique et du cortex préfrontal et se projette dans le cortex préfrontal (CPF), le septum latéral, l'hypothalamus) et le noyau accumbens (Nac).

L'amygdale est impliquée dans les comportements sociaux, les processus émotionnels tels que la peur ainsi que la reconnaissance des stimuli sociaux et reçoit des informations sensorielles provenant par exemple du bulbe olfactif (Adolphs, 2009; Fernández et al., 2018; Ko, 2017; Yizhar and Levy, 2021).

L'aire tegmentale ventrale (ATV)

L'ATV est une structure cérébrale envoyant des projections au striatum ou au CPF et qui est fortement impliquée dans les processus motivationnels.

Le striatum

Le striatum est composé de différentes régions distinctes dont les principales sont : le striatum dorsal contenant le putamen et le noyau caudé ainsi que le striatum ventral qui contient principalement le noyau accumbens (Nac). Le noyau accumbens est quant à lui divisé en deux parties, le noyau accumbens core et le noyau accumbens shell.

La partie dorsale du striatum est connectée au cortex sensoriel et moteur alors que la partie ventrale est connectée elle au CPF, à l'amygdale et à l'hypothalamus.

Le striatum dorsal est principalement impliqué dans les comportements moteurs alors que le noyau accumbens est davantage lié à la motivation sociale et aux comportements dirigés vers un but (Fernández et al., 2018; Yizhar and Levy, 2021).

L'hypothalamus

L'hypothalamus contient trois zones distinctes : la zone périventriculaire (autour du troisième ventricule), la zone médiane et la zone latérale. Le noyau paraventriculaire est fortement impliqué dans le comportement social.

L'hypothalamus reçoit principalement des entrées neuronales du cortex somatosensoriel (olfactif, tactile et douleur), du tronc cérébral, du CPF ou de l'hippocampe. Cette structure se projette au niveau du cortex préfrontal, de l'aire tegmentale ventrale et de l'amygdale.

Cette structure est principalement impliquée dans les fonctions neuroendocrines, de régulation des comportements agressifs, reproducteurs et défensifs et joue un rôle dans l'affiliation sociale (Fernández et al., 2018; Ko, 2017).

Le septum latéral

Cette structure est composée de trois régions distinctes : le septum latéral, médian et postérieur et est connectée au ATV, l'hypothalamus et l'amygdale. En vue de ces connexions, cette structure fait partie des composantes importantes du système limbique et a un rôle majeur dans le traitement des émotions (Fernández et al., 2018).

Substance grise périaqueducale (PAG)

Cette structure est divisée en différentes parties : dorso médiale, dorsolatérale, latérale et ventrolatérale composant le PAG. Elle interagit avec les structures limbiques telles que l'amygdale mais également avec des structures comme le cortex préfrontal.

Sa fonction permet de réguler les comportements agressifs, d'évitement comme la défaite sociale, de traiter la peur sociale ou non ainsi que la communication sociale (Ko, 2017).

Le noyau dorsal du raphé

Ce noyau contient les noyaux des neurones sérotoninergiques et envoie tout comme il reçoit des connexions réciproques au CPF médian. Il est impliqué dans beaucoup de fonctions et sous-tend les comportements motivés, l'attention, les comportements sociaux, l'apprentissage et la mémoire (Ko, 2017).

L'hippocampe

L'hippocampe peut être divisée en 5 parties : le gyrus denté, le CA1, CA2, CA3, CA4 La partie ventrale de l'hippocampe possède de fortes connexions réciproques avec l'amygdale et le CPF médian ainsi qu'avec le noyau dorsal du raphé et l'hypothalamus. Cette structure joue un rôle dans les fonctions de mémoire globale et sociale ou encore pour les comportements de peur et d'anxiété (Ko, 2017; Yizhar and Levy, 2021).

Le cortex préfrontal médian (CPFm)

Cette partie du cortex est impliquée dans les hautes fonctions cognitives dont la planification, l'organisation, la prise de décision et l'interaction sociale. Sur le schéma de la **Figure 3**, nous pouvons voir que l'ensemble des structures citées auparavant sont connectées au cortex préfrontal (Fernández et al., 2018; Ko, 2017; Yizhar and Levy, 2021), ce qui nous permet d'estimer que cette partie est une structure clef pour le cerveau social. La composition et fonction de cette structure seront très fortement développées dans la partie suivante.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons détailler de manière plus précise les rôles de certaines des structures évoquées en **Figure 3**, même si nous nous intéresserons principalement au cortex préfrontal.

Le cortex préfrontal, cœur du cerveau social : étude des bases neurobiologiques et anatomiques

1.2.1.1. Exemple du cas Phineas Gage

Depuis le cas de Phinéas Gage, de nombreuses études ont montré que le CPF est impliqué dans la cognition sociale qui regroupe tous les processus impliqués dans l'interaction sociale (Adolphs, 2001; 2009). L'histoire de Phinéas Gage se déroule en 1848 lorsqu'il travaillait en tant que contremaître dans la construction des voies de chemin de fer. Au cours de son travail, il fût victime d'une explosion durant laquelle une barre de fer lui transperça le crâne. Après cet accident, même si son comportement semblait normal, Halow, le médecin qui l'avait évalué, nota un changement de sa personnalité. Entre autres, il avait des difficultés de jugement et de prise de décision ainsi que des troubles de la cognition sociale. L'analyse du trajet de la barre de fer montra que les lésions étaient particulièrement retrouvées dans le cortex orbito-préfrontal (voir **Figure 4**, Damasio et al., 1994; Ratiu et al., 2004). D'autres études ont par la suite confirmé le cas de Phinéas Gage.

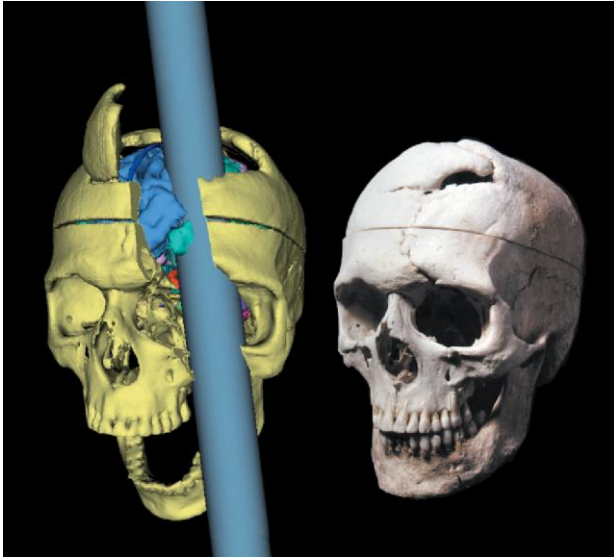


Figure 4. Reconstruction en 3D du trajet de la barre de fer à partir du cas de Phinéas Gage
(D'après Ratiu et al., 2004).

1.2.1.2. Anatomie du cortex préfrontal chez le rongeur

Chez le rongeur (rat et souris), le cortex préfrontal peut se diviser en plusieurs parties (Dalley et al., 2004) : le **cortex préfrontal médian** qui est composé de l'infralimbique (IL), du prélimbique (Prl), du cortex cingulaire antérieur (ACg1 et ACg2) et du cortex orbitofrontal médian (MO), le **cortex préfrontal latéral** composé de l'insula agranulaire dorsal et ventral (AID et AIV) et du cortex latéral orbital (LO) et le **cortex préfrontal ventral** qui comprend le cortex ventral orbital (VO) et le cortex orbitofrontal latéral (VLO).

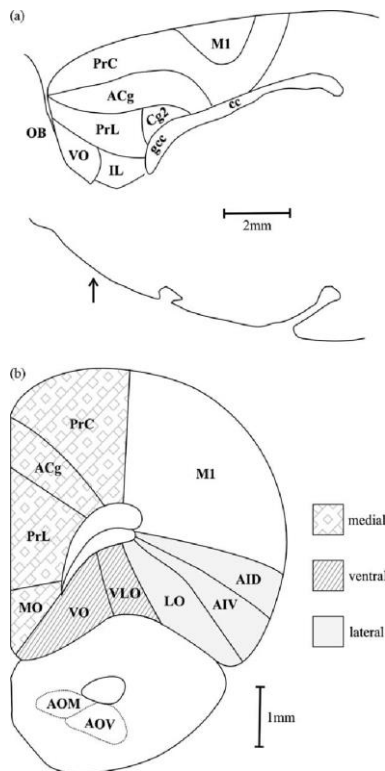


Figure 5. Schéma représentant le cortex préfrontal chez le rat ((Dalley et al., 2004). a) Coupe latérale. b) Coupe coronale. Les abréviations utilisées sont les suivantes : ACg : cortex cingulaire antérieur, AID : cortex cingulaire agranulaire dorsal, AIV : cortex cingulaire agranulaire ventral, AOM : noyau olfactif médial antérieur, AOV : noyau olfactif antérieur ventral, CC : corps calleux, Cg2 : cortex cingulaire de l'aire 2, IL : cortex infralimbique, LO : cortex orbital latéral, M1 : aire motrice primaire, MO : cortex orbitaire médial, OB : bulbe olfactif, PrL : cortex prélimbique, PrC : cortex précentral, VLO : cortex orbital ventrolatéral, VO : cortex orbital ventral.

1.2.2. Fonction du cortex préfrontal et de ses sous structures anatomiques

Après le cas de Phinéas Gage, de nombreuses autres études réalisées chez l'homme et la souris ont confirmées et approfondies les rôles du cortex préfrontal. En effet, ces études ont montrées un rôle dans les fonctions cognitives telles que les comportements sociaux (Avale et al., 2011; Franklin et al., 2017; Ko, 2017), la planification (Ferguson and Gao, 2018), les fonctions exécutives (Dalley et al., 2004; Ferguson and Gao, 2018; Granon et al., 2003), l'attention (Ferguson and Gao, 2018; Franklin et al., 2017; Gritton et al., 2016), la mémoire de travail (Ferguson and Gao, 2018; Granon et al., 1994), la prise de décision (Avale et al., 2011; Krawczyk, 2002), la flexibilité cognitive (Ferguson and Gao, 2018; Granon and Changeux, 2012; Pittaras et al., 2016a) et les émotions (Rolls et al., 2020; Rudebeck and Rich, 2018).

1.2.2.1. Le cortex orbitofrontal (COF)

Le cortex orbitofrontal est la partie la plus ventrale du cortex préfrontal qui joue un rôle dans la cognition et les émotions, notamment lors du traitement émotionnel (Adolphs, 2001; Rolls, 2004; Rolls et al., 2020; Rudebeck and Rich, 2018). En effet, il a été montré que le cortex orbitofrontal participait au décodage du visage et des expressions faciales (Barat et al., 2018). Dans cette même étude, le COF s'activait différemment selon si l'individu était un mâle, une femelle, un individu familier ou bien étranger ou encore lorsqu'un individu était dominant face à un autre individu dominé (Barat et al., 2018).

De plus, le cortex orbitofrontal est mobilisé lors d'une situation conflictuelle. Certaines données de la littérature suggèrent que le COF pourrait permettre l'établissement d'une "carte cognitive" (Rudebeck and Rich, 2018; Stalnaker et al., 2015) ce qui suggère que le COF va permettre l'intégration de différentes informations sensorielles, comme le toucher, la vision, le goût, l'olfaction, l'audition, ainsi que des informations émotionnelles (Rolls, 2004; Rolls et al., 2020). A la suite de cette intégration, le COF permet la prédiction et détermination d'une valeur positive et négative de toutes les options possibles qui va dépendre du coût bénéfice/risque. Cette balance intègre aussi bien les états sensoriels, émotionnels que cognitifs. Par l'établissement de ces valeurs, l'individu (humain ou souris) pourra se représenter l'ensemble des options possibles avec pour chacune d'entre elles une valeur plus ou moins bénéfique. C'est ce qu'on peut appeler une carte cognitive (Rolls et al., 2020; Rudebeck and Rich, 2018; Yizhar et al., 2011). Enfin, l'établissement de cette valeur permet à l'individu de pouvoir prendre sa décision.

Le COF est une structure qui peut également servir aux mécanismes d'apprentissages. Par exemple, lorsqu'après la réalisation d'un choix la valeur que l'on avait attribuée à cette option ne correspond pas à la valeur obtenue, on observe alors un mécanisme d'apprentissage car la valeur précédemment attribuée par le cortex orbitofrontal sera modifiée par la valeur actuelle (Izquierdo et al., 2007; Stalnaker et al., 2015; Yizhar et al., 2011).

D'autres études ont aussi montré le rôle du cortex orbitofrontal dans la flexibilité comportementale. Par exemple, une étude montre qu'une lésion de le COF perturbe le renversement de règle, soit les souris étaient tout à fait capables d'apprendre la règle mais lors

du changement de règle, elles avaient des difficultés à acquérir la nouvelle règle et persévéraient beaucoup plus dans l'ancienne règle comparées aux souris contrôles. De plus, cette difficulté était associée à un comportement beaucoup plus impulsif. Cela peut s'expliquer par une absence de mise en place des valeurs pour les options et une conservation de l'habitude de l'ancienne règle qui fait que le choix de la souris se fait de manière plus rapide (Mar et al., 2011; Winstanley et al., 2004).

Pour finir, le COF reçoit des informations sensorielles et il possède des projections neuroanatomiques vers le système limbique (comme l'insula et l'amygdale) mais aussi vers des structures impliquées dans la motivation (striatum ventral), la mémoire (hippocampe) ou encore vers le lobe temporal. Il est aussi connecté à d'autres structures impliquées dans le comportement social telles que le PAG, le thalamus ou d'autres structures du cortex préfrontal (Rudebeck and Rich, 2018).

1.2.2.2. Le cortex cingulaire antérieur

Le cortex cingulaire est une région du cortex préfrontal qui permet d'évaluer le coût ou bénéfice de chaque action afin d'obtenir une récompense (Hillman and Bilkey, 2012; Yizhar and Levy, 2021; Zeeb et al., 2015). Ainsi, cette structure intervient lors d'une situation conflictuelle. Des expériences ont montré dans un labyrinthe en T avec un bras ayant une faible récompense et un autre avec une forte récompense mais où le rongeur doit grimper sur une barrière pour y accéder, qu'après une lésion de la CCA chez le rat, ils préféraient le bras avec un faible coût bénéfice mais nécessitant peu d'effort plutôt que d'obtenir une forte récompense qui nécessite un plus grand effort. La même expérience a été réalisée chez des rats non lésés et ils ont montré qu'ils préféraient la forte récompense (Salamone et al., 2003). En revanche, lorsque les deux bras ont la même valeur de récompense, les rats s'orientent vers le bras qui nécessite le moins d'effort. De plus, d'autres études ont aussi suggéré que cette structure interviendrait dans la prédiction de futurs efforts réalisés.

Également, plusieurs études ont montré que la CCA pouvait jouer un rôle dans les comportements sociaux. En effet, cette structure participe à l'évaluation des coûts et bénéfices des informations sociales et non sociales (Adolphs, 2001, 2009) et par exemple, une lésion de la CCA provoque une perte d'intérêt pour interagir avec son congénère (Hillman and Bilkey,

2012). Il a été aussi montré que cette structure peut agir dans la prédiction sociale (Lockwood and Wittmann, 2018), entre autres lors du traitement des émotions et dans les mécanismes empathiques (Singer et al., 2004; Yamagishi et al., 2020). Par exemple, une étude objective qu'une suppression des récepteurs d'ocytocine dans le CCA diminue les comportements d'aide à la détresse d'une souris (Yamagishi et al., 2020).

1.2.2.3. Les cortex prélimbique (PRL) et infralimbique (IL)

Le cortex prélimbique (Prl) et infralimbique (IL) se situent dans le cortex préfrontal médian. De manière générale, ces structures ont un rôle dans les comportements sociaux et les fonctions cognitives car une lésion du cortex prélimbique impacte les performances en mémoire de travail (Dalley et al., 2004; Gisquet-Verrier and Delatour, 2006; Granon et al., 1994), des fonctions exécutives (Granon et al., 1994; Vertes, 2006) ainsi que du contrôle émotionnel (Minami et al., 2017; Yizhar and Levy, 2021).

Ces deux structures sont également impliquées dans les processus de prise de décision. En effet, des études ont montré par c-Fos (Pittaras et al., 2016a) ou par lésion (Zeeb et al., 2015) l'implication du Prl lors d'une prise de décision. Pour faire ceci, les différents auteurs cités précédemment ont réalisé une tâche de gambling chez le rongeur qui se compose de quatre choix dont deux sont plus avantageux (plus grande probabilité d'obtenir une récompense) et les deux autres sont plus désavantageux (plus faible probabilité d'obtenir une récompense). L'étude de Zeeb et collaborateur (2015) a montré qu'une lésion du cortex infralimbique et prélimbique entraîne le rat à choisir le bras qui était le plus désavantageux. De la même manière, l'étude de Pittaras et collaborateur (2016) a montré que les souris qui choisissaient majoritairement les bras avantageux, soit les choix comportant peu de risques mais moins flexibles, présentaient une hypoactivation du Prl. En revanche, la prédominance de choix risqués plus flexibles est sous-tendue par une hyperactivation du Prl. Ces deux études ensemble suggèrent que le Prl est impliqué dans le maintien des choix optimums (Pittaras et al., 2016a; Zeeb et al., 2015). De plus, une autre étude a démontré qu'un antagoniste des récepteurs nicotiques dans le Prl compromet la prise de décision dans une tâche de mémoire de travail (Granon et al., 1995).

Comme introduit plus haut, prendre une bonne décision nécessite d'intégrer tous les paramètres environnementaux, c'est-à-dire de mettre en œuvre des processus attentionnels efficaces. L'étude de Gritton et collaborateur (2016) a montré, lors d'une tâche comportementale où la souris devait appuyer sur un levier suite à un indice lumineux afin d'avoir une récompense, que la libération d'acétylcholine (ACh) dans le Prl augmente la détection des indices. Cette libération se produit même en absence d'indice lumineux, ce qui entraîne donc une augmentation de faux positifs. Cette étude montre également que l'inhibition de l'ACh dans le Prl provoque une augmentation de la non détection de l'indice lumineux, ce qui confirme alors que la libération d'ACh dans le Prl est nécessaire pour la détection des indices environnementaux (Gritton et al., 2016).

La capacité de pouvoir s'adapter à son environnement est un aspect très important dans les processus de prise de décision. Nous avons abordé précédemment le rôle majeur des cortex prélimbique et infralimbique dans la flexibilité comportementale et, plus précisément, lors d'une tâche de renversement de règle. Les auteurs ont montré que dans une tâche de changement de règle le Prl et l'IL n'étaient pas impliqués dans l'apprentissage de la règle ni dans l'acquisition d'une stratégie, mais plutôt dans l'inhibition d'une stratégie précédemment apprise et le choix d'une stratégie nouvelle (Ragozzino et al., 1999). De plus, il a été montré que les rats lésés au niveau de l'IL, tout comme ceux ayant des lésions dans les deux régions, présentent des difficultés à établir une nouvelle stratégie à la suite d'un changement de règle, alors qu'une lésion du Prl seul induit un défaut dans la sélection et le maintien d'une stratégie (Granon and Changeux, 2012; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010).

La réalisation d'une bonne interaction sociale est aussi dépendante du Prl et de l'IL. L'étude de Avale et collaborateur (2011) a permis de montrer d'une part que le comportement social est profondément altéré après lésion du Prl et que réaliser une interaction sociale avec un congénère nouveau active cette structure. D'autre part, cette étude a montré que les souris chez lesquelles les récepteurs nicotiques neuronaux sont absents (souris beta2 KO) présentaient des comportements sociaux très perturbés, alors que la réexpression de ce récepteur spécifiquement dans le Prl des souris beta2 KO grâce à un vecteur lentiviral restaure le répertoire social (Avale et al., 2011). Une autre étude observa lors d'une tâche d'interaction sociale, un taux de décharge plus important du Prl pendant les comportements d'approches

vers un congénère et pendant le contact social, ainsi qu'une diminution de son activité lors d'un comportement de fuite. En revanche, pour l'IL nous pouvons voir l'effet inverse : le taux de décharge est plus important lors des comportements de fuite et il diminue lors des comportements d'approches et de contacts (Minami et al., 2017).

L'étude d'une structure cérébrale seule nous apporte de nombreuses informations sur son rôle dans un réseau. Cependant, l'activité du Prl et de l'IL peut également être influencée par leurs projections. Par exemple, une activation par optogénétique des neurones du Prl projetant sur l'amygdale basolatérale (BLA) inhibe la préférence sociale, alors qu'une activation des neurones de l'IL sur le BLA la favorise (Huang et al., 2020). En revanche, l'étude de Minami et collaborateurs (2017) montre une augmentation de l'activité du Prl lors du comportement d'approche et de contact, ainsi qu'une diminution lors des comportements de fuite. En ce qui concerne l'IL, nous observons une augmentation de son activité lors des comportements d'échappement. Bien que cette étude puisse paraître contradictoire avec celle de Huang et collaborateurs (2020) au niveau du rôle des deux sous parties du PFC, elle montre leur implication dans les comportements sociaux. De plus, deux études de l'équipe ont montré une interaction entre les différentes sous-parties du PFC dans les interactions sociales (Boukersi et al., 2021; Nosjean et al., 2018). Ensemble, ces études montrent que les structures préfrontales appartiennent à un réseau dont l'étude globale est indispensable pour bien comprendre les mécanismes cérébraux sous-tendant les comportements sociaux.

1.2.3. Le cortex préfrontal est impliqué dans la flexibilité comportementale

Afin de prendre une bonne décision ou de bien interagir, il est souvent nécessaire de faire preuve de flexibilité comportementale qui est définie par la capacité de donner une réponse appropriée lors d'un changement de l'environnement (Granon and Floresco, 2009; Uddin, 2021). Cette capacité peut être essentielle pour la survie : par exemple, si un animal a l'habitude d'aller toujours manger au même endroit, le jour où un prédateur se trouvera à son point de nourriture, il devra changer de comportement ou de trajet, c'est-à-dire inhiber son comportement habituel et trouver une autre option.

Des études ont montré que le cortex préfrontal était très important pour contrôler cette flexibilité comportementale (Floresco et al., 2008; Pittaras et al., 2016a; Rich and Shapiro, 2009;

Uddin, 2021). Le manque de flexibilité peut donc aboutir à une rigidité comportementale qui a déjà été observée pour des pathologies telles que les troubles du spectre autistique ou les troubles obsessionnels compulsifs et, plus généralement, après des lésions du CPF. A l'inverse, être trop flexible peut aboutir à changer tout le temps de décision ou de comportement, comme par exemple avec l'hyperactivité ou les déficits d'attention (Uddin, 2021).

1.2.3.1. La flexibilité comportementale dans le cas de l'interaction sociale

Dans le cadre de la cognition sociale, l'animal doit en permanence s'adapter à son environnement et/ou à son congénère. De plus, il ne peut que supposer les différentes réactions possibles de son congénère en fonction des signaux sociaux qu'il reçoit et qu'il interprète sans avoir de certitude. Le choix ou la décision de l'animal implique une certaine prise de risque et comporte une forte incertitude. Un défaut de flexibilité dans le cadre social peut être évalué dans un test d'interaction sociale. Le principe de ce test est simple : on place deux souris qui ne se connaissent pas dans une cage expérimentale où l'on quantifie leurs interactions. Dans ce test, l'animal doit gérer un conflit entre deux motivations, soit explorer son environnement ou interagir avec son congénère (Granon et al., 2003). Nous pouvons alors mesurer la flexibilité de l'animal par le rapport entre le temps d'exploration et le temps de contact social. Il a été montré que l'utilisation de souris KO de la sous-unité nicotinique bêta 2 entraînait un problème de flexibilité (Granon et al., 2003; Serreau et al., 2011). De plus, ces souris réalisaient plus de contacts sociaux que les souris WT mais exploraient moins l'environnement (Granon et al., 2003). Même si le test d'interaction sociale permet de déterminer un défaut de flexibilité, il ne nous permet pas d'en déterminer l'origine. En effet, un manque de flexibilité peut provenir d'un problème de représentation des différentes options, de sa capacité à inhiber un comportement préalablement renforcé, d'une difficulté à prédire le comportement de son congénère, d'un problème dans l'évaluation ou l'estimation des risques, ou même d'une diminution ou augmentation de l'intérêt pour son congénère.

Par conséquent, le test d'interaction sociale seul ne permet pas de déterminer de manière précise le problème de flexibilité. Il existe d'autres tests comportementaux permettant de mesurer cette flexibilité comportementale, bien évidemment chacun d'entre eux avec leurs

propres spécificités. L'utilisation de ces différents tests peut nous permettre de mieux comprendre les problèmes de flexibilité comportementale observés.

1.2.3.2. Mesure de la flexibilité comportementale

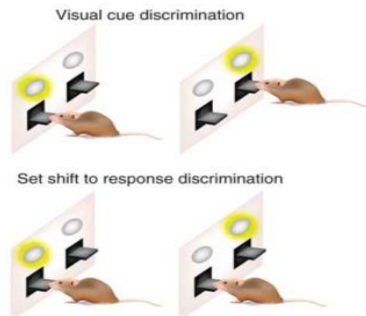
L'expérience la plus classique est la tâche de renversement de règle. Le principe est qu'une fois que le rongeur a appris la tâche, on change la règle afin d'observer si l'animal est capable de se désengager de la règle précédemment apprise pour en apprendre. Cette tâche a été utilisée dans de multiples conditions tels que un labyrinthe en T, labyrinthe aquatique de Morris, conditionnement opérant, chez plusieurs espèces (souris, rat, singe ...) (Gisquet-Verrier and Delatour, 2006; Izquierdo et al., 2007; Schoenbaum et al., 2000).

Un autre test très utilisé est le "set-shifting", aussi appelé "attentional set shifting" qui est utilisé chez le singe (Dias et al., 1997) comme chez le rongeur (Birrell and Brown, 2000; Floresco and Jentsch, 2011). Dans cette tâche, on présente deux bols, l'un comportant de la nourriture cachée par une texture particulière et associée à une odeur spécifique et l'autre comportant seulement une autre texture associée à une autre odeur. L'animal doit retrouver la nourriture en apprenant progressivement quelle est l'information utile (texture ou odeur). Après plusieurs essais corrects, la règle d'appariement change : la nature de l'information peut changer (odeur, au lieu de texture, par exemple, et on parle alors de "extra-dimensional shift) ou l'information, au sein d'une même catégorie change (l'odeur auparavant positive devient négative et on parle alors d'intra-dimensional shift). Cette tâche a aussi été adaptée dans un labyrinthe en croix (Floresco and Jentsch, 2011; Floresco et al., 2006) et dans une chambre opérante (Floresco and Jentsch, 2011; Floresco et al., 2008).

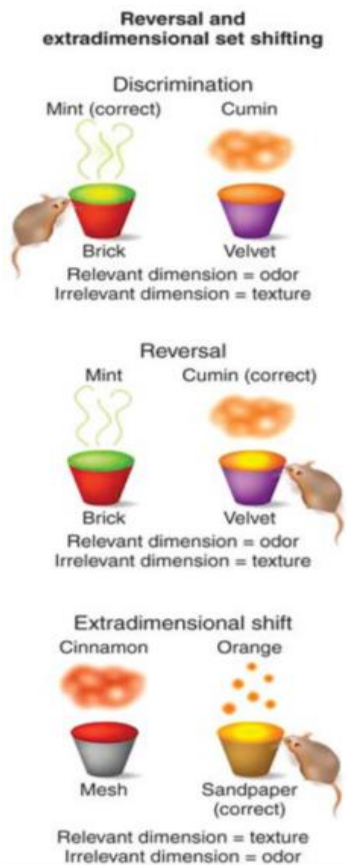
Un test comportemental mis au point par Bechara et Damasio chez l'Homme, l'Iowa Gambling Task ou IGT (Bechara et al., 1994, 1996), permet aussi d'évaluer la flexibilité et la prise de décision. L'un des intérêts de ce test est qu'il permet d'étudier des processus de prise de décision dans une situation conflictuelle et incertaine, car les conséquences du choix ne sont pas connues à l'avance. Le sujet peut seulement évaluer la probabilité d'obtenir la récompense et un risque non négligeable de perdre existe, selon une règle qu'on peut progressivement découvrir. Le principe du test est que le sujet dispose de 2000 \$ avec l'objectif de maximiser les gains. Pour ceci, le sujet dispose de quatre paquets de cartes (A, B, C, D),

pouvant à la fois faire perdre et gagner de l'argent avec des montants variables et imprévisibles. Les paquets A et B sont dits défavorables car le sujet gagne 100 \$ systématiquement, mais les montants qu'il peut perdre sont plus importants (150 à 1250\$) et surviennent fréquemment, alors que les paquets C et D sont dits favorables car, même si le montant gagné systématiquement est moins important (50\$), les pertes sont à la fois moins importantes (25\$ à 250\$) et moins probables. La probabilité de gain ou de perte associée aux cartes est inconnue, tout comme le nombre d'essais qu'il lui sera possible de réaliser. Progressivement, les choix des sujets sains s'orientent principalement vers les paquets avantageux, alors que les patients cérébrolésés présentent une rigidité comportementale. En effet, ces patients ont des difficultés à inhiber une stratégie (changer de paquet de cartes), même s'ils déclarent savoir que cette stratégie n'est pas adéquate. Le Iowa Gambling Task a été adapté chez le rat (Rat Gambling Task ou RGT, Rivalan et al., 2009), et chez la souris (Mouse Gambling Task ou MGT, Pittaras et al., 2013, 2016a). Chez le rongeur, le principe est identique à l'IGT mais la récompense a été remplacée par de la nourriture normale et la pénalité (perte d'argent) a été remplacée soit par un délai d'attente plus ou moins long pour l'obtenir (RGT) ou par de la nourriture aversive (pellet imbibée de quinine dans le MGT). L'un des grands intérêts du test de gambling est qu'il permet d'évaluer la prise de décision chez la souris dans une situation avec risques et incertitudes car la probabilité de chaque bras n'est pas connue (**Figure 6**).

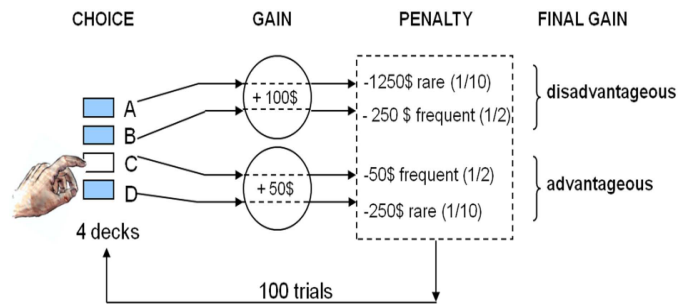
A Apprentissage par changement de règle



B Tache de flexibilité comportementale de changement de Règle "Setshifting"



C Test de jeu de Iowa "Iowa Gambling Task"



D Test de jeu chez la souris "Mice Gambling Task"

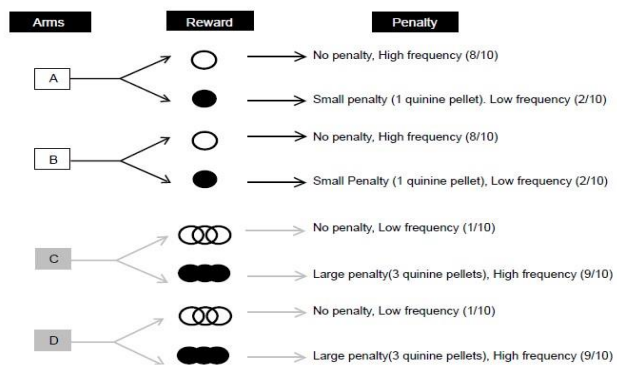


Figure 6. Schéma expliquant le principe de différents tests évaluant la flexibilité comportementale. A) Schéma montrant le principe de l'apprentissage par renversement de règle, (D'après Floresco and Jentsch, 2011). B) Schéma du principe de set-shifting, image reprise de (d'après Floresco and Jentsch, 2011). C) Schéma du principe de l'Iowa Gambling Task, (D'après de Visser et al., 2011). D) Schéma montrant le principe du Mice Gambling Task, (D'après Pittaras et al., 2013).

1.2.3.3. Implication du cortex préfrontal et circuit neuronal impliqué dans les comportements flexibles

Comme déjà évoqué plus haut, avoir un comportement flexible est très important pour réaliser un comportement social. Nous avons aussi vu que le cortex préfrontal est très fortement impliqué dans les comportements flexibles. Le but de cette partie est de montrer quels sont les circuits cérébraux impliqués dans la flexibilité comportementale.

Les données montrent qu'une lésion du cortex préfrontal médian ne perturbe pas l'apprentissage d'une règle, alors qu'elle impacte l'inhibition d'une ancienne règle afin d'en acquérir une nouvelle (Birrell and Brown, 2000; Floresco et al., 2008; Granon and Floresco, 2009; Granon et al., 1994). De plus, il semblerait que chaque partie du CPF joue un rôle spécifique dans la flexibilité comportementale. En effet, le cortex orbitofrontal joue un rôle dans les choix impulsifs et la persévération (Granon and Floresco, 2009) et il a été montré qu'une lésion du cortex orbitofrontal perturbait le renversement de règle (McAlonan and Brown, 2003). Le cortex cingulaire antérieur, quant à lui, est impliqué dans l'apprentissage des stimuli qui prédisent la récompense. Une lésion de cette structure peut ainsi impliquer un retard d'apprentissage mais aucune difficulté de flexibilité comportementale (Bussey et al., 1997; Granon and Floresco, 2009). Le cortex prélimbique et infralimbique semblent être impliqués dans la flexibilité comportementale, notamment en participant à l'inhibition de la stratégie précédemment apprise, et dans la sélection des choix optimaux (Floresco et al., 2008; Ragozzino et al., 2002; Zeeb et al., 2015). Une analyse plus approfondie a pu montrer que l'inhibition des récepteurs D1 et D2 de la dopamine dans le CPF perturbait l'acquisition de la nouvelle stratégie et augmentait les erreurs préservatrices. (Jenni et al., 2017)

Le circuit de la flexibilité comportementale fait intervenir d'autres structures cérébrales, dont le noyau accumbens, qui y tient un rôle important. Une distinction a été faite entre les parties core et shell du noyau accumbens : la partie core (centrale) permet l'acquisition et le maintien d'une nouvelle règle et d'éliminer les réponses non appropriées, alors que la partie shell (écorce externe) permet l'apprentissage de stimuli non pertinents (Floresco et al., 2006). Le thalamus semble également jouer un rôle dans la flexibilité, notamment par sa liaison avec le PFC, qui permet de se désengager d'une stratégie précédemment pertinente (Granon and Floresco, 2009). De plus, la connexion entre le thalamus et le noyau accumbens permet

d'éliminer les actions devenues inefficaces (Granon and Floresco, 2009). Ainsi, le CPF est très impliqué dans la flexibilité comportementale et, en particulier, dans l'inhibition d'une ancienne stratégie, ce qui permet l'installation d'une stratégie nouvelle, plus adaptée au nouvel environnement ou à la nouvelle demande. La flexibilité comportementale est fortement modulée par le système dopaminergique préfrontal. Une étude de l'équipe de Stan Floresco a récemment montré que les neurones qui expriment les récepteurs de type D1 dans le CPF participent à l'interaction directe avec le noyau accumbens et jouent ainsi un rôle majeur dans le renforcement des gains et l'atténuation des pertes. Les neurones du CPF qui expriment les récepteurs de type D2 interagissent avec le BLA et sont impliqués dans le changement entre choix récompensants et non récompensants (Jenni et al., 2017). Cette étude montre donc l'implication des récepteurs dopaminergiques, à l'intersection de deux parties du réseau, dans les choix risqués. Ainsi, le récepteur à la dopamine D2 semble être impliqué dans une prise de décision flexible alors que le récepteur D1 aiderait à réaliser des choix plus logiques orientés vers de fortes récompenses (**Figure 7**).

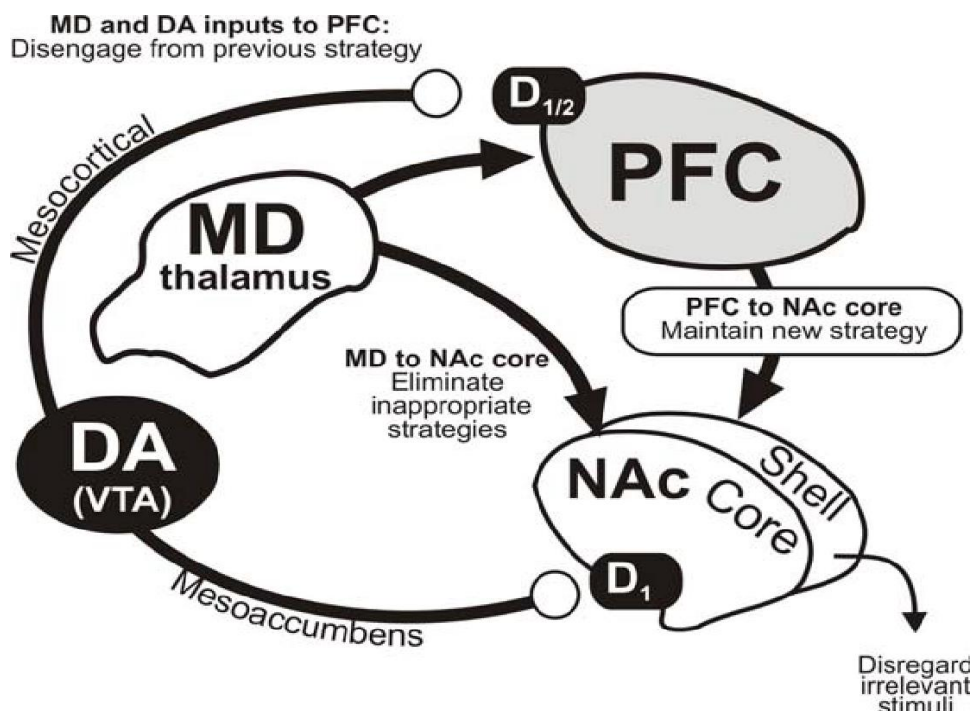


Figure 7. Circuit cérébral impliqué dans les comportements flexibles (D'après Granon and Floresco, 2009)

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents et comme illustré en **Figure 7**, les circuits cérébraux sous-tendant les comportements flexibles recouvrent une partie des structures impliquées dans le cerveau social. Donc le circuit montré en **Figure 7** n'est pas spécifique aux comportements sociaux, ce qui signifie que les structures impliquées dans le cerveau social ne sont pas uniquement mobilisées pour l'aspect social.

1.2.4. Le cortex préfrontal est impliqué dans les processus attentionnels

Comme vu au tout début de ce manuscrit, il est possible de considérer que l'interaction sociale est un modèle de prise de décision dans un contexte spécifique car lorsque l'on interagit avec un congénère, on doit faire des choix dont l'issue est, parfois, incertaine. Par conséquent, les individus interagissant portent leur attention sur les différentes informations et options possibles (Yu and Dayan, 2005). Les travaux portant sur l'attention montrent qu'elle peut varier en fonction des choix et que les événements qui semblent importants dans un contexte donné sont des attracteurs attentionnels (Brandstätter and Körner, 2014). Par exemple, lors d'une tâche de jeu où les probabilités de remporter des gains sont non connues, les personnes sont plus attentives aux stimuli qui permettent d'obtenir un maximum d'argent par rapport à ceux qui rapportent une plus petite somme. De même, les sujets étaient plus attentives à l'option permettant de perdre le moins d'argent (Brandstätter and Körner, 2014). Une autre étude montre que plus on est attentif au choix que l'on va effectuer, plus on sera certain de ses choix (Zizlsperger et al., 2012). Ces quelques données montrent que les phénomènes d'attention sont impliqués dans la prise de décision et, par conséquent, lors d'une interaction sociale.

De nombreuses études ont été réalisées sur les processus de la vigilance (pour revue). Dans la revue de Graef et collaborateurs (2011), les auteurs mettent en relation l'état de vigilance avec les performances comportementales (**Figure 8**) : les performances sont excellentes lorsque la vigilance est optimale. La diminution de la vigilance (à gauche de la courbe) aboutit à une hypovigilance et à une diminution des performances, alors que l'augmentation de la vigilance (à droite de la courbe, hypervigilance) est contingente de la diminution des performances. Les états d'hypovigilance ou d'hypervigilance peuvent aboutir à des défauts de prise de décision. Ainsi, maintenir un bon niveau d'attention et de vigilance est primordial afin de réaliser des comportements optimaux.

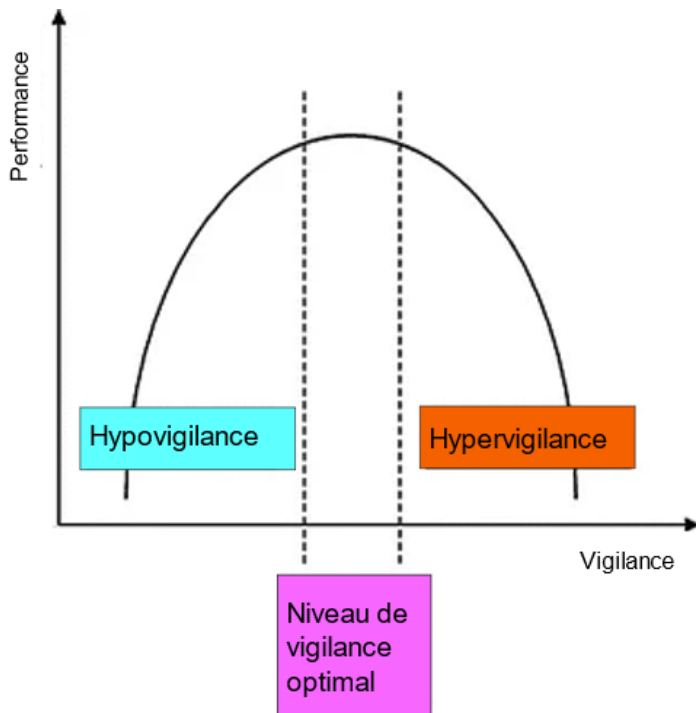


Figure 8. Courbe en U inversé représentant l'état de vigilance Le sommet de la courbe représente le niveau de vigilance optimal. Un manque de vigilance peut entraîner une hypovigilance et diminuer nos performances comportementales. Un surplus de vigilance entraîne une diminution des performances comportementales. (D'après de Graef et al. 2011).

Des études ont donc montré que les processus attentionnels font intervenir le cortex préfrontal (Bloem et al., 2014a; Dalley et al., 2004; Granon et al., 2000; Poorthuis and Mansvelder, 2013; Robbins et al., 1998). Par exemple, une lésion du cortex prélimbique augmente les réponses persévératives (Dalley et al., 2004), c'est-à-dire que le rat choisit toujours la même option, sans prendre en compte les changements d'environnement. En outre, l'activation ou l'inhibition de l'activité des récepteurs dopaminergiques préfrontaux aura un effet différent sur les performances attentionnelles, en fonction de la performance initiale des sujets (Granon et al., 2000), renforçant l'idée de l'existence d'un état attentionnel optimum, qui dépendrait de l'activité dopaminergique préfrontale. La libération de dopamine préfrontale provient des neurones situés dans l'aire tegmentale ventrale (AVT), eux-mêmes sous contrôle du système cholinergique (Maskos et al., 2005a).

Il y a par ailleurs été montré, depuis plusieurs décennies, que les processus attentionnels étaient fortement influencés par l'activité cholinergique corticale (pour revue Robbins et al., 1998). Des études montrent qu'un KO de la sous-unité nicotinique bêta2 diminue la détection d'un indice lumineux, c'est-à-dire que la souris réalise plus d'omission

(elle ne réagit pas au stimulus pertinent) mais que sa précision n'est pas affectée. La réexpression de cette sous-unité dans le cortex prélimbique restaure un comportement à un niveau normal (Bloem et al., 2014a; Poorthuis and Mansvelder, 2013) alors qu'une inhibition de la sous-unité alpha 7 provoque une augmentation d'omission lors d'une charge attentionnelle élevée (Howe et al., 2010; Poorthuis and Mansvelder, 2013). De même, l'inhibition de la sous-unité nicotinique alpha 5 diminue la précision lors du test attentionnel à 5 choix (5 CSRTT), qui nécessite un haut niveau d'attention. Les études présentées ici montrent que les récepteurs cholinergiques nicotiques jouent un rôle déterminant dans la modulation attentionnelle. D'autres études ont montré que l'attention pouvait être modulée également par les récepteurs cholinergiques muscariniques (Furey et al., 2008; Klinkenberg et al., 2011; Thiele, 2013). L'étude de Gritton et collaborateur (2016) a montré que la libération d'Ach dans le PrL entraîne plus de fausses détections -réponses à des événements inexistantes. En effet, la souris répondait plus souvent à un stimulus alors que celui-ci n'existait pas (Gritton et al., 2016), ce qui confirme donc aussi que la modulation de la vigilance peut créer des troubles comportementaux.

Pour conclure, l'attention joue un rôle primordial dans les processus de prise de décision car elle permet d'être attentif à son environnement et de sélectionner la meilleure option à effectuer. La régulation des processus attentionnels fait intervenir le cortex préfrontal mais aussi d'autres structures comme l'hippocampe (Klinkenberg et al., 2011). De plus, comme montré précédemment, l'Ach joue un rôle essentiel dans les processus attentionnels, mais d'autres neuromodulateurs comme la dopamine, la sérotonine, la noradrénaline au sein du cortex préfrontal jouent aussi leurs rôles dans les processus attentionnels (Dalley et al., 2004).

1.3. Paramètre influençant les interactions sociales

1.3.1. La perception des stimuli sociaux peut influencer notre interaction sociale

Percevoir les stimuli sociaux et non sociaux est une étape indispensable pour réaliser une interaction sociale. La perception des stimuli sociaux peut être assurée par différentes modalités sensorielles, que je vais développer ci-dessous.

1.3.1.1. Les informations olfactives

L'olfaction est l'un des sens principaux chez le rongeur. Les souris utilisent bien sur les informations olfactives pour trouver de la nourriture ou détecter les prédateurs, mais la vie

sociale d'une souris est principalement gouvernée par l'odeur (Winiarski et al., 2021). Il a été montré que la détection d'une odeur sociale provoque une augmentation des approches sociales dans un test dit de "trois chambres" (Contestabile et al., 2021; Ryan et al., 2008). et les odeurs permettent la reconnaissance des individus ainsi que leur statut social et sexuel (Winiarski et al., 2021).

Les voies de signalisation olfactives ont déjà été bien décrites dans la littérature (Dulac and Wagner, 2006; Li and Dulac, 2018). Les indices olfactifs sont détectés par deux systèmes (voir **Figure 9**), tout d'abord l'odeur est perçue par le bulbe olfactif principal, puis par les cellules mitrales du MOB qui envoient des fibres à différents noyaux du paléocortex, formant collectivement le cortex olfactif primaire et comprenant le cortex piriforme (Pir), le cortex entorhinal (EC), le noyau olfactif antérieur (AON), le tubercule olfactif (OT) et l'amygdale latérale (LA). Puis, ces différentes structures vont se projeter vers l'hypothalamus. Cette voie est principalement utilisée pour la détection de tous types de signaux chimiques olfactifs (Dulac and Wagner, 2006).

Le deuxième circuit sert principalement à détecter les phéromones (Dulac and Wagner, 2006). Les phéromones sont décrites comme « des substances excrétées à l'extérieur par un individu et reçues par un second individu de la même espèce chez qui elles déclenchent une réaction spécifique, par exemple, un comportement défini ou un processus de développement ». Les phéromones sont captées par l'organe voméronasal (OVN) dont les cellules vont se projeter vers le bulbe olfactif accessoire qui vont rejoindre ensuite les noyaux basaux de la strie terminale (BNST) et de l'amygdale médiane pour atteindre ensuite l'hypothalamus. Il a été montré que l'activité de l'hypothalamus régule différents comportements sociaux tels que les attaques, la reproduction et les comportements maternels et sexuels. En effet, en fonction du sexe et de l'expérience sociale, l'activation de l'hypothalamus peut être différente (Li and Dulac, 2018; Wang et al., 2017). Par exemple, en fonction du type de phéromone reçue, l'activation de l'hypothalamus chez le mâle peut provoquer des comportements agressifs ou bien des comportements d'accouplements (Li and Dulac, 2018; Remedios et al., 2017; Stowers, 2002). De plus, en fonction du sexe, certaines structures cérébrales peuvent avoir des rôles divers. Par exemple, il a été montré que l'activation de l'aire préoptique médiane de l'hypothalamus chez le mâle est fortement impliquée dans les

comportements reproductifs et paternels, alors que chez la femelle, elle n'implique pas de comportements reproducteurs (Li and Dulac, 2018). L'OVN permet de détecter les phéromones d'autres individus et joue ainsi un rôle déterminant dans les comportements sociaux.

Des études ont montré que le bulbe olfactif principal est capable de détecter certaines substances volatiles de l'urine provenant d'autres souris (Lin et al., 2005). Toutefois, une lésion du bulbe olfactif accessoire chez les souris mâles n'empêche pas de distinguer les substances volatiles urinaires d'une femelle ovariectomisée de celles d'une femelle en oestrus. En revanche, cette ablation atténue la motivation des souris mâles à rester en contact nasal direct avec l'urine de femelle (Jakupovic et al., 2008). Ces données démontrent bien que les deux circuits du bulbe olfactif principal et du OVN interagissent, aboutissant ainsi à une réponse comportementale optimale.

Même si l'olfaction est particulièrement importante chez l'animal et notamment chez le rongeur, lui permettant à lui seul la modulation de l'approche sociale (Contestabile et al., 2021; Ryan et al., 2008), les autres sens jouent aussi un rôle pour assurer l'efficacité des interactions sociales.

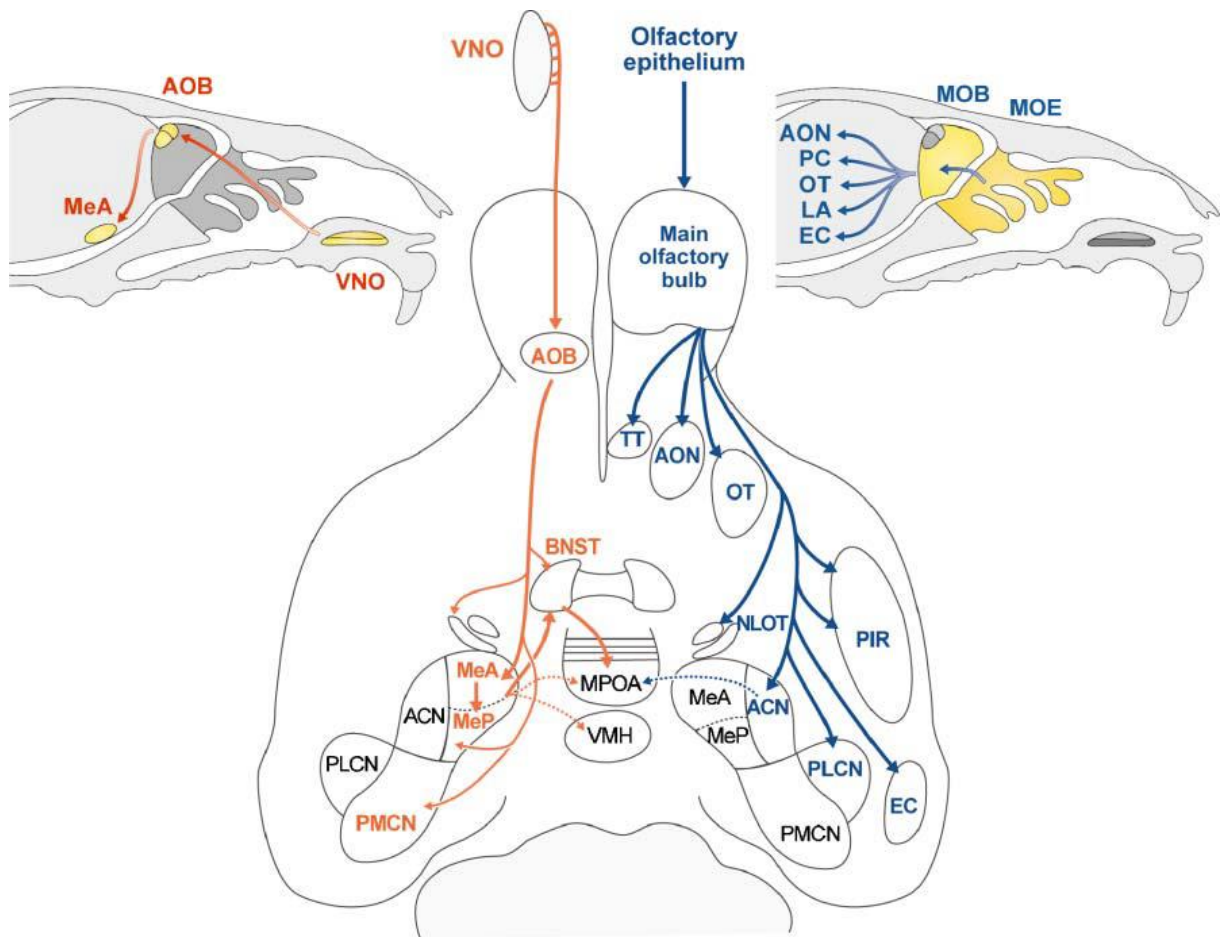


Figure 9. Circuit neuronal permettant la détection des indices sensoriels chez la souris. La cavité nasale des mammifères contient deux structures anatomiquement et chimiquement distinctes. Chaque structure est associée à un réseau neuronal différent. Le système voméronasal (représenté à gauche) comprend le bulbe olfactif accessoire (AOB), qui reçoit des entrées sensorielles de l'organe voméronasal (VNO) et projette vers le noyau amygdaloïde cortical médian (MeA/MeP) et postéro médian (PMCN) avec des connexions supplémentaires vers le noyau du lit postérieur de la stria terminalis (BNSTp). Le système olfactif principal (à droite) comprend le bulbe olfactif principal (MOB), qui reçoit des entrées de l'épithélium olfactif principal (MOE) et projette vers le noyau cortical antérieur (ACN) et le noyau amygdaloïde cortical postéro-latéral (PLCN), le noyau olfactif antérieur (AON), le tubercule olfactif (OT), le ténia tecta (TT), le cortex piriforme (Pir) et le cortex entorhinal (EC). Les deux voies se connectent à l'hypothalamus (D'après Li and Dulac, 2018).

1.3.1.2. Les informations tactiles

Les informations tactiles captées par les vibrisses sont très importantes pour les comportements affiliatifs, agressifs ou sexuels (Kolunje and Stern, 1990; Ryan et al., 2008). En effet, il a été montré qu'une anesthésie péri-buccale chez les rats en période de lactation diminue très fortement les comportements agressifs (Kolunje and Stern, 1990). Chez le rat

adulte, il a été montré que les échanges tactiles (le toucher) sont importants dans l'interaction sociale comme mesuré lors d'un test de préférence de place conditionnée. En effet, des études ont remarqué lorsque que l'on privait les rats de contacts sociaux (suppression des informations tactiles) par la mise en place d'une vitre en verre entre les deux individus, cela avait pour conséquence de réduire le nombre d'interactions sociales et de supprimer la préférence de place chez les rats (Kummer et al., 2011). L'ensemble de ces données montrent que le sens du toucher favoriserait les interactions sociales chez le rat. Les auteurs montrent que les autres stimuli (visuels, olfactifs) ne conduisent pas à des préférences de place, par comparaison aux stimuli tactiles (Kummer et al., 2011). Les vibrisses jouent aussi un rôle très important pour le comportement social par leur implication dans la communication sociale, l'agression, la hiérarchie sociale, la composante émotionnelle ou encore les comportements de jeu (Ahl, 1986; Pellis et al., 1996). De façon cohérente, une suppression des vibrisses peut perturber l'ensemble de ces comportements et, par conséquent, perturber l'interaction sociale (Ahl, 1986).

1.3.1.3. Les informations visuelles

La vision est une autre modalité sensorielle importante dans l'interaction sociale. En effet, une ablation de la vision génère des comportements atypiques (Pellis et al., 1996). Les auteurs concluent alors que la vision tient un rôle actif dans l'organisation des séquences des mouvements, d'attaques, de défenses dans le jeu, les combats et d'autres interactions rapprochées. De plus, la vision joue un rôle dans les comportements agonistiques (comportements de compétition) car la déplétion visuelle perturbe les comportements d'attaques (Ahl, 1986). Comme nous avons pu le voir dans ces quelques exemples, la vision est une modalité sensorielle importante pour réaliser les comportements sociaux.

Les autres modalités sensorielles

La gustation a aussi une implication dans les comportements sociaux. Par exemple, lorsque l'on place deux bols de nourriture dans une arène puis que l'on introduit un démonstrateur qui choisit de consommer un bol de nourriture par rapport à l'autre, l'observateur aura tendance à choisir le bol choisi par le démonstrateur (Laland and Plotkin, 1993). Cette préférence du bol choisi peut se développer car le démonstrateur a marqué par des dépôts excrétoires ce bol de

nourriture spécifique. Cette préférence peut se transmettre chez plusieurs rats, où chaque rat déposera également des dépôts excrétoires influençant le choix des congénères suivants. Mais la préférence peut aussi se réaliser par un contact gustatif entre un rat ayant consommé cette nourriture et un rat naïf où le rat ayant mangé la nourriture peut, suite au contact social, transmettre cette préférence au rat naïf pour la nouvelle nourriture (Laland and Plotkin, 1993).

Comme nous avons pu le voir, chaque modalité sensorielle code certaines informations sociales. Afin de réaliser une interaction sociale performante, tous les sens de la souris sont importants. En effet, les souris préfèrent des environnements complexes apportant des stimulations de plusieurs modalités sensorielles par rapport à des environnements plus simples, ne comportant qu'une seule modalité sensorielle, comme par exemple la simple présence d'une odeur sociale (Contestabile et al., 2021). L'ensemble de ces informations reçues sera intégré par l'animal et combiné à l'état interne de l'animal.

1.3.2. Etat interne de l'individu

Afin de réaliser une interaction sociale, l'individu doit traiter toutes les informations sensorielles reçues qui sont aussi confrontées à son propre état interne. Il doit être capable de reconnaître son congénère et de déterminer si l'individu est plutôt amical ou agressif. Suite à ces distinctions, les réactions de l'animal ne seront pas identiques. Un autre paramètre important est la structure hiérarchique qui peut influencer les interactions sociales. La motivation sociale peut être décrite comme un ensemble de dispositions psychologiques et de mécanismes biologiques qui poussent l'individu à s'orienter préférentiellement vers le monde social (orientation sociale), à rechercher et prendre du plaisir dans les interactions sociales (récompense sociale) et à s'efforcer de favoriser et de maintenir les liens sociaux (stabilité sociale, (Chevallier et al., 2012). Nous pouvons considérer ici que la motivation à aller voir ou non un congénère est le résultat d'un ensemble de processus inconscients qui permettent de définir la cause de l'interaction. Si l'animal n'a aucune raison d'interagir ou s'il considère que cette interaction peut être négative (risque de comportement agressif), la motivation de l'animal pour aller voir son congénère sera négative.

1.3.2.1. La reconnaissance sociale

Pour qu'un animal soit reconnu, il faut qu'il soit détecté. De même, reconnaître un congénère sous-entend qu'on l'a déjà rencontré. Ainsi, cette détection peut se voir via les différents sens (Wacker and Ludwig, 2012). Reconnaître un congénère est le fondement de toute relation sociale (Bielsky and Young, 2004). car la reconnaissance sociale permet de former un attachement de court à long terme, une hiérarchie sociale et une organisation stratégique sociale chez les animaux (Bicks et al., 2015). La présentation d'une odeur sociale permet la reconnaissance sociale par sa composition de molécules odorantes qui marquent et permettent de reconnaître son congénère. En effet, des études ont montré que lors d'une première exposition olfactive où l'on présente à tous les rats une odeur sociale, les rats vont s'approcher de cette odeur. En revanche, lors de la deuxième exposition olfactive, les rats passent plus de temps à explorer le stimulus olfactif lorsque la deuxième odeur est différente de la première. Par conséquent, la diminution de la durée d'investigation peut être une mesure de la reconnaissance sociale. La présentation d'une odeur sociale permet la reconnaissance sociale car elle contient des substances olfactives qui marquent « l'individualité » (Noack et al., 2010; Thor and Holloway, 1982).

La seule présence d'une odeur sociale suffit à ce qu'un congénère s'approche (Contestabile et al., 2021; Kummer et al., 2011). Cependant, lorsque l'on met la souris dans un environnement à quatre choix où les différentes modalités sensorielles ont été séparées (tactile, visuel, olfactif, auditif), on remarque que les souris alternent entre les différentes modalités sensorielles. Les auteurs de ces études concluent que les souris préfèrent un environnement complexe plutôt qu'un environnement ne présentant qu'une seule modalité sensorielle (par exemple l'olfactif). Ainsi, l'odeur seule n'est pas préférée pour réaliser une bonne interaction (Contestabile et al., 2021).

Il a été montré que les vocalisations émises par les souriceaux activaient une structure cérébrale spécifique chez les femelles qui avaient eu une expérience avec les petits (femelle multipare). En revanche, elles ne provoquaient pas d'activation pour les femelles qui n'avaient pas eu l'expérience avec les souriceaux (femelle primipare, Ehret, 1987). Le niveau d'agression est moins important chez les rats d'une même colonie qu'entre deux rats d'une colonie étrangère (Barnett, 1958), montrant que les rats sont capables de reconnaître un individu

étranger par rapport à un individu de sa colonie. Il existe donc des indices ou molécules communes permettant de reconnaître l'appartenance à un groupe de rongeurs.

Les rongeurs sont confrontés à de multiples indices environnementaux et afin de reconnaître son congénère il est nécessaire que le stimulus "présence du congénère" soit plus prégnant que les autres stimuli. De plus, les souris sont plus attirées par les stimuli sociaux que par des stimuli neutres, même s'ils sont nouveaux (Moy et al., 2004). En ce sens, lorsqu'une nouvelle souris entre en compétition avec une souris préalablement connue lors d'une première exposition, on remarque que la souris passe plus de temps avec le nouveau congénère par rapport à l'ancien (Moy et al., 2004), montrant ainsi que les souris préfèrent la nouveauté sociale à l'exploration d'un congénère familier, tout comme elle prouve aussi que la souris est capable de mémoriser et de reconnaître un congénère familier.

Circuit codant pour la préférence sociale

Chez le rongeurs, la reconnaissance sociale passe principalement par l'olfaction (Albers, 2012; Bielsky and Young, 2004; Ferguson et al., 2002; Wacker and Ludwig, 2012). Les individus étant reconnu par l'émission de molécules odorantes spécifiques marquent l'individualité (Noack et al., 2010; Thor and Holloway, 1982).

Le circuit de l'olfaction, décrit **Figure 10**, montre que l'ocytocine (OT) et la vasopressine (AVP) sont des hormones très importantes pour la reconnaissance sociale (Albers, 2012; Bielsky and Young, 2004; Ferguson et al., 2001; Wacker and Ludwig, 2012). Les rongeurs sont capables de détecter les phéromones par l'intermédiaire de l'OVN et de l'épithélium olfactif (Dulac and Wagner, 2006). Les neurones de l'OVN vont ensuite projeter au niveau de l'AOB alors que les neurones de l'épithélium olfactif vont ensuite aller vers le bulbe olfactif principal. Au sein de ces deux structures l'OT et l'AVP peuvent jouer un rôle dans le traitement de la reconnaissance sociale (Wacker and Ludwig, 2012). Les neurones de l'AOB et du MOB vont ensuite projeter leurs terminaisons vers l'amygdale médian (MEA). Cette structure module la reconnaissance et de la formation de la mémoire sociale (Bielsky and Young, 2004; Ferguson et al., 2001; Li et al., 2017). et est globalement impliquée dans l'orientation de notre attention vers des stimuli biologiquement pertinents (Chevallier et al., 2012). De plus, elle module aussi la rencontre sociale initiale, qui est médiée principalement par l'OT. Ensuite, certains neurones du MEA iront

projeter vers le septum latéral et le BNST. Les neurones AVP de l'amygdale médian et le BNST vont projeter vers le septum latéral. L'AVP dans le septum latéral agit pour moduler le traitement ou le rappel des indices sociaux. Le septum latéral est aussi connecté à l'hippocampe qui permet de stocker et de récupérer les souvenirs. De plus, le septum latéral est relié à la MPOA de l'hypothalamus, connexion particulièrement importante dans les comportements sexuels (Albers, 2012; Bielsky and Young, 2004; Ferguson et al., 2002). D'autres structures jouent également un rôle dans la reconnaissance sociale, par exemple le cortex cingulaire antérieur (CCA) qui est impliqué dans l'intérêt pour un autre congénère. Il a été montré que la lésion de cette structure réduit les interactions sociales et que les individus auraient du mal à utiliser les informations sociales (Ferguson et al., 2001). De même, le COF est impliqué dans la distinction des visages ainsi que des émotions (Barat et al., 2018; Love, 2014; Rudebeck et al., 2007).

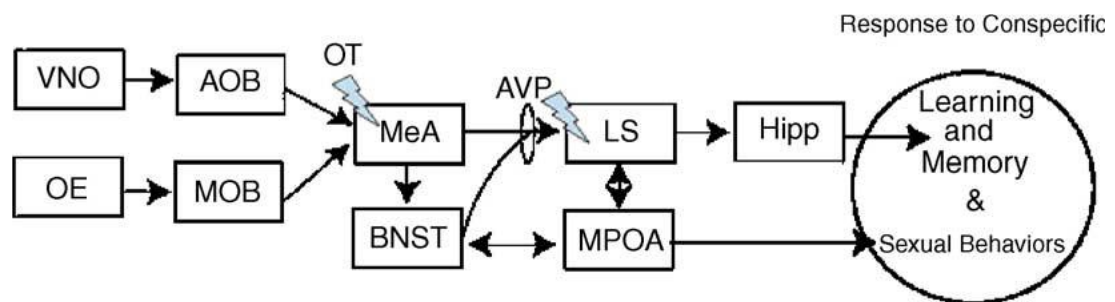


Figure 10. Circuit de la reconnaissance sociale chez les rongeurs_(D'après Bielsky and Young, 2004) Abréviations : AOB : bulbe olfactif accessoire, AVP : vasopressine, BNST : strie terminale, Hipp : hippocampe, LS : septum latéral, MeA : amygdale médian, MOB : bulbe olfactif principal, MPOA : aire préoptique médian, OE : épithélium olfactif, OT : ocytocine, VNO : organe voméronasal.

1.3.2.2. La hiérarchie sociale

Dans un groupe social, les interactions sociales se multiplient et la vie en groupe fait émerger la hiérarchie sociale. Cette structure hiérarchique a pour avantage de diminuer les conflits et de maintenir la stabilité sociale (Wang et al., 2014). Le statut de dominance a un impact important sur la survie, la santé physique et mentale et le succès de la reproduction d'un animal (Zhou et al., 2018). En effet, au sein d'un groupe social, l'individu le plus dominant aura de nombreux avantages, tels qu'une priorité d'accès à la nourriture et aux femelles (Gesquiere et al., 2011; Wang et al., 2014). Cette dominance peut s'accompagner de modifications morphologiques comme par exemple une augmentation du poids (barnett,

1958). Mais être l'individu le plus dominant aurait aussi des conséquences négatives : par exemple lorsque les individus dominés réalisent des activités _agonistiques dans le but de défendre leur position face aux autres individus du groupe social ou encore lorsqu'il faut défendre son territoire face à un individu étranger (Gesquiere et al., 2011; Wang et al., 2014). Des études ont montré qu'au sein d'un groupe social la dominance est assez stable (Larrieu et al., 2017). Si les individus d'un même groupe social subissent une défaite sociale, il a été remarqué que l'individu dominant aura tendance à développer plus de comportements de type dépressifs que les individus subordonnés (Larrieu et al., 2017). Cette étude montre que malgré les avantages que procure la dominance, la perte de celle-ci peut avoir de grandes répercussions.

L'état émotionnel et la position hiérarchique peuvent influencer le comportement social. Une mauvaise compréhension de la hiérarchie sociale peut avoir des conséquences négatives sur le groupe mais aussi sur l'individu, conduisant, par exemple, à l'exclusion sociale (Watanabe and Yamamoto, 2015). Des études ont remarqué que l'individu dominant avait tendance à couper les vibrisses des souris subordonnées. Cet effet s'appelle le bardage ou effet « dalila » (Sarna et al., 2000; Wang et al., 2014). Les vibrisses sont très importantes pour les comportements affiliatifs, agressifs ou sexuels (Kolunie and Stern, 1990; Ryan et al., 2008). donc la perte des vibrisses créent des problèmes d'interaction sociale (Ahl, 1986; Pellis et al., 1996). Cela permet à l'individu dominant d'avoir plus facilement accès aux femelles. De plus, les souris dominantes ont aussi tendance à vocaliser plus (Faure et al., 2017; Ferhat et al., 2015; Granon et al., 2018). Comme explicité davantage dans la partie vocalisation, les vocalisations ont un rôle dans l'interaction sociale. Elles permettent par exemple d'attirer les femelles, lorsqu'elles sont émises pendant la reproduction et l'accouplement. Ainsi, émettre plus de vocalisations peut comporter de nombreux avantages. De façon intéressante, la transmission d'informations est différente entre une souris dominante et une souris subordonnée. En effet, lorsqu'on présente à une souris un indice olfactif social, la transmission de l'information par une souris dominante se fera plus rapidement et à plus de congénères que si elle provenait d'une souris dominée (Winiarski et al., 2021). Cette expérience tend à prouver que les souris dominantes transmettent plus facilement des informations sociales que les souris dominées.

De manière générale, une souris dominante aura tendance à réaliser plus d'interactions que les souris dominées et les informations sociales échangées par la souris dominante seront plus facilement transmises que celles échangées par la souris dominée. Nous allons maintenant nous intéresser aux circuits neuronaux qui sous-tendent la hiérarchie sociale. Nous verrons ici que l'activité du cortex préfrontal est fortement influencée par les comportements de dominance.

Les circuits neuronaux associés à la dominance sociale ont eux aussi été très étudiés. Ces études montrent l'implication du cortex préfrontal médian dans les comportements de dominance et les comportements hiérarchiques. En effet, le cortex préfrontal permet de reconnaître, de représenter et de réguler le statut social (Coura et al., 2013; Nosjean et al., 2015; Wang et al., 2011, 2014; Watanabe and Yamamoto, 2015). Plus le CPF est actif et plus la souris sera dominante (Wang et al., 2011, 2014; Watanabe and Yamamoto, 2015). Il a été montré qu'une lésion de l'amygdale entraînait une diminution de la dominance et une augmentation des comportements agressifs (Rosvold et al., 1954). Ce qui montre l'implication de l'amygdale dans les comportements de dominance. En effet, cette structure est activée durant la réactivité émotionnelle et la détermination des expressions faciales chez l'humain. Ainsi, il semblerait que l'amygdale soit impliquée dans la structure et le maintien de la hiérarchie sociale (Watanabe and Yamamoto, 2015). L'activité striatale permet, quant à elle, de donner une valeur à chaque signal (Wang et al., 2014), et il a été montré que l'augmentation de l'activité du striatum donnait une valeur plus importante aux individus qui avaient un statut social supérieur comparé à ceux qui avaient un statut social un peu plus bas (Watanabe and Yamamoto, 2015). Ainsi, le striatum permettrait de déterminer la position hiérarchique de l'individu. Le PAG quant à lui est impliqué dans les comportements agonistiques (Wang et al., 2014). Le noyau dorsal du raphé, qui contient principalement des neurones sérotoninergiques, participe à l'acquisition de la dominance sociale. En effet, plus le nombre de neurones sérotoninergiques est important, plus le statut social est élevé (Wang et al., 2014; Watanabe and Yamamoto, 2015). La **Figure 11** montre les principales structures impliquées dans la dominance sociale.

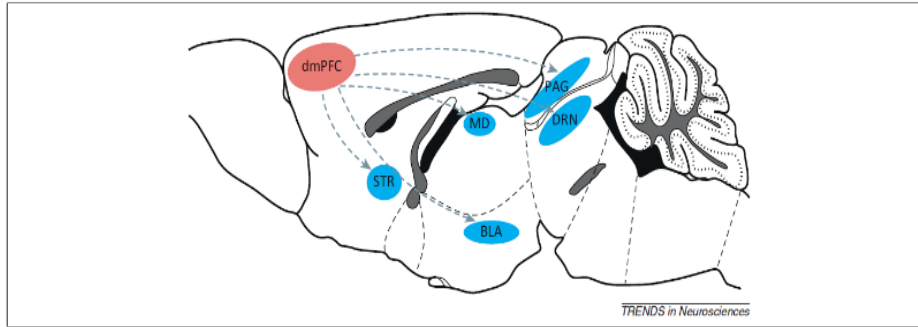


Figure 11. Circuit impliqué dans la dominance (Wang et al., 2014) Abréviations : BLA : amygdale basolatérale, dmCPF : cortex préfrontal dorsomédian, MD : thalamus médian, PAG : noyau gris périaqueducal, DRN : noyau dorsal du raphé, MD : thalamus médian, STR : striatum dorsal.

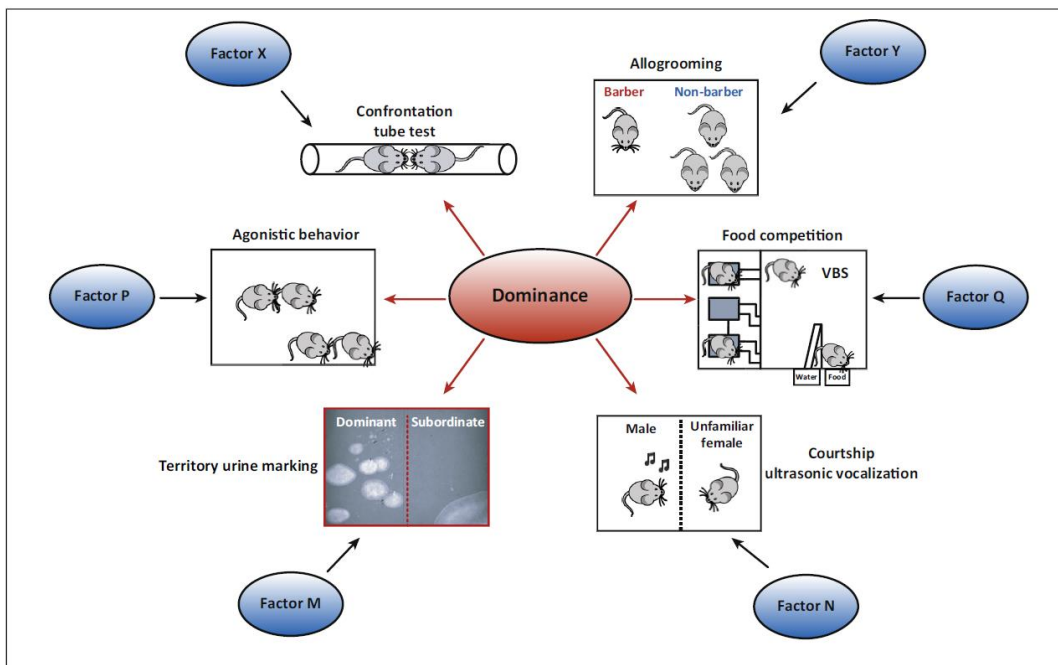


Figure 12. Quelques tests réalisés en laboratoire montrant les comportements de dominance chez la souris (D'après Wang et al., 2014).

Au laboratoire il existe plusieurs tests permettant de déterminer la dominance chez la souris (**Figure 12**). Tout d'abord, il y a le tube test qui a été décrit pour la première fois en 1961 par Lindzey et collaborateur (2016). Ce test consiste après une période d'habituation à faire entrer 2 animaux (un animal à chaque extrémité) dans un tube (Lindzey et al., 1961). Les 2 animaux vont ensuite se rencontrer au milieu du tube et devront se repousser mutuellement. L'animal qui a poussé l'autre jusqu'à l'extrémité du tube est considéré comme le gagnant « winner » et donc le plus dominant, alors que l'autre est considéré comme le perdant « loser »

et du coup comme le moins dominant (Larrieu et al., 2017; Qu and Dreher, 2018; Wang et al., 2011, 2014).

Il existe aussi un test de mesure des comportements agonistiques. Les comportements agonistiques font référence aux comportements liés à la confrontation et à la rivalité entre les individus (Wang et al., 2014). En général, l'animal qui effectue le plus de comportements agonistiques est l'animal le plus dominant. Un animal plus dominant aura tendance à marquer son territoire par l'urine (Wang et al., 2014). Tout comme, comme expliqué dans le paragraphe précédent, il aura tendance à vocaliser plus que l'animal dominé, ce qui permet par exemple d'attirer davantage les femelles. Lord of test où l'accès à la nourriture est restreint nous pouvons voir que c'est la souris dominante qui ira d'abord à la nourriture et à l'eau avant les autres souris, ce test s'appelle le Visible Burrow System (VBS). De plus, comme montré précédemment, une souris dominante aura tendance à couper les vibrisses des souris non dominantes (Sarna et al., 2000; Wang et al., 2014) ce qui a pour conséquence de perturber les interactions sociales de ces souris.

1.3.2.3. La motivation sociale

Une fois que l'animal a déterminé l'identité et le statut social du congénère, il peut choisir d'interagir ou pas, et si oui, d'une certaine manière qui va dépendre de sa motivation. Comme déjà décrit précédemment, la motivation est le désir d'un organisme à aller voir son congénère (Bicks et al., 2015). Une autre définition tout aussi intéressante est que la motivation sociale est un ensemble de dispositions physiologiques et de mécanismes biologiques qui poussent l'individu à s'orienter vers un monde social (orientation sociale), à chercher du plaisir dans les interactions sociales (récompense sociale) et à s'efforcer de favoriser et de maintenir les liens sociaux (Chevallier et al., 2012). Cette définition nous amène à trois notions : l'orientation, la récompense et le maintien social.

L'orientation sociale est le fait d'identifier un congénère par rapport aux autres stimuli environnementaux et de l'approcher. La récompense sociale suggère que la réalisation d'une interaction est un phénomène récompensant. Cette notion sous-entend aussi qu'elle induit une motivation ou un désir de réaliser un contact social. La dernière notion est le maintien social qui pourrait être définie comme le désir d'un individu à maintenir un contact social (ou

plutôt le lien social) sur une plus longue période. Cela suggère également que ces interactions ont un bénéfice pour les animaux qui interagissent (Chevallier et al., 2012; Clutton-Brock, 2009). On peut y voir par exemple, un phénomène de coopération pour obtenir des récompenses plus importantes comme plus de contacts sociaux, un plus grand accès à la nourriture ou une défense de territoire plus importante (Chevallier et al., 2012; Clutton-Brock, 2009). Afin de conserver ces avantages, il convient donc de faire en sorte de maintenir ces contacts de façon la plus stable possible.

La motivation sociale est ainsi un vaste domaine de recherche et semble très importante lors des tâches d'intégration sociale. Un problème de motivation sociale peut perturber l'interaction sociale et peut être aussi l'une des causes de pathologie comme le trouble du spectre autistique (Chevallier et al., 2012). Nous allons donc dans la partie suivante voir quelles sont les principales structures impliquées dans la motivation sociale.

Circuit impliquée dans la motivation sociale

Ces études ont montré que la voie mésocorticolimbique était impliquée dans les processus de motivation (Berridge, 2009; Bicks et al., 2015; Chevallier et al., 2012; Love, 2014; Matthews and Tye, 2019). Cette voie comporte les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale qui projettent au noyau accumbens, à l'hippocampe à l'amygdale, au pallidum ventral et au cortex préfrontal. L'amygdale va permettre un guidage attentionnel vers des stimuli biologiquement pertinents (Chevallier et al., 2012). Cette structure joue probablement un rôle important dans le calcul et la mise à jour de la valeur de chaque stimuli environnementaux dans l'orientation sociale (Chevallier et al., 2012; Klein et al., 2009). L'hippocampe va plutôt être impliquée dans les informations contextuelles telles que la détermination de l'endroit où se trouve la récompense, dans quel environnement elle a été obtenue et dans quel contexte social. Cette structure est aussi impliquée dans la détection de la nouveauté. Le pallidum ventral, lui, est impliqué dans la traduction de l'activité limbique en programmation d'actes moteurs. Le cortex orbito-frontal est impliqué dans le codage de la valeur de la récompense. Le Nac aurait un rôle intégratif, c'est-à-dire qu'il reçoit les informations d'autres structures cérébrales (hippocampe, Amy, CPF, VP) et il intégrerait toutes ces informations afin de réaliser une action ou un choix. La libération dopaminergique des neurones dopaminergiques de l'ATV projetant au CPF n'augmente pas le nombre d'approches

sociales (Gunaydin et al., 2014). En revanche, la stimulation des neurones dopaminergiques de l'ATV vers le Nac promeut l'approche sociale (Gunaydin et al., 2014). Les auteurs suggèrent que les neurones dopaminergiques de l'ATV au CPF pourraient être liés au codage des récompenses aversives comme par exemple subir un choc électrique, ou dans le cadre social, avoir subi des comportements agressifs (Lammel et al., 2008). Le schéma de la **Figure 13** récapitule le rôle de chaque structure. Par conséquent se pose la question suivante : quelle est l'information transmise par la dopamine au niveau du CPF ? A l'heure actuelle, il semble que ce rôle ne soit pas encore bien connu.

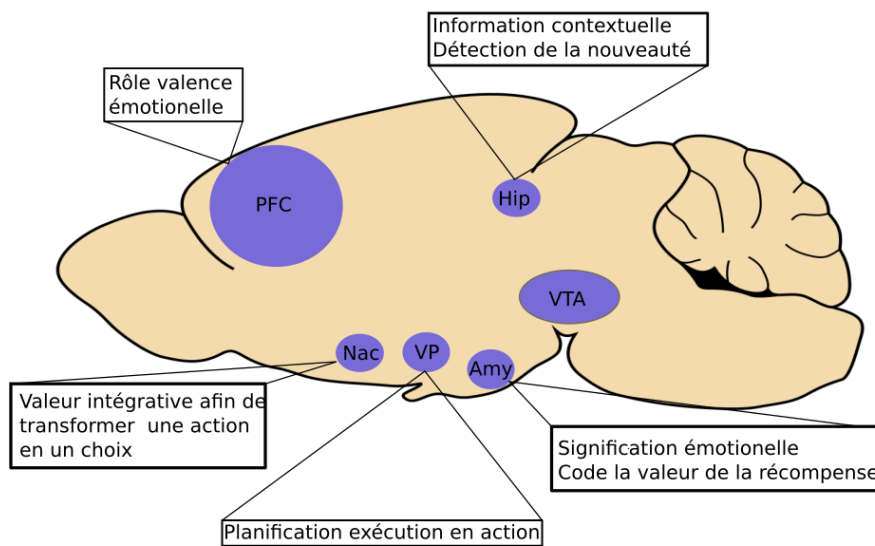


Figure 13. Schéma simplifié de la motivation (D'après Bicks et al., 2015; Chevallier et al., 2012; Gunaydin et al., 2014; Love, 2014)

1.3.3. Les émotions

Lors d'une interaction sociale, il est nécessaire de comprendre les intentions de l'autre afin d'adapter son comportement. La compréhension de l'émotion de l'autre animal peut également aider à adapter son comportement. Dans cette partie nous allons voir de quelle manière les souris expriment leurs émotions et comprennent les émotions de l'autre en se concentrant particulièrement sur les vocalisations ultrasoniques (USV pour ultrasonic vocalizations). Les USV sont un moyen de manifester les états émotionnels. Des études au laboratoire ont montré que les USV émises lors d'une interaction sociale chez les souris varient en fonction de l'état émotionnel et de motivation sociale des animaux en présence (Chabout et al., 2012; Granon et al., 2018; Lefebvre et al., 2020).

Les souris sont capables d'exprimer des émotions. Chez les rongeurs, les émotions sont principalement indexées par des réponses comportementales comme le freezing, de combat ou de fuite (Blanchard et al., 1998; Johansen et al., 2010; Yilmaz and Meister, 2013). Un isolement de trois à quatre semaines chez des souris adultes augmente significativement le nombre de contacts sociaux par rapport à des animaux qui n'ont pas été isolé, sans pour autant augmenter les comportements agressifs (Avalle et al., 2011), ce qui nous a permis d'émettre l'hypothèse d'une augmentation de la motivation sociale. De plus, des études ont montré que cette augmentation des contacts sociaux est corrélée positivement à une augmentation des USVs de haute fréquence (Chabout et al., 2012). Ces expériences suggèrent que les souris sont capables de réagir à différents contextes environnementaux menaçants ou douloureux (comme le choc électrique ou le stimulus menaçant), ou bien à des stimuli plus positifs (présence d'un congénère). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que dans chacune de ces expériences la souris se trouvait dans un état émotionnel spécifique au contexte. Comment peut-on tester cette hypothèse et y apporter des éléments ? Étudier plus avant les USV, leurs caractéristiques et leurs conditions d'émission est une approche éthologique pertinente pour plusieurs raisons, comme nous le verrons plus bas.

1.3.3.1. Les vocalisations ultrasonique comme marqueur émotionnel chez la souris

Dans le but de comprendre si les USVs permettent de transmettre une émotion, nous allons nous attarder sur les mécanismes neurobiologiques qui les sous-tendent. Il convient avant cela d'apporter une petite précision. A l'heure actuelle, les USVs des rats ont été beaucoup plus étudiées que celles des souris (pour revue voir Simola and Granon, 2019). Ainsi, on connaît bien mieux les mécanismes chez le rat que chez la souris. L'une des raisons qui explique ceci est probablement que, chez les rats, les USVs émises sont beaucoup plus stéréotypées et moins diverses que chez la souris. Toutefois, des études d'USVs chez les souris vont dans le même sens que celles émises chez les rats.

1.3.3.1.1. Circuit impliqué dans la production des sons

Pour produire des ultrasons, l'animal doit d'abord produire un son qui dépend du flux d'air entrant dans les narines. En 1975, Robert décrit deux types de sons : les sons audibles

pour l'oreille humaine ("call") inférieurs à 20 kHz produits par le larynx, et des sifflements ("whistle") permettant de produire les ultrasons inaudibles pour l'oreille humaine (Roberts, 1975). Certains auteurs ont défini un cri comme le son émis pendant une seule expiration (Sirotin et al., 2014) et le sifflement ("whistle") comme une excitation acoustique générée lorsque le flux d'air est perturbé par une obstruction quelque part dans le conduit vocal (Riede, 2011, 2013). L'hypothèse de Robert a par la suite été réfutée par Nunez et collaborateur (1985), en montrant que le larynx permettait aussi de produire des ultrasons. En effet, les auteurs ont montré qu'une lésion bilatérale des nerfs laryngés empêchait la production d'USVs chez les adultes et les petits (Boulangier-Bertolus and Mouly, 2021; Nunez et al., 1985). D'autres études ont confirmé ceci et ont montré que la contraction du larynx module le débit de l'air et la pression sous-glottique, modulant ainsi les USVs (Johnson et al., 2010; Mahrt et al., 2016; Riede, 2011, 2013).

1.3.3.1.1. Anatomie du larynx

Le larynx est composé de 5 cartilages (voir **Figure 14**) : thyroïde (TC), cricoïde (CC), aryténoïde (AC), laryngeal (LALC) et épiglote.

Le larynx est composé de muscles qui permettent la contraction : thyro-aryténoïdien (TA), crico-thyroïdien (CT), crico-aryténoïdien latéral et postérieur (LCA et PCA respectivement) et le muscle crico-aryténoïdien supérieur (SCA) (Inagi et al., 1998; Kelm-Nelson et al., 2018).

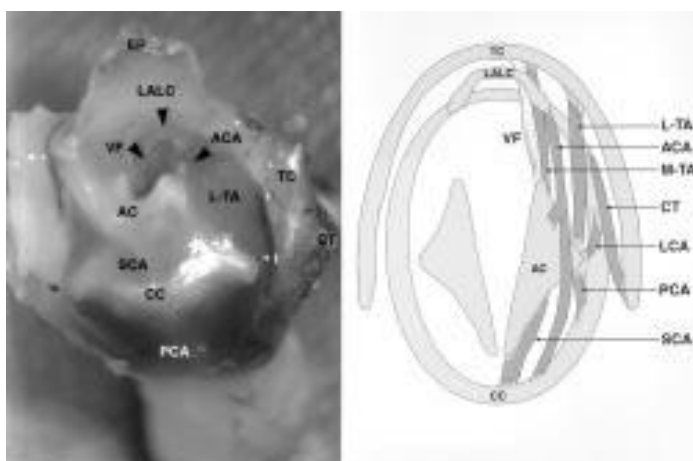


Figure 14. Etude anatomique du larynx des rats (D'après Inagi et al., 1998)

La respiration est aussi l'un des facteurs responsables de la production du son (Boulanger-Bertolus and Mouly, 2021; Riede, 2011, 2013; Sirotin et al., 2014). Il a été montré que les USVs entraînent une modification de la fréquence cardiaque. Chez le rat, entendre par playback des vocalisations à 50 kHz augmente la fréquence cardiaque alors que entendre un playback des vocalisations à 22 kHz diminue la fréquence cardiaque (Olszyński et al., 2020). En effet, les USVs sont émises majoritairement lors de la phase expiratoire. En général, la production d'USVs commence à la fin de l'inspiration et se finit avant que l'expiration soit maximale (Sirotin et al., 2014).

Donc, les USVs reposent principalement sur l'activité du système nerveux parasympathique. Un cycle respiratoire est divisé en trois phases : l'inspiration, l'expiration et l'expiration silencieuse (Sirotin et al., 2014). Il a été montré qu'en l'absence de vocalisation, l'inspiration et l'expiration sont identiques. La production de vocalisation modifie la phase d'expiration sans perturber la phase d'inspiration. L'expiration silencieuse est une phase où le rat va expirer de l'air sans pouvoir produire le moindre son. Ainsi, afin de produire et de moduler un son, plusieurs paramètres se révèlent importants : la contraction du larynx et la pression de l'épiglotte, le flux d'air et la respiration. Une modification de l'un de ces paramètres pourra ensuite permettre de moduler la fréquence et la durée des vocalisations.

1.3.3.1.1.2. Pourquoi les souris vocalisent elles ?

Maintenant que nous avons vu de quelle manière les vocalisations sont produites, nous allons nous attarder sur la raison pour laquelle les rongeurs (rat et souris) émettent des vocalisations. Quelles peuvent être leurs significations ? Les vocalisations sont émises dans différentes situations de la vie de l'animal. Par exemple, on peut voir l'émission d'USVs lors de comportements de jeu (Himmler et al., 2014; Kisko et al., 2015a), de copulations (Ko et al., 2005; White et al., 1998), de peurs (Talbot et al., 2017), de stress (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020), des relations mères-jeunes (Ehret, 1987), d'interactions sociales (Chabout et al., 2012; Faure et al., 2017; Lefebvre et al., 2020).

Tous ces exemples montrent que les vocalisations des rongeurs sont émises dans différents contextes : ont-elles une signification particulière ou sont-elles émises par hasard ? Des études montrent que les vocalisations des rongeurs ne sont pas les mêmes en fonction du

contexte. Par exemple, L'équipe de Markus Wöhr a montré que les USVs de souris émises par des femelles augmentent l'activité exploratoire chez les souris mâles en comparaison avec d'autres USVs (Wöhr et al., 2011). Également, les vocalisations des souris mâles attirent les femelles (Hammerschmidt et al., 2009). Il a été montré que les souris mâles émettent des vocalisations différentes selon s'il y a présence ou non de femelles (Chabout et al., 2015; Yang et al., 2013). Durant le jeu social, les rats émettent différents types de vocalisations avant, pendant et à la fin du jeu (Himmler et al., 2014; Kisko et al., 2015a, 2015b). Les auteurs interprètent ces résultats comme le fait que le rongeur veut avertir son ou ses congénères de ce qu'il veut faire. En ce sens, le fait de "dévoicaliser" un rat perturbe les comportements de jeu (Kisko et al., 2015a). et dans ce cas de figure, les rats auront tendance à se défendre plutôt qu'à jouer. Ce résultat montre que les USVs émises sont intégrées au comportement social choisi. La signification des USVs a aussi été étudiée dans la relation mères-jeunes. En effet, il a été montré que chez la souris chaque appel de petit était émis dans un contexte particulier, comme par exemple lors de l'éloignement de la mère du nid ou encore lorsque la température baisse (Branchi et al., 1998; Kikusui et al., 2021). Le modèle de souris autistique ProSAP1/Shank2-/- présente des troubles de vocalisations ultrasoniques (Ey et al., 2013). Ces quelques exemples permettent d'émettre l'hypothèse que les USVs permettent d'échanger des informations et qu'en fonction du contexte on peut avoir des vocalisations spécifiques.

Un autre aspect de leur rôle est qu'elles reflètent l'état émotionnel de l'animal. En effet, lors d'une situation aversive, comme la peur ou un stress, Les rongeurs auront tendance à émettre des vocalisations à faible fréquence, de courte durée et avec peu d'amplitude (Antoniadis and McDonald, 2006; Chabout et al., 2012; Fryszak and Neafsey, 1991). Mais, durant une situation positive, comme lors de contacts sociaux ou de jeu, les animaux émettent des vocalisations à plus haute fréquence (Brudzynski, 2007; Chabout et al., 2012; Kisko et al., 2015a; Lefebvre et al., 2020). Les USVs reflètent l'état émotionnel de l'émetteur et sont aussi émises pendant des tâches de contagion émotionnelle. En effet, lors d'un test de démonstrateur/observateur, le rat démonstrateur entend un son et peu de temps après est soumis à un choc électrique devant un rat qui observe la situation sans subir le choc. On change ensuite le démonstrateur pour mettre un rat naïf et, suite au son, le rat observateur va émettre des USVs d'alarme. Ceci montre que les USVs permettent d'interagir avec un congénère et peuvent transmettre un état émotionnel d'un animal à un autre (Karwicka et al., 2021).

1.3.3.1.2. Les différents type de vocalisations chez le rongeur

Les rongeurs émettent des vocalisations ultrasoniques qui s'étendent de 20 kHz à 125 kHz (Wang et al., 2008). Les ultrasons sont à une fréquence trop haute pour être discernés par l'oreille humaine. En règle générale, les USVs sont caractérisées par leur nombre, durée, fréquence et structure acoustique. Lors d'une situation positive, les vocalisations de haute fréquence sont souvent associées à un grand nombre d'USV émises alors que dans les situations aversives, les vocalisations sont de fréquence plus basse et moins nombreuses (Brudzynski, 2015).

1.3.3.1.2.1. Les type de vocalisations chez le rat

Chez le rat, les vocalisations sont classées en deux catégories principales en fonction de leur fréquence moyenne : autour de 22 kHz et de 50 kHz. Les vocalisations à 22 kHz vont de 19 à 39 kHz et en général ont une durée comprise entre 31 à 3000 ms avec une bande de fréquence basse, de 0.96-13.2 kHz (Brudzynski, 2007; MacDonald and Brudzynski, 2018). Ces vocalisations sont principalement émises lors d'états aversifs (Brudzynski, 2007, 2014, 2015; Kelm-Nelson et al., 2018; MacDonald and Brudzynski, 2018; Olszyński et al., 2020). Il existe deux types de vocalisations de 22 kHz en fonction de leur durée (voir **Figure 15**) :

- Les vocalisations à 22 kHz courtes (<300 ms) : qui signalent un état d'inconfort sans danger extérieur

- Les vocalisations à 22 kHz longues (>300 ms) : qui signalent un danger extérieur ou potentiel

Les vocalisations à 50 kHz s'étendent de 40 à 80 kHz et ont, en général, une durée de 15 à 100 ms (MacDonald and Brudzynski, 2018), avec une bande de fréquence allant de 0.8 kHz à 18.6 kHz. Ces vocalisations sont principalement émises lors d'états émotionnels plus positifs comme lors de contacts sociaux ou face à une nourriture appétissante (Brudzynski, 2007, 2015; Olszyński et al., 2020). Il existe 3 grands types de vocalisation à 50 kHz :

- les plates (sans modulation de fréquence),

- les modulées sans trille

-les modulées avec trill.

La **Figure 15** montre un exemple de ces différents types de vocalisation.

Les vocalisations à 50 kHz plates sont des USVs à fréquence constante d'une durée comprise entre 20-100 ms et dans une gamme de fréquence entre 35 et 50 kHz. Ce type de vocalisation est principalement émis lors de comportements sociaux.

Les vocalisations à 50 kHz modulées sans trille ont une durée comprise entre 20 et 150 ms et une gamme de fréquence de 40 à 80 kHz. Ce type de vocalisation peut être émis lors de situation fortement gratifiante et très motivante comme lors de situations sexuelles.

Les vocalisations à 50 kHz modulées avec trilles sont émises lors de situations hautement émotionnelles associées à un état affectif intense comme par exemple après une injection ampétamine.






Call type	Pictogram of the call	Selected references
22 kHz short	 <u>100 ms</u>	[68,104,143]
22 kHz long		[65,68,104,143,148]
50 kHz flat		[39,104,119,143,151]
50 kHz FM step		[32,104,119,126,129,130,143,151]
50 kHz FM with trills		[32,39,104,119,125,126,129,130,143,151]

Figure 15. Les principales vocalisations émises chez les rats (D'après Brudzynski, 2015)

1.3.3.1.2.2. Les types de vocalisations chez la souris

La classification est plus complexe que chez le rat et, à l'heure actuelle, aucune classification unique ne fait consensus dans la communauté scientifique. Toutefois, toutes les études s'accordent pour inclure l'existence de sauts de fréquence dans cette catégorisation (Holy and Guo, 2005; Jamain et al., 2008). Des études montrent que, comme pour le rat, les

souris sont capables d'émettre des USVs associées soit à des états positifs soit à des états négatifs et leur fréquence les distingue. Cependant, ces fréquences diffèrent de celles du rat et sont plus élevées (pour revue (Simola and Granon, 2019)). Chez la souris, les vocalisations les plus positives sont d'une fréquence supérieure ou égale à 60 kHz alors que celles associées à des états négatifs sont autour de 40 kHz (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020). De plus, il a été montré que les situations positives sont associées à un plus grand nombre de vocalisations ainsi qu'à des durées de vocalisation plus longues, alors que les situations négatives ou stressantes sont associées à une réduction du nombre de vocalisations ainsi qu'à une réduction de leur fréquence (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020). Plusieurs études ont confirmé cette classification car lorsque l'on fait entendre des USVs de femelles à 70 kHz, cela attire les mâles (Wöhr et al., 2011). L'étude de Wang et collaborateurs (2008) a aussi démontré que la présence d'urine de femelles génère des vocalisations chez les mâles à plus de 60 kHz. De plus, lors d'une interaction sociale entre souris mâles adultes, les fréquences moyennes de vocalisation sont supérieures à 60 kHz (Chabout et al., 2012; Faure et al., 2017). Cependant les souris sont aussi capables de produire des vocalisations à basses fréquences. Par exemple, dans un test d'apprentissage de peur conditionnée, les souris émettent des vocalisations de 30 kHz et 50 kHz indiquant un état émotionnel plus négatif (Ko et al., 2005).

Dans une même tâche, les souris sont aussi capables d'émettre des vocalisations de haute et de basse fréquence. En effet, il a été montré que, durant la copulation, les souris émettent principalement des vocalisations à 70 kHz, mais on peut aussi voir en quantité moindre, des vocalisations à 40 kHz (White et al., 1998). White et collaborateur (1998) montrent que la copulation peut également s'effectuer en absence de vocalisation. Il a ainsi été proposé que la présence d'USVs entre 70 kHz et 40 kHz permettrait de moduler et de coordonner les comportements de copulations (White et al., 1998).

Ces exemples montrent que les souris sont capables d'émettre des vocalisations dont la fréquence varie selon le contexte. En particulier, les souris émettent un très grand nombre de vocalisations lors d'interactions sociales entre animaux adultes, du même sexe (Ferhat et al., 2015). Lors des comportements sociaux, Chabout et collaborateurs (2012) ont classifié les vocalisations durant cette tâche, à partir de la classification proposée chez les juvéniles par

(Holy and Guo, 2005). Même si cette classification peut être discutée, elle a le mérite d'établir une base à laquelle on peut se référer pour ce type de tâche.

USV émise lors de l'interaction sociale chez la souris.

Lors de l'interaction sociale, il a été montré que les souris émettent différents types de vocalisations. Les USVs émises lors d'interactions sociales sont principalement séparées en termes de durée et de modulation de fréquence. Les USVs émises sont les suivantes (Chabout et al., 2012) :

-Short (S) : durée inférieure à 50 ms et une modulation de fréquence inférieure à 10 kHz.

-Flat (F) : durée supérieure à 50 ms et une modulation de fréquence inférieure à 10 kHz.

-One Frequency Jump (OFJ) : présence 1 seul saut de fréquence supérieur à 10 kHz et écart de temps entre deux sons inférieur à 10 ms.

-Multiple Frequency Jump (MFJ) : présente au moins plusieurs sauts de fréquence supérieur à 10 kHz et écart de temps entre deux sons inférieur à 10 ms.

-U shape (U) : son en forme de U qui doit être symétrique et dont la différence de fréquence doit être supérieure à 10 kHz.

-Chevron (C) : son en forme de U inversé qui doit être symétrique et dont la différence de fréquence doit être supérieure à 10 kHz.

-Upward (H) : son qui augmente de manière continue et avec une différence de fréquence supérieure à 10 kHz sans critère de durée.

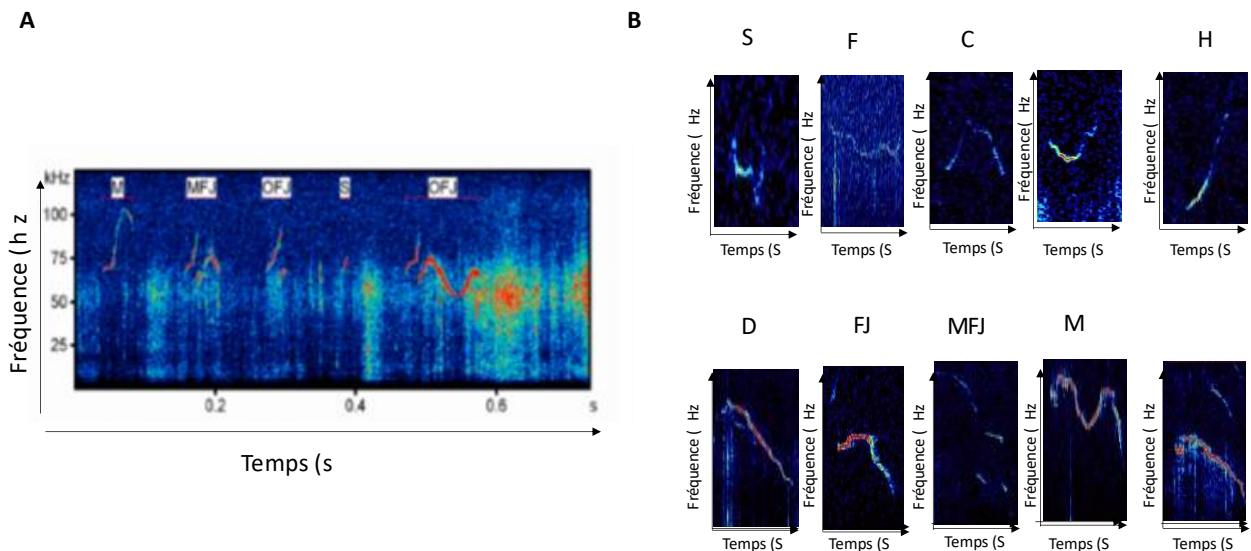
-Downward (D) : son qui diminue de manière continue avec une différence de fréquence de plus de 10 kHz sans critère de durée.

-Modulée (M) : son qui passe deux fois par la même fréquence avec une fréquence supérieure à 10 kHz.

-Composé (W) : chevauchement de deux sons émis séparément.

Toutes ces vocalisations sont illustrées dans la **Figure 16**.

Après un stress, le nombre de vocalisations diminue et le répertoire vocal est plus restreint, les souris émettent majoritairement des vocalisations courtes. Lors d'interactions sociales, les souris montrent un répertoire vocal plus étendu, et en plus grand nombre (Chabout et al., 2012), et ce d'autant plus que leur motivation pour avoir un contact social est importante.



(Holy and Guo, 2012)

Figure 16. Classification des USV de souris émises lors de l'interaction sociale. A) Exemple de spectrogramme émis durant l'interaction sociale. Sur l'axe des abscisses, le temps est représenté en secondes et en ordonnée la fréquence est représentée en KHz. B) Exemple de chaque type USV émise lors de l'interaction sociale.

Maintenant que nous avons montré les différents types de vocalisations chez le rat et la souris et que nous savons que cette production vocale est liée aux comportements sociaux, nous allons nous intéresser aux mécanismes neurobiologiques associés.

1.3.3.1.3. Circuit de production des vocalisations chez le rat

Les travaux de Stéfan Brudzynski ont montré, chez le rat, que l'activation de l'acétylcholine (ACh) par la voie mésolimbique ascendante (SCMA) provoque l'émission d'USVs à 22 kHz. Les neurones cholinergiques du noyau tegmental latéro dorsal (LTD) innervent les structures mésencéphaliques (comme l'ATV, le noyau du raphé, le locus coeruleus et la

substance grise périaqueducule), les régions limbiques diencéphaliques et les régions du cerveau antérieur (l'hypothalamus, le thalamus, l'habenula latérale, le septum latéral, l'hippocampe et le cortex cingulaire (Brudzynski, 2007, 2014; Brudzynski et al., 2018). En outre, l'activation des voies dopaminergiques mésolimbiques ascendantes (SDMA) provoque l'émission d'USVs à 55 kHz. Les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale innervent le noyau accumbens, le striatum dorsal, l'amygdale et différentes parties du septum latéral (Brudzynski, 2007, 2015; Brudzynski et al., 2018). Des études se sont intéressées au rôle du cortex préfrontal médian dans la production ou la modulation des vocalisations. Pour réaliser ceci, des lésions du cortex préfrontal ont été réalisées (voir **Figure 17**, (Antoniadis and McDonald, 2006; Fryszak and Neafsey, 1991; Furtak and Brown, 2018). Ces travaux montrent, chez le rat, que le CPFm est impliqué dans la production des vocalisations à 50 kHz comme à 22 kHz, c'est à dire à la fois celles associées à des états émotionnels positifs, comme celles associées à des états négatifs. Ces études n'ont cependant pas réussi à distinguer le rôle du cortex prélimbique de celui de l'infrolimbique. Ainsi, à l'heure il manque beaucoup de connaissances sur le rôle précis du cortex préfrontal dans la production ou la modulation des USVs.

Le système cholinergique et dopaminergique jouent un rôle de balance dans la production d'USVs. En effet, par exemple l'augmentation de la quantité d'Ach dans le noyau accumbens entraîne une diminution de la quantité de dopamine libérée, ce qui augmente l'émission de vocalisations à 22 kHz et réciproquement (Brudzynski, 2015; Willuhn et al., 2014).

A l'heure actuelle, la majorité des études a été réalisée chez le rat (Simola and Granon, 2019, pour revue). L'une des principales raisons à ceci est que les vocalisations chez le rat sont plus stéréotypées que chez la souris. Une autre raison est que les études de lésions, d'activation ou d'inactivation pharmacologiques sont bien plus nombreuses et plus anciennes chez le rat que chez la souris. En revanche, les modèles transgéniques peuvent nous aider à en comprendre les bases moléculaires de façon plus spécifique et cette approche bénéficie des très nombreuses lignées transgéniques de souris existantes. Chez les deux espèces, les données sont donc complémentaires.

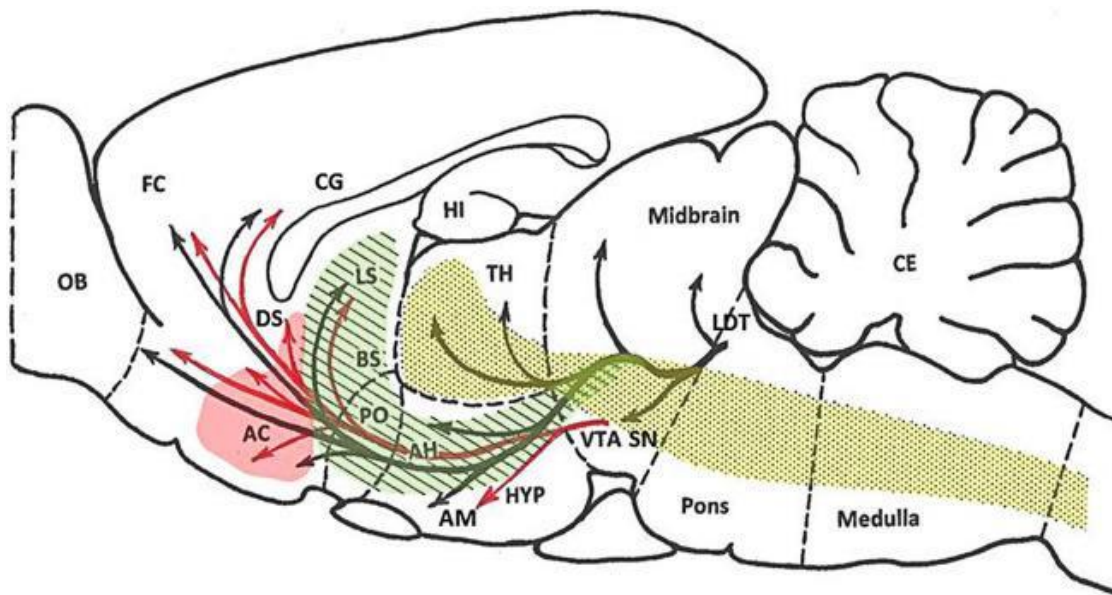


Figure 17. Les principales voies modulant la production des USVs. Les flèches vertes représentent le circuit de l'acétylcholine mésolimbique ascendante (SCMA). Les flèches rouges représentent la voie dopaminergique mésolimbique ascendante (SDMA). Abréviations : AC : noyau accumbens, AH : aire hypothalamique antérieure, AM : amygdale, BS : Noyaux basaux de la strie terminale, CG : gyrus cingulaire, DS : striatum dorsal, FC : cortex préfrontal, HI : hippocampe, HYP : hypothalamus, LDT : noyau tegmental latérodorsal, LS : septum latéral, OB : bulbe olfactif, PO : aire préoptique, SN : substance noire, TH : thalamus, VTA : aire tegmentale ventrale (D'après Brudzynski et al., 2018).

1.3.3.2. L'expression émotionnelle chez la souris

Nous avons vu plus haut que les rongeurs étaient capables d'exprimer leur état émotionnel par l'intermédiaire des vocalisations. Cependant, il existe d'autres moyens permettant d'exprimer une émotion, notamment l'expression faciale. Chez les animaux sociaux, il a été montré que les expressions faciales étaient importantes pour la vie en groupe. En effet, les primates sont capables de réaliser et de comprendre les émotions de l'autre par cette observation (Parr et al., 2005). Chez la souris, on a montré que les expressions faciales permettaient également de percevoir les émotions. En effet, une échelle a permis de déterminer les niveaux de douleur chez le rongeur en se basant sur les critères observables comme la position des yeux, des vibrisses et du nez. Cette échelle s'appelle le « Mouse Grimace Scale » (MGS, Flecknell, 2010; Langford et al., 2010). Des études chez le rat ont montré que l'expression faciale pouvait être un bon indicateur des émotions positives (Finlayson et al., 2016). Dolensek et ses collaborateurs ont récemment réussi, grâce à un processus de "machine

learning”, à détecter les expressions faciales des 6 états émotionnels chez la souris (voir **Figure 18**) (Dolensek et al., 2020; Girard and Bellone, 2020), comprenant : la douleur provoquée par un choc électrique, le dégoût suscité par la présentation d’une odeur amère (la quinine), le plaisir évoqué par la présentation d’une odeur sucrée, le malaise suite au chlorure de lithium. Les auteurs ont aussi enregistré les expressions faciales émises durant l’immobilisation et les échappements (Dolensek et al., 2020; Girard and Bellone, 2020).

Lors d’une interaction sociale, la compréhension de l’état émotionnel de l’autre est une étape importante pour adapter son comportement vis-à-vis d’un congénère. Nous avons pu voir précédemment que les USVs permettaient aux rongeurs d’exprimer ces états et qu’ils pouvaient être perçus par les congénères. Ici, nous avons vu que les expressions faciales aussi peuvent être un indicateur de l’état émotionnel d’un congénère. Cependant, à l’heure actuelle, nous ne savons pas si les souris utilisent réellement les expressions faciales comme indice de l’état émotionnel de l’autre animal, ni si elles adaptent leur comportement social en fonction. Des études plus approfondies devront être réalisées afin de répondre à cette question, j’y reviendrai dans la partie “perspectives”. Néanmoins, cette méthode reste particulièrement intéressante pour comprendre l’état émotionnel des congénères, même si elle comporte tout de même quelques limites. Il est en effet notable que l’étude citée précédemment sur les expressions faciales a été effectuée uniquement tête fixée, ce qui empêche l’étude des interactions libres et naturelles. Il serait intéressant de continuer à développer cette technique afin de l’adapter à notre test d’interaction sociale.

Une autre étude tout aussi intéressante est la mesure de la température corporelle qui peut être considérée comme un indicateur de ce que ressent l’animal. En effet, après un stress social on peut observer une augmentation de la température corporelle (Bhatnagar et al., 2006) Donc, la détection de la température corporelle (entre 0,5° et 2°) pourrait permettre de détecter différents états émotionnels chez le rongeur. Néanmoins, d’autres études s’avèrent nécessaires pour utiliser la température corporelle comme moyen de détecter ce que ressent l’animal.

Donc il semblerait que les souris soient capables d’exprimer et de percevoir différents états émotionnels, que ce soit par les expressions faciales ou la température corporelle. Mais, à l’heure actuelle, nous ne savons pas si ces informations sont utilisées lors des comportements sociaux et ce sont des éléments particulièrement intéressants à développer dans le futur.

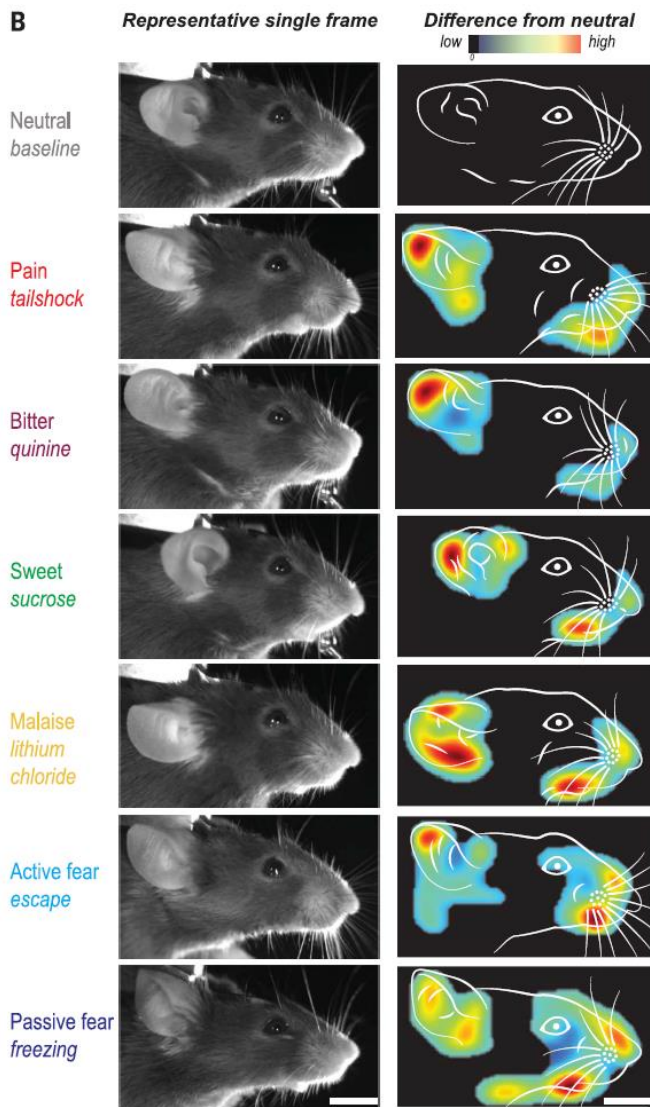


Figure 18. Les différentes expressions faciales chez la souris (D'après Dolensek et al., 2020)

1.3.3.3. Discrimination des émotions

Il a été montré que les rongeurs sont capables d'exprimer leurs états émotionnels, mais sont-ils capables de discriminer les états émotionnels d'autrui ? Comme nous l'avons déjà montré précédemment, l'émission d'USVs positives peut favoriser l'approche d'un congénère alors que l'émission d'USVs négatives provoque principalement la fuite ou l'évitement (Brudzynski, 2007). ce qui suggère que, au moins chez le rat, les USVs sont entendues et prises en compte par les congénères. Chaque souris est placée dans un compartiment différent, séparée par une plaque en plexiglass transparente, puis est introduite une souris naïve devant chaque compartiment et on mesure le temps passé dans chacun d'entre eux. Pour générer un état émotionnel négatif, les auteurs ont réalisé un stress de contention pendant 15 minutes.

Les résultats montrent que la souris passe plus de temps dans le compartiment associé à l'état positif ou à l'état négatif que dans le compartiment émotionnellement neutre (Ferretti et al., 2019; Scheggia et al., 2020). Ces expériences ont montré que les souris sont capables de discriminer les états émotionnels de leurs congénères. Les auteurs ont également montré que les projections oxytocinergiques du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus vers le noyau central de l'amygdale (CeA) sont responsables de la discrimination des émotions (Ferretti et al., 2019). Une autre étude, réalisée par la même équipe, a montré que les interneurons exprimant la somatostatine (SOM) dans le cortex préfrontal (CPF) sont impliqués dans la discrimination des états affectifs (Scheggia et al., 2020). Ces deux études suggèrent donc un circuit préfronto-amygdalien serait impliqué dans la discrimination des états affectifs d'autrui.

Pour conclure, nous avons vu que les souris pouvaient exprimer leurs états émotionnels par l'intermédiaire des USVs, de leurs expressions faciales et leur température corporelle, et de discriminer les états émotionnels de leurs congénères. Afin de réaliser une interaction sociale, il est nécessaire de comprendre l'état émotionnel de l'autre afin d'adapter son comportement. Il a déjà été montré que l'émission d'USVs "positives" peut favoriser l'approche d'un congénère alors que l'émission d'USVs "négatives" provoque surtout la fuite ou l'évitement (Brudzynski, 2007). Ainsi, l'étude et la compréhension des informations échangées durant ces comportements nous permettra de mieux comprendre comment s'élaborent les interactions sociales, quels en sont les modulateurs, et les éléments qui favorisent leur bon déroulement.

1.3.4. Existe t'il des structures spécifiques au social ? ou un circuit spécifique

Dans la partie précédente j'ai présenté l'ensemble des structures cérébrales impliquées dans le comportement social. Toutefois, nous pouvons nous demander si, lors d'une interaction sociale, il existe des structures cérébrales ou un circuit spécifique. Par exemple, le cortex préfrontal médian est impliqué dans les interactions sociales, comme vu précédemment, pourtant cette structure est également impliquée dans le cadre d'une prise de décision non sociale (Bechara et al., 1994, 1996). Un autre exemple est l'amygdale, qui est impliquée dans la détection de la peur d'un congénère mais qui peut, elle aussi, être activée par exemple lors de la présentation d'un stimulus conditionné où l'animal s'attend à recevoir un choc électrique (Hernandez-Lallement et al., 2020). Le noyau accumbens et l'ATV sont impliqués dans

la motivation sociale, mais aussi dans la motivation alimentaire (Berridge, 2009) et, de façon plus générale, dans toutes les motivations. Ces structures sont par exemple critiques dans toutes les addictions (Besson et al., 2007; Husson et al., 2012; Tolu et al., 2013).

Ces quelques exemples montrent par conséquent qu'une structure cérébrale peut être impliquée dans un comportement qui est à la fois social et non social. La question est de savoir s'il existe une structure spécifique aux décisions sociales et, dans l'état actuel des connaissances de la littérature, je ne pense pas que ce soit le cas. Mais nous pouvons très bien considérer qu'il existe un circuit social spécifique car, par exemple, tout au long de cette première partie nous avons montré que le cortex préfrontal, l'amygdale et l'hippocampe constituaient, ensemble, un réseau très important pour les décisions en contexte social. De ce fait, il existe un circuit qui permet d'agir socialement, sans que les structures qui le composent ne soient importantes que pour cela. De plus, l'interaction sociale fait intervenir de nombreux paramètres différents, comme la locomotion, les émotions ou la motivation, qui rendent difficile la distinction entre les fonctions sociales et les fonctions non sociales. Mon avis serait de considérer que le traitement de l'information sociale fait appel à une structure très spécifique, le cortex préfrontal (et, probablement certaines sous-parties du CPF plutôt que d'autres), puis qu'ensuite l'ensemble du cerveau soit impliqué afin de réaliser différentes tâches sociales.

1.4. Pathologie perturbant l'interaction sociale

De nombreuses pathologies sont associées à des troubles sociaux, tout comme de nombreuses pathologies présentent une altération du cortex préfrontal. Dans le cadre de ce manuscrit, je discuterai de quelques pathologies dans lesquelles les interactions sociales sont particulièrement perturbées, afin d'illustrer les conséquences d'un trouble social.

Par exemple, la schizophrénie est caractérisée par des symptômes positifs et négatifs qui perturbent profondément la cognition. Cette pathologie est associée à de nombreux troubles d'interaction et de la communication sociale. De plus, les patients sont incapables de reconnaître les composantes affectives et de déduire les émotions des autres. Ces patients présentent ainsi un retrait social et des comportements antisociaux (Higley and Picciotto, 2014). Il existe différents modèles animaux mimant les symptômes des patients, comme le modèle des souris MAP6 KO ou bien encore le modèle pharmacologique MK801 (Faure et al., 2019).

Dans ces deux modèles, l'activité des récepteurs NMDA est modulée de façon à provoquer des symptômes proches de la pathologie (Bicks et al., 2015; Faure et al., 2019; Higley and Picciotto, 2014). D'autres études ont montré que la perturbation monoaminergique, comme de la dopamine, de la sérotonine ou même de l'acétylcholine, pouvait expliquer cette pathologie (Higley and Picciotto, 2014). Cette pathologie provoque également un problème dans la balance Excitation/Inhibition (Higley and Picciotto, 2014). Aucun des traitements qui existent à ce jour ne corrige les troubles sociaux ni ceux de la communication sociale (Faure et al., 2019), d'où l'intérêt de disposer d'un modèle d'étude des comportements sociaux.

Un autre exemple de trouble social particulièrement bien étudié est le trouble du spectre autistique (TSA). C'est un trouble neurodéveloppemental pouvant être caractérisé par des troubles de l'interaction et de la communication sociale, ainsi que des comportements rigides, stéréotypés et répétitifs (Dere et al., 2014; Ellegood and Crawley, 2015; Ferguson and Gao, 2018; Fernández et al., 2018; Yizhar et al., 2011). Sans entrer dans un catalogage qui ne serait pas pertinent dans le cadre de travail, Il existe un nombre important de modèles permettant d'étudier ce trouble, comme le modèle TSC1, Nlgn2, CNTNAP2 ou SHANK2 (Dere et al., 2014; Ellegood and Crawley, 2015; Ey et al., 2013, 2018). Les causes de l'autisme sont inconnues mais c'est une pathologie polygénique qui est associée à une libération anormale de monoamines (Fernández et al., 2018). De plus, plusieurs régions cérébrales sont montrées pour y être impliquées telles que le Nac, l'amygdale et le CPF.

Il existe d'autres pathologies impliquant des troubles de l'interaction sociale, comme par exemple, la dépression, le trouble de stress post-traumatique, l'hyperactivité avec trouble attentionnel ou la maladie d'Alzheimer. Connaître les causes permettra une meilleure prise en charge des patients mais cette recherche doit aussi s'accompagner de la compréhension des mécanismes cérébraux, élément indispensable pour un traitement optimal des patients. De plus, la recherche doit également se focaliser sur une analyse multifactorielle car les pathologies sont d'origine multifactorielle et peuvent avoir des conséquences entre autres génétiques, électrophysiologiques ou encore neurochimiques. La recherche sur l'ensemble de ces domaines permettra donc d'améliorer notre compréhension de cette pathologie.

2. L'Ach dans le CPF neuromodulateur important du comportement social et de la prise de décision

2.1. Pourquoi l'Ach est t'elle importante dans l'interaction sociale

La première étude à avoir montré que les récepteurs nicotiques neuronaux comportant la sous-unité bêta 2 (RnAch-b2) pouvait avoir un rôle dans le comportement social, est l'étude de Granon et collaborateurs (2003). En effet, les auteurs ont montré que les interactions sociales des animaux KO pour les RnAch-b2 étaient fortement perturbées, particulièrement pour ce qui est de l'équilibre entre les choix sociaux et non sociaux que font les animaux (Granon et al., 2003). L'étude de Avale et collaborateurs (2011) a ensuite montré que la ré-expression de RnAch-b2 grâce à un vecteur lentiviral, spécifiquement au niveau prélimbique de souris beta2 KO suffit à restaurer le répertoire social, sans restaurer l'hyperactivité locomotrice dont font preuve ces souris (Avale et al., 2008). Ces travaux montrent ainsi que, en dépit des perturbations monoaminergiques observées chez les souris beta2 KO (Coura et al., 2013), l'activité des RnAch-b2 du cortex prélimbique est nécessaire au développement d'interactions sociales flexibles et adaptées. D'autres auteurs ont montré que les récepteurs muscariniques jouent aussi un rôle dans l'élaboration des comportements sociaux, en effet, des souris KO pour la sous-unité muscarinique M4 (M4 KO) présentent des perturbations sociales, notamment des temps de contact sociaux anormalement bas (Koshimizu et al., 2012).

Les souris bêta 2 KO montrent en outre une dominance sociale exacerbée (mais pas de l'agressivité, (Coura et al., 2013; Nosjean et al., 2015), ainsi qu'une diminution de la flexibilité comportementale dans des situations non sociales (Pittaras et al., 2016b; Serreau et al., 2011) . Comme discuté plus haut, la flexibilité comportementale est un paramètre extrêmement important lors des interactions sociales. Un défaut de flexibilité peut entraîner un comportement plus stéréotypé et aboutir à une rigidité comportementale, ce qui conduit à des comportements sociaux inappropriés et peu adaptatifs. En revanche, l'échelle des motivations n'est pas différente chez les souris bêta 2 KO. Une étude a ainsi comparé la préférence des souris entre trois motivations : la motivation sociale (interaction ou approche d'un congénère), la motivation alimentaire et la motivation exploratoire (présence d'un nouvel objet) dans un test de trois chambres. Les résultats montrent que les souris WT et bêta 2 KO préféraient passer

plus de temps dans la zone avec un congénère que dans les zones avec un autre renforcement (alimentaire ou exploratoire). Ainsi, chez les souris bêta 2 la motivation sociale n'est pas altérée (Chabout et al., 2013), ce qui donne d'autant plus d'intérêt aux études dans lesquelles les animaux peuvent interagir librement et exprimer un répertoire social complet (de Chaumont et al., 2012). D'ailleurs, cette dernière étude a montré que l'absence de récepteurs RnAch-b2 conduit à un maintien stable des contacts sociaux au cours du temps, sans diminution ni habituation permettant, chez les animaux WT, une flexibilité et, ainsi, de montrer un intérêt pour l'exploration de l'environnement.

Il a été montré que l'anxiété pouvait influencer les comportements sociaux (Allsop et al., 2014). De façon réciproque, des études ont montré que des rats placés dans un contexte social présentaient des niveaux d'anxiété plus faibles que des rats isolés (Pentkowski et al., 2011).

Même si le modèle souris bêta 2 KO a été beaucoup utilisée afin de comprendre le rôle du système cholinergique, il a été montré que ce modèle présente des altération autre que le système cholinergique. En effet, une étude à montrer que l'Ach présentaient une altération de la libération de différent neurotransmetteur comme la dopamine et la sérotonine (Coura et al., 2013). De plus, le KO de la sous unité bêta 2 perturbe le nombre et l'affinité des récepteurs cholinergique pour l'Ach.

Ces études citées précédemment montrent que l'acétylcholine peut avoir un rôle dans l'interaction sociale, mais peu de choses à l'heure actuelle sont connues et les mécanismes exactes du fonctionnement de l'Ach en temps que telle lors des interactions sociales. Dans la suite de ce manuscrit, nous allons nous intéresser à comprendre le rôle de l'Ach en essayant notamment de répondre aux questions suivantes : comment l'Ach est-elle synthétisée ? Quels sont ses effets ? Comment cette molécule est-elle libérée ? Quelles sont les conséquences du vieillissement de l'Ach ? Quel est son mode de libération ? Nous allons aussi déterminer une hypothèse sur l'effet de la libération de l'Ach avant de nous attarder sur les méthodes permettant d'étudier le système cholinergique.

2.2. **Biosynthèse et dégradation de l'ACh**

Afin de synthétiser l'acétylcholine (ACh), celle-ci a besoin de son précurseur essentiel, la choline. Cette molécule est nécessaire dans plusieurs fonctions biologiques. Elle se trouve dans le milieu extracellulaire et intègre le milieu intracellulaire de la synapse grâce au transporteur de la choline (ChT) de haute affinité. Ce transporteur est dépendant du sodium et du chlore qui a une autre affinité avec la choline. Ainsi, la choline va dans le cytoplasme grâce au ChT. La synthèse de l'ACh à partir de la choline nécessite un autre précurseur, l'Acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA). Cette molécule est synthétisée à la suite du cycle de Krebs (Prado et al., 2013). L'ACh est synthétisée au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) dont la réaction donne la formule suivante (Epelbaum Jacques, 1992).



La molécule d'ACh nouvellement synthétisée va entrer dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire de l'ACh (VChT), ce qui permettra sa libération par la fusion des vésicules synaptiques aux terminaisons synaptiques. L'ACh va ensuite se fixer sur ses récepteurs post-synaptique avant d'être dégradée en choline + acétate par acétylcholinestérase (AChE) (Epelbaum Jacques, 1992; Prado et al., 2002, 2013; Sarter and Parikh, 2005). Les processus de synthèse et de dégradation de l'ACh sont illustrés en **Figure 19**.

L'absorption de la choline par le ChT est l'étape limitant le taux de synthèse de l'ACh (Sarter and Parikh, 2005). On peut aussi trouver le ChT sur la membrane des vésicules synaptiques co-exprimé avec le VChT. L'Hémicholinium-3 est un inhibiteur hautement spécifique de la choline permettant de réguler l'activité de ce transporteur. Des études ont montré que la réalisation d'un KO sur ChT n'est pas viable. La fonctionnalité du transporteur ChT est conservée même après 50% de diminution (Ferguson et al., 2004) ce qui montre une certaine plasticité de ce transporteur (Sarter and Parikh, 2005).

La protéine VChAT est le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine et permet de transporter l'ACh dans l'espace présynaptique. Le gène codant la protéine VChAT se trouve sur le premier exon du gène ChAT. Ainsi ChAT et VChT sont les deux gènes qui forment le locus du gène cholinergique. Le vésamicol est un ligand spécifique du VChT (Prado et al., 2002, 2013). Des études ont montré que la quantité du VChT était directement liée à la quantité d'ACh libérée (Song et al., 1997). De plus, l'augmentation du VChT permet d'augmenter la libération d'ACh et de diminuer l'ACh intracellulaire (Nagy and Aubert, 2012). Plusieurs études

ont montrée que la sur expression ou sous expression du VACHT. aboutit à des troubles physiologiques ou comportementaux (Crittenden et al., 2014; Janickova et al., 2017; Martyn et al., 2012; Nagy and Aubert, 2013; Prado et al., 2006; Sugita et al., 2016).

Le ChAT est l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'Ach grâce à la choline et à l'Acétyl-CoA dans les terminaisons cholinergiques présynaptiques. Le ChAT est synthétisé dans les corps cellulaires en excès et se dirige au niveau des terminaisons cholinergiques (Epelbaum Jacques, 1992). La ChAT est une protéine glomérulaire de poids moléculaire de 82 ou de 69 kDa. En effet, cette protéine se présente sous 2 formes : une forme soluble représentant 80-90% de l'activité enzymatique totale et une forme membranaire représentant environ 10 à 20% des protéines totales. La protéine de 82 kDa est localisée dans le noyau, alors que la protéine de 69 kDa est localisée dans le cytoplasme (Prado et al., 2002; Sarter and Parikh, 2005).

L'AChE est l'enzyme qui hydrolyse l'Ach en choline + acétate et qui permet ainsi de dégrader l'Ach au niveau de la fente synaptique. Cette molécule est une cible thérapeutique pour de nombreuses pathologies. Par exemple, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, nous pouvons observer une perte des neurones cholinergiques. En général, on peut utiliser des anticholinestérasés afin d'augmenter la quantité d'Ach dans la fente synaptique (Prado et al., 2013; Sarter and Parikh, 2005). Mais malgré une certaine amélioration dans un premier temps, on constate aussi une certaine dégradation de ces neurones cholinergiques (Prado et al., 2013). D'autres moyens de traitement sont actuellement en cours afin d'essayer de traiter cette pathologie.

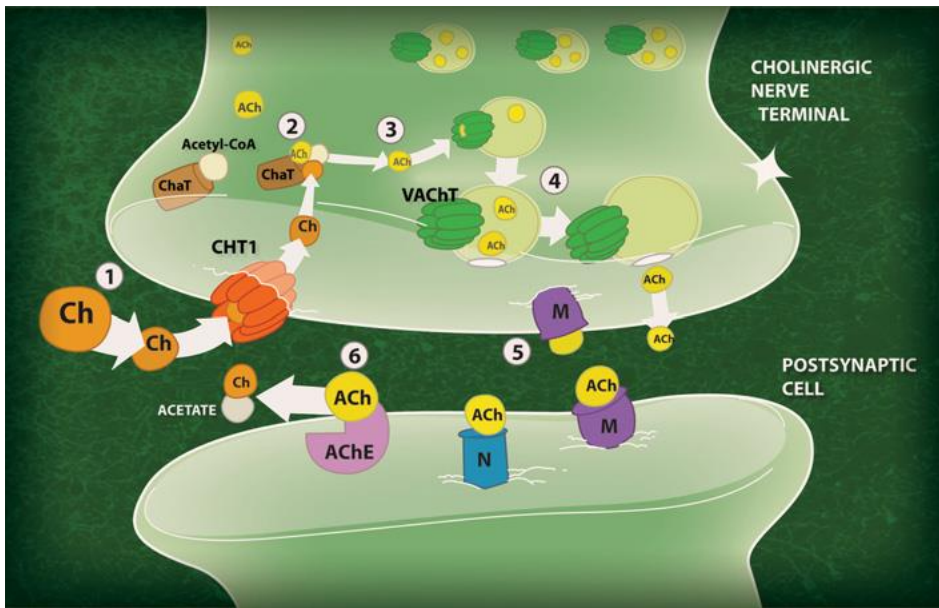


Figure 19. Synthèse et dégradation du système cholinergique. 1) La choline issue de l'espace extracellulaire se fixe sur le Transporteur de la choline (ChT) ce qui va permettre à la choline d'entrer dans les terminaisons cholinergiques présynaptiques. 2) La deuxième étape consiste en l'action de l'enzyme ChAT qui catalyse l'ACh grâce à la choline et Acétyl-CoA. 3) L'ACh nouvellement synthétisée va ensuite entrer dans une vésicule synaptique grâce au transporteur vésiculaire de l'ACh (VACHT). 4) L'ACh dans les vésicules sera ensuite relâchée dans la fente synaptique par fusion à la membrane. 5) Une fois l'ACh relâchée, elle ira se fixer sur le récepteur nicotinique ou muscarinique qui peuvent être situés en post-synaptique ou en pré-synaptique afin de s'autoréguler. 6) Une fois la fixation finie, l'ACh qui n'a pu se fixer sera ensuite dégradée par l'AChE. Une partie de la choline dégradée sera recapturée par les terminaisons cholinergiques présynaptiques. (D'après Prado et al., 2013)

2.3. Localisation des différents noyaux cholinergiques et projection des neurones cholinergiques

2.3.1. Les neurones cholinergiques

Plusieurs noyaux contenant les neurones cholinergiques sont décrits dans le cerveau (Ballinger et al., 2016; Bloem et al., 2014a; Epelbaum Jacques, 1992; Higley and Picciotto, 2014; Mesulam et al., 1983; Prado et al., 2017; dos Santos Coura and Granon, 2012). Les principaux sont au nombre de six (de Ch1 à Ch6) : les noyaux du prosencéphale basal comprennent le septum médian (Ch1), le VDB (Ch2) et l'HDB (Ch3), le noyau vertical & horizontal de la bande diagonale de Broca et le noyau basal de Meynert NBM (Ch4). Ces neurones ont des terminaisons qui projettent principalement vers le cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale

(Figures 20 et 21). Une autre innervation cholinergique est le système cholinergique du tronc cérébral. Ce système comporte le noyau tegmental pédonculo-pontin (Ch5) ainsi que le noyau tegmental dorsolatéral (NTDL, Ch6). Les neurones cholinergiques de Ch5 et Ch6 projettent leurs terminaisons vers la substance noire, l'aire tegmentale ventrale (ATV), l'hypothalamus, l'amygdale et le striatum (**Figures 20 et 21**).

Il existe aussi des interneurons cholinergiques qui permettent de moduler spécifiquement la réponse locale. Ces interneurons se trouvent principalement dans le striatum où ils constituent 20% de l'ensemble des interneurons. Il existe également une petite proportion d'interneurones du cortex, de l'hippocampe et du cerveau basal antérieur qui sont cholinergiques chez le rat (von Engelhardt et al., 2007; Frotscher et al., 2000; Kosaka et al., 1988). Les interneurons cholinergiques préfrontaux expriment le peptide vasoactif intestinal (VIP) et la calrétinine (von Engelhardt et al., 2007). Ils coexistent également avec plusieurs neurotransmetteurs tel que le GABA (von Engelhardt et al., 2007). Par conséquent, les neurones cholinergiques peuvent contenir plusieurs neurotransmetteurs et pourraient ainsi co-libérer l'Ach avec un autre neurotransmetteur. Cette co-libération sera discutée un peu plus loin dans ce manuscrit.

Le cerveau basal antérieur contient différents noyaux cholinergiques et un aspect important est la spécificité de ces structures. Dans l'étude de Bloem et collaborateurs (2014b, **Figure 21**), les auteurs montrent qu'il existe 4 voies cholinergiques principales du cerveau antérieur basal qui innervent le cortex. Chacune de ces voies innerve spécifiquement des régions précises du cortex préfrontal, indiquant une certaine organisation topologique et une spécificité du cortex préfrontal. Dans cette même étude, ils montrent aussi que le cortex préfrontal médian est principalement innervé par les voies 1 et 2 (Bloem et al., 2014b)

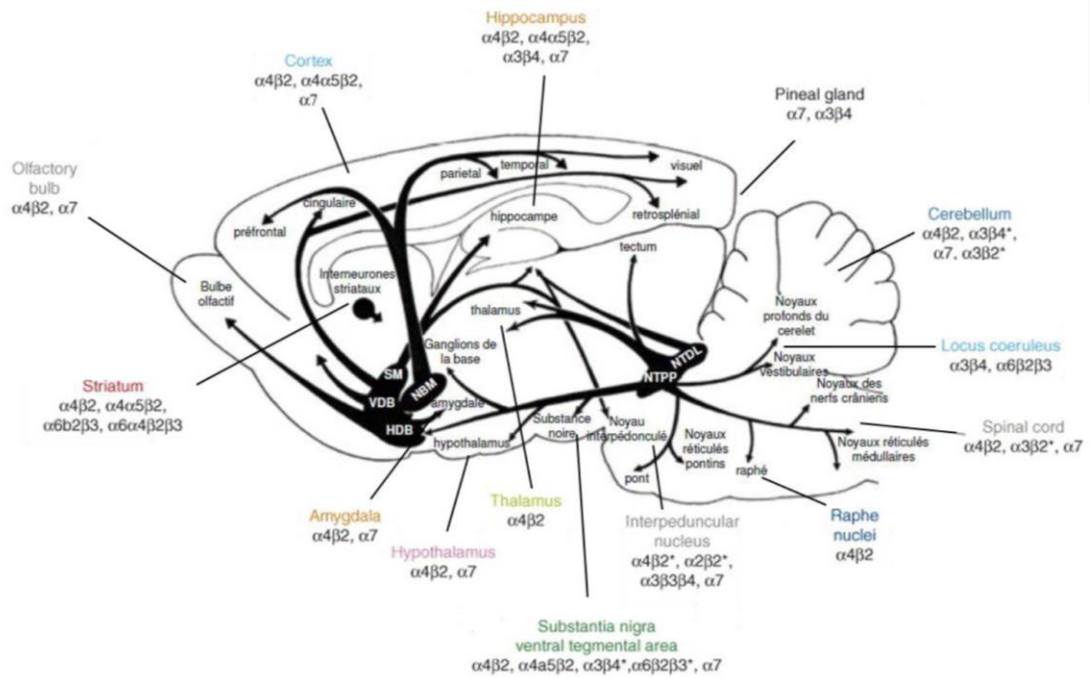


Figure 20. Principales voies cholinergiques chez le rongeur et répartition des récepteurs nicotiques (nAChRs). Abréviations : SM : septum médian (Ch1), VDB (Ch2) : noyau vertical de la bande diagonale de Broca, HDB (Ch3) : noyau horizontal de la bande diagonale de Broca, NBM (Ch4) : noyau basal magnocellulaire, NTPP (Ch5) : noyau tegmental pédonculo-pontin, NTDL (Ch6) : noyau tegmental dorsolatéral. Figure empruntée de la thèse de J. Chabout (2012).

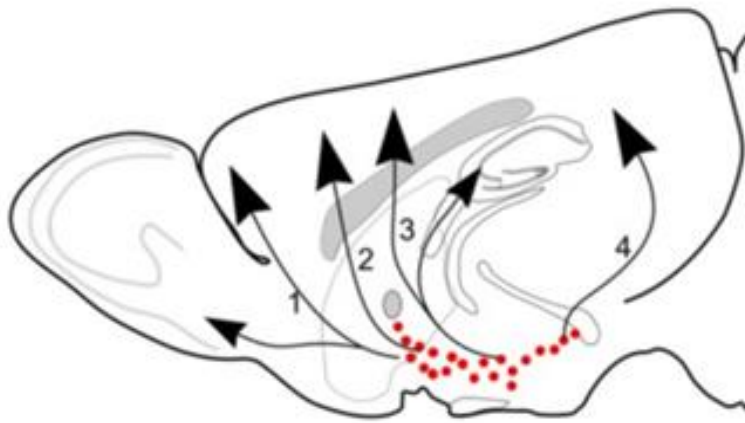


Figure 21. Les principales voies de projection des neurones cholinergiques. Les points rouges contiennent les principaux noyaux des neurones cholinergiques. Les flèches représentent les différentes voies de projection des terminaisons cholinergiques (D'après Bloem et al, 2014b)

2.3.2. Les autres neurotransmetteurs au cortex préfrontal

En dehors de l'Ach, d'autres neurotransmetteurs possèdent des terminaisons qui projettent dans le CPF et chacune de ces projections vont permettre de moduler l'activité préfrontale. Dans le cadre de ce manuscrit, je me focalise sur l'effet de la modulation de l'Ach sur l'activité des différents neurotransmetteurs.

Les neurones dopaminergiques projettent leurs terminaisons au niveau du cortex préfrontal. Les principaux noyaux des neurones dopaminergiques sont l'ATV et la substance noire. Il existe différentes voies de projections majeures des neurones dopaminergiques. Tout d'abord, les neurones dopaminergiques de la substance noire vont projeter leurs terminaisons au striatum dorsal et ventral par l'intermédiaire de la voie nigrostriatale. L'ATV contient des neurones dopaminergiques qui projettent leurs terminaisons vers le noyau accumbens par la voie mésolimbique et d'autres neurones qui projettent vers le cortex préfrontal via la voie mésocorticale (Björklund and Dunnett, 2007; Epelbaum Jacques, 1992; Klein et al., 2019; dos Santos Coura and Granon, 2012).

Les noyaux des neurones noradrénergiques sont situés au niveau du locus coeruleus (LC) et subcoeruleus (groupe A5, A6, A7), du bulbe avec les noyaux réticulaires latéraux (groupe A1 et C1) et du noyau du tractus solitaire (groupe A2 et C2). Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus vont projeter leurs terminaisons à l'ensemble du cortex cérébral, à l'hippocampe, l'amygdale, le noyau du septum, au thalamus, à l'hypothalamus et à la moelle épinière. Les groupes de neurones A5 et A7 projettent vers la moelle épinière alors que les groupes de neurones A1 et A2 projettent vers l'hypothalamus (Epelbaum Jacques, 1992; Loughlin et al., 1986; dos Santos Coura and Granon, 2012).

Le noyau des neurones sérotoninergiques se situe principalement dans le noyau du raphé du mésencéphale. C'est de là que partent la plupart des projections sérotoninergiques et innervent toutes les zones du cerveau, la moelle épinière, au sein du noyau dorsal du raphé jusqu'au niveau du cortex préfrontal (Epelbaum Jacques, 1992; dos Santos Coura and Granon, 2012).

Les neurones GABAergiques sont des neurones qui se trouvent dans toutes les structures cérébrales. Il existe 2 types de neurones, soit les interneurones et les neurones de

projection. La plupart des neurones GABAergiques sont situés au niveau des corps cellulaires du globus pallidus, de la substance noire réticulaire et du cervelet. Il existe aussi un nombre importants interneurons dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le thalamus (Epelbaum Jacques, 1992).

Au sein du cortex préfrontal il existe également des neurones glutamatergiques qui sont excitateurs.

2.4. Les récepteurs de l'acétylcholine : nicotiniqes et muscariniqes

2.4.1. Les récepteurs muscariniqes (mAChR)

Les récepteurs muscariniqes sont des récepteurs métabotropiqes, à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Il en existe 5 types qui peuvent être excitateurs ou inhibiteurs. Les récepteurs excitateurs sont les récepteurs muscariniqes impairs, soit M1, M3 et M5. Ces récepteurs sont couplés à la protéine Gq/11 et activent la phospholipase C. Quant aux récepteurs inhibiteurs, ce sont les récepteurs muscariniqes M2 et M4. Ils sont couplés à la protéine Gi/α et inhibent l'adénylate cyclase (AC)(Bloem et al., 2014a; Prado et al., 2017; Thiele, 2013).

Les effets de l'activation des mAChRs sont généralement un peu plus lents et plus durables que ceux des AChRs nicotiniqes ionotropes (Brown, 2010; Thiele, 2013).

Au niveau du cerveau, il a été montré chez le rat que l'on retrouve les récepteurs muscariniqes M1 majoritairement au sein du cortex, du striatum, de l'amygdale, de l'hippocampe et du noyau accumbens. Les récepteurs muscariniqes M2, quant à eux, se trouvent dans tout le cerveau, tout comme les récepteurs M3, mais en plus faible quantité. Les récepteurs muscariniqes M4 se trouvent principalement dans le striatum, le cortex et l'hippocampe. Enfin, les récepteurs M5 se trouvent en faible quantité dans la substance noire pars compacta, l'aire tegmentale ventrale ainsi que l'hippocampe (Abrams et al., 2006; Tice et al., 1996). Comme pour les récepteurs nicotiniqes, les récepteurs muscariniqes sont ubiquitaires, dans toutes les régions du cerveau. Au niveau du cortex, les récepteurs M1 sont largement exprimés dans la partie somato-dendritique des interneurons cholinergiqes et pyramidaux des couches II/III et V. En général, le récepteur M1 permet d'augmenter l'excitabilité cellulaire alors que les récepteurs M2 sont présynaptiqes. Cette fixation permet

une autorégulation du système cholinergique en inhibant la libération d'Ach. De plus, on peut trouver ces récepteurs au niveau des terminaisons GABAergiques. Dans ce cas, elle aura pour rôle d'inhiber l'action des neurones GABAergiques et ainsi, un effet excitateur. Les récepteurs M4 sont situés dans le domaine somato-dendritique des neurones pyramidaux de la couche IV (Ballinger et al., 2016).

2.4.2. Les récepteurs nicotiques (nAChR)

Les récepteurs nicotiques 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-unités de $\alpha 1$ à $\alpha 10$), β (4 sous-types de $\beta 1$ à $\beta 4$), γ , δ et ϵ . Mis à part la sous-unité $\alpha 8$, qui est présente chez les oiseaux (Millar and Gotti, 2009), toutes ces sous-unités sont présentes chez les mammifères. La plupart de ces récepteur est composée au moins d'une sous-unité α et d'une sous-unité non α . Même si la plupart des combinaisons sont possibles, un nombre restreint de combinaisons sont exprimées chez les individus. Chaque sous-unité présente des propriétés différentes. Dans le système nerveux central, les sous-unités $\alpha 4\beta 2^*$ et $\alpha 7$ sont les plus majoritairement exprimées. L'étoile indique que ce récepteur peut être associé à d'autres sous-unités (Arroyo et al., 2014; Epelbaum Jacques, 1992; Millar and Gotti, 2009; Prado et al., 2017; dos Santos Coura and Granon, 2012, **Figure 20**) La sous-unité $\alpha 4\beta 2$ présente une forte affinité pour l'Ach et un taux de désensibilisation relativement bas. La sous-unité $\alpha 7$ est la seule sous-unité homomérique, et elle présente une faible affinité pour l'Ach, ainsi qu'une désensibilisation très rapide (Arroyo et al., 2014; Ballinger et al., 2016). La sous-unité bêta 4, exprimée sélectivement dans l'habénula médiale, le noyau interpédonculaire et le fasciculus rétroflexus a récemment été montré comme modulant de façon majeure les processus d'anxiété, les souris beta4 KO présentant des niveaux d'anxiété très bas par rapport aux WT (Husson et al., 2020).

Les récepteurs nicotiques sont répartis de manière ubiquitaire dans chaque région du cerveau (**Figure 20**) et peuvent se trouver au niveau pré et post-synaptique, sur tous les compartiment cellulaire. De plus, ils peuvent se situer sur des neurones dopaminergiques, GABAergiques et sérotoninergiques et dans différentes couches du cortex préfrontal (dos Santos Coura and Granon, 2012). Au niveau de la couche II/III, les neurones pyramidaux ne contiennent pas de nAChR. En revanche, les interneurones de cette couche contiennent la

sous-unité nicotinique $\alpha 7$ et la sous-unité nicotinique $\beta 2$. La couche V du cortex contient des récepteurs exprimant la sous-unité $\alpha 7$ au niveau des neurones pyramidaux et des interneurons qui expriment la sous-unité $\beta 2$. La couche VI, celle-ci contient des neurones pyramidaux et interneurons constitués principalement de récepteurs nicotiques exprimant la sous-unité $\beta 2$ (Poorthuis and Mansvelder, 2013, **Figure 22**).

La fixation de l'Ach sur les nAChRs entraîne des effets pléiotropes. En effet, elle provoque une libération de glutamate, de sérotonine, de dopamine, de GABA et de noradrénaline (dos Santos Coura and Granon, 2012). En fonction du type de nAChRs on peut avoir des réponses différentes. La stimulation des nAChR $\alpha 7$ permet d'obtenir une réponse rapide, alors que la fixation sur les nAChR exprimant la sous-unité $\beta 2$ a un temps de réponse plus lent (Arroyo et al., 2012). Les nAChR $\beta 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 7$ jouent un rôle important dans les processus attentionnels (Guillem et al., 2011; Poorthuis and Mansvelder, 2013). De même, la sous-unité nicotinique $\beta 2$ a aussi été impliquée dans les processus de mémoire de travail, d'interaction sociale, de prise de décision et pour les comportements flexibles (dos Santos Coura and Granon, 2012). Ces récepteurs jouent un rôle majeur dans les processus d'addiction à la nicotine (e.g., Maskos et al., 2005a) et, comme démontré plus récemment, à l'alcool (Besson et al., 2019). Cependant, pour des raisons de cohérence avec mon travail de thèse, je n'en parlerai pas dans ce manuscrit.

Connaître la répartition des récepteurs nicotiques et muscariniques au sein du cortex préfrontal pourrait nous donner une meilleure compréhension du système cholinergique. De plus, l'étude du microcircuit cholinergique permettrait de mieux comprendre l'effet de la libération d'Ach sur le circuit local. Dans un premier temps, nous allons nous attarder sur le microcircuit du cortex préfrontal en regardant la répartition des récepteurs à l'acétylcholine au sein de ce circuit. Puis, nous allons nous intéresser à la perturbation de la balance excitation/inhibition par la modulation du système cholinergique, ce qui peut provoquer des pathologies affectant le comportement social telles que la schizophrénie (Ferguson and Gao, 2018; Yizhar et al., 2011) ou les troubles du spectre autistique (Ferguson and Gao, 2018; Fernández et al., 2018; Yizhar et al., 2011).

2.5. Les récepteurs à l'Ach dans le microcircuit du PFC

2.5.1. Microcircuit du Préfrontal

Le CPFm est composé de 6 couches différentes. Les couches II/III, V, et VI comportent des cellules pyramidales glutamatergiques. Chaque couche du CPF projette vers des régions du cerveau différentes. Les cellules pyramidales de la couche II/III projettent au BLA, au striatum ventral et dorsal ainsi qu'à l'hypothalamus latéral. Les cellules de la couche V projettent à l'ATV et au noyau du raphé. La couche VI projette au thalamus médiodorsal, au striatum dorsal et ventral tout comme à l'hypothalamus latéral (Santana and Artigas, 2017). Chaque couche cellulaire comprend en outre des interneurons qui modulent l'activité des neurones pyramidaux. Les interneurons sont de plusieurs types, en fonction des marqueurs moléculaires qu'ils expriment : les principaux expriment le peptide vaso-intestinal (VIP), la somatostatine (SOM) et la parvalbumine (PV). Les interneurons SOM et PV inhibent directement les cellules pyramidales, tandis que les VIP jouent un rôle dans la désinhibition. Les VIP peuvent donc inhiber les interneurons PV et SOM (Andraka et al., 2021; Ferguson and Gao, 2018; Kuchibhotla et al., 2017). De plus, les interneurons PV perturbent l'équilibre excitation/inhibition (Ferguson and Gao, 2018). Une étude (Scheggia et al., 2020) a montré que les interneurons PV dans le cortex préfrontal des souris sont impliqués dans l'investigation sociale et que les interneurons SOM sont impliqués dans la discrimination de l'état affectif. De plus, ces auteurs montrent que l'activation de l'interneurone SOM diminue l'activité des cellules pyramidales du CPFm, ce qui a pour conséquence d'améliorer la discrimination de l'état affectif. Sur toutes ces cellules pyramidales ou interneurons, il y a des récepteurs nicotiques dont le ligand naturel est l'Ach (Poorthuis et al., 2013). Il a récemment été montré que la stimulation de la libération d'Ach dans le cortex somato-sensoriel augmente l'activité des interneurons qui, en retour, diminue celle des cellules pyramidales (Kuchibhotla et al., 2017).

Au niveau des neurones pyramidaux et des interneurons, nous pouvons trouver des récepteurs à la sérotonine (5-HT_{1A}-R, 5-HT_{2A}-R, 5-HT_{2C}-R et 5-HT₃-R), des récepteurs à la dopamine D1-R et D2-R et des récepteurs aux neurones adrénergiques Alpha_{1A}-AR, Alpha_{1b}-AR, Alpha_{1b}-AR. Leurs proportions varient selon la couche et selon s'ils se situent sur des neurones pyramidaux ou des interneurons (Santana and Artigas, 2017).

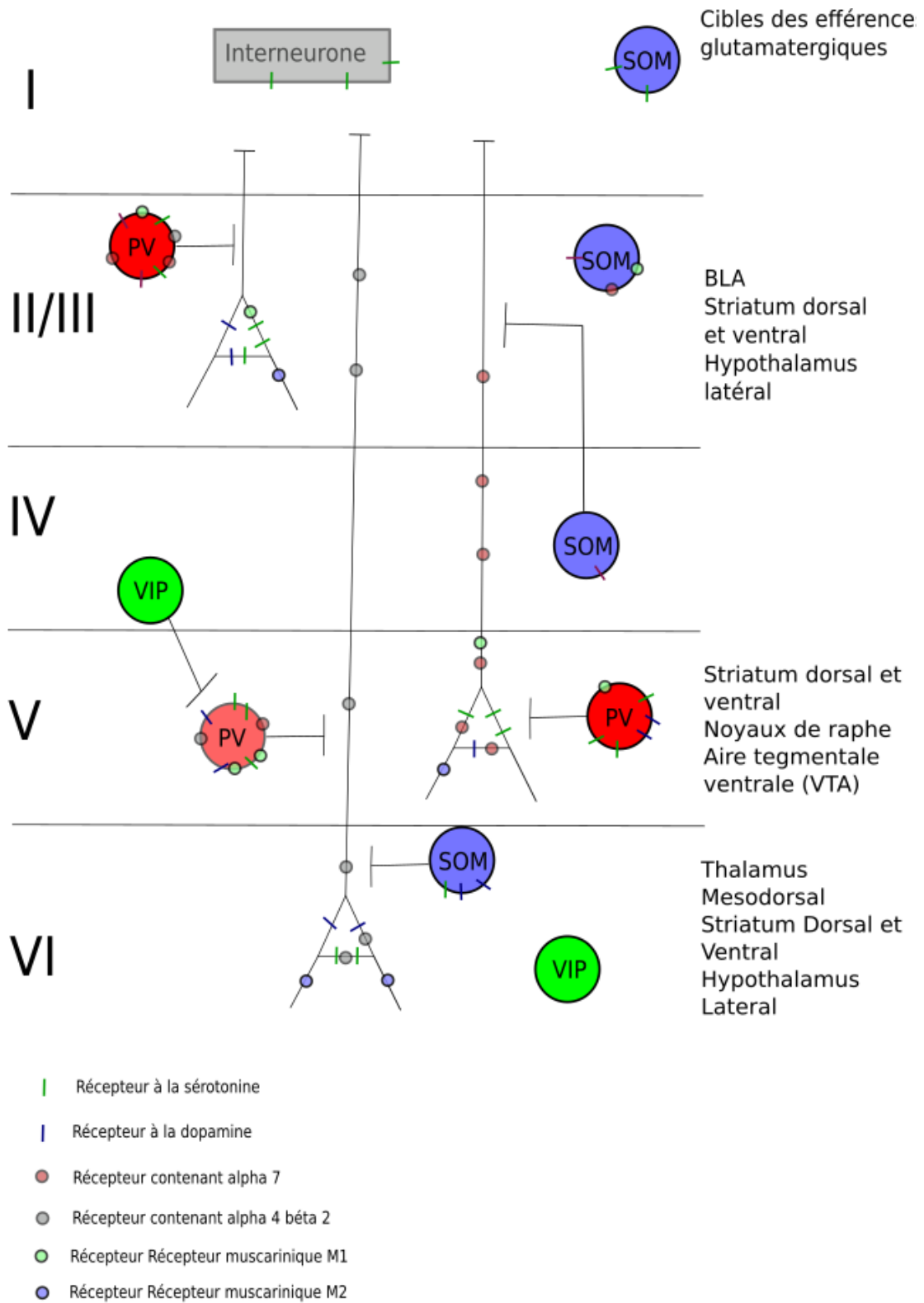


Figure 22. Schéma simplifiée du microcircuit du cortex préfrontal. *(D'après Ferguson and Gao, 2018; Fröhlich, 2016; Gabbott et al., 2005; Ko, 2017; Neske and Connors, 2016; Otis et al., 2017; Poorthuis et al., 2013; Santana and Artigas, 2017)*

2.5.2. Balance E/I

Nous venons de détailler le microcircuit local du CPF en nous concentrant principalement sur la présence des nAChRs et mAChRs. Cette description anatomique peut nous permettre, dans un premier temps, d'avoir une idée du microcircuit local du CPF. Plusieurs études ont montré que certaines pathologies associées à des problèmes sociaux sont également caractérisées par une perturbation importante de la balance excitation/inhibition (E/I) au niveau du cortex préfrontal. Cette balance est nécessaire pour le bon fonctionnement du système neuronal. Le ratio excitation/inhibition au sein du cortex préfrontal est de 20/80 en faveur de l'inhibition (Pittaras et al., 2016b). Une perturbation de la balance E/I peut être réalisée par l'utilisation d'un antagoniste GABAergique dans le CPF, ce qui provoque par la suite une perturbation de la mémoire de travail et du comportement social (Yizhar et al., 2011). Il a été montré que la balance E/I est altérée chez les patients avec schizophrénie (Ferguson and Gao, 2018; Yizhar et al., 2011) ou ceux souffrant d'un trouble du spectre autistique (Ferguson and Gao, 2018; Fernández et al., 2018; Yizhar et al., 2011).

Les interneurones modulent le fonctionnement des neurones pyramidaux (Ferguson and Gao, 2018). En effet, il a été montré que le rôle des interneurones PV participaient à la synchronisation des inputs des neurones excitateurs voisins afin d'améliorer le signal (Ferguson and Gao, 2018). Ils permettent aussi le maintien des oscillations GABAergiques (Ferguson and Gao, 2018). La perturbation de la balance E/I peut être due à un déséquilibre des nAChRs. Il a en effet été montré que la suppression de la sous-unité nicotinique (souris beta2 KO) perturbait la balance E/I dans le cortex préfrontal (Pittaras et al., 2016b). De même, l'étude de Kuchibhotla et collaborateur (2017) démontre que la libération d'Ach permet l'activation des interneurones du CPF, qui vont à leur tour inhiber l'activité des neurones pyramidaux. Ainsi, la libération d'Ach dans le CPF peut inhiber indirectement les neurones pyramidaux par l'intermédiaire des interneurones (Kuchibhotla et al., 2017).

2.6. Co libération d'Ach

Il a longtemps été pensé qu'un neurone pouvait libérer un seul et unique neurotransmetteur. Cependant, au fil des années, des preuves se sont accumulées allant dans le sens inverse de cette hypothèse. En effet, l'une des premières démonstrations a été réalisée dans l'organe électrique de *torpedo californica*. Dans cette étude a été montré, que la libération

d'acétylcholine par les vésicules synaptiques était co-libérée avec de l'ATP (Hnasko and Edwards, 2012; Silinsky, 1975). Depuis, d'autres preuves se sont accumulées, comme la libération du peptide vasoactif intestinal (VIP) avec l'acétylcholine ou bien la libération de la somatostatine avec le neuropeptide Y (Bartfai et al., 1988). Une autre étude a montré également que le transporteur du GABA pouvait transporter simultanément de la glycine (Wojcik et al., 2006). Ces quelques études citées ici, ainsi qu'un très grand nombre d'autres, ont remis en question le concept qu'un neurone se limite à un type de neurotransmetteur. De plus, les neurones co-libèrent plusieurs neurotransmetteurs différents qui peuvent être excitateurs, comme par exemple l'acétylcholine et le glutamate dans le striatum (Prado et al., 2013), mais qui peuvent également être excitateur et inhibiteur, comme le glutamate et le GABA. Mais qu'en est-il pour l'Ach ? Peut-on voir ce même mécanisme au sein des neurones cholinergiques innervant le cortex préfrontal ?

En ce qui concerne l'Ach, plusieurs études montrent que les neurones cholinergiques libèrent également différents neurotransmetteurs. Notamment, une étude prouva que les Starburst Amacrine Cells (SACs) de la rétine co-libèrent de l'Ach et du GABA (Lee et al., 2010). Dans le système nerveux central, nous pouvons voir de la même manière une activation sélective des interneurons cholinergiques qui libèrent à la fois de l'Ach et du glutamate (Higley et al., 2011; Prado et al., 2013).

Kosaka et ses collaborateurs mettent en évidence, par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de rats, une co-expression de ChAT et de GABA dans le prosencéphale basal, le cortex cérébral et la rétine. Ces données confirment que les neurones cholinergiques peuvent co-libérer de l'Ach et du GABA au sein du CPF (Kosaka et al., 1988; Saunders et al., 2015a, 2015b).

Ainsi, les neurones cholinergiques peuvent libérer différents neurotransmetteurs au CPF. Toutefois, à l'heure actuelle, les mécanismes qui sous-tendent cette co-libération sont très mal connus et le rôle fonctionnel d'une telle libération conjointe l'est tout autant. L'hypothèse permettant d'expliquer ceci serait que la co-libération permettrait de contrôler la libération des neurotransmetteurs cérébraux. Cette hypothèse a été émise lorsque les terminaisons cholinergiques du cortex préfrontal co-libéraient de l'Ach et du GABA, ce qui permettrait de contrôler l'excitation et l'inhibition au sein du cortex préfrontal (Saunders et al., 2015b). De

plus, il a été mis en valeur le fait que l'Ach contrôle l'excitabilité cellulaire et la plasticité synaptique des neurones (Picciotto et al., 2012). La co-libération GABAergique et glutamatergique en fonction des structures cérébrales pourrait ainsi permettre de réguler ou de nuancer finement la qualité du signal.

Une autre question, tout aussi importante, est de savoir si une vésicule synaptique peut transporter plusieurs neurotransmetteurs différents ou si chaque vésicule transporte seulement un neurotransmetteur. La réponse à cette question dans la littérature n'est pas très claire et d'autres études sont nécessaires afin d'investiguer ceci.

2.7. Libération d'Ach volumique ou transitoire

De nombreuses études ont posé la question du fonctionnement du système cholinergique. Un des débats actuels est de savoir si l'Ach est plutôt libérée de manière classique (c'est-à-dire, synaptique tonique) ou si elle est plutôt relarguée de manière volumique. La libération transitoire tonique repose sur le fait qu'un neurotransmetteur arrive à une terminaison présynaptique et sera ensuite libéré dans la fente synaptique, pour se fixer sur ces récepteurs post-synaptiques. La transmission volumique concerne plutôt une libération plus globale et diffuse au cours de laquelle le neurotransmetteur se diffusera dans l'espace extra-synaptique et pourra se fixer sur différentes cibles. Les caractéristiques générales de la libération synaptique ainsi que de la libération volumique sont résumées dans le Tableau 1 (Arroyo et al., 2014; Dani and Bertrand, 2007; Sarter and Kim, 2015).

Dans cette partie, nous allons essayer d'établir une revue de quelques arguments montrant que l'acétylcholine peut avoir un mode de libération transitoire et ensuite nous verrons ceux qui amènent à penser que l'Ach se transmet en volume. Enfin, nous étudierons quels sont les rôles de ces 2 modes de libération dans les fonctions biologiques.

2.7.1. L'Ach peut être mesurée de manière transitoire

L'Ach peut avoir un mode de libération classique. En effet, des études ont montré que les récepteurs de l'Ach étaient présents au niveau pré et post-synaptique (Dani and Bertrand, 2007; Sarter et al., 2009; Vizi and Lendvai, 1999). L'équipe de Sarter et collaborateurs (2016) a montré, par une méthode voltammétrique qui permet de détecter de manière indirecte la libération d'Ach, que lors d'une tâche de détection d'indice (dans cette expérience, un indice

lumineux), la libération de transients cholinergiques était nécessaire afin que l'animal détecte l'indice lumineux. Sans ce pic d'Ach, les souris étaient incapables de détecter l'indice et n'y répondaient donc pas (Gritton et al., 2016). Un autre argument est qu'au niveau de la fente synaptique l'acétylcholinestérase (AChE) est présente. Comme décrit plus haut, cette molécule qui permet de catalyser l'Ach possède un pouvoir catalytique d'environ de 5000 molécules d'Ach par seconde. Le grand pouvoir catalytique de l'AChE empêche ainsi l'Ach de se diffuser en dehors de la fente synaptique (Sarter et al., 2009, **Figure 23**).

2.7.2. L'Ach peut être libéré de manière volumique

L'Ach peut aussi avoir un mode de libération volumique dont la réponse est lente. L'un des arguments émis en faveur de cette hypothèse est la présence de récepteurs nicotiques et muscariniques en milieu extrasynaptique, c'est-à-dire que les récepteurs à l'Ach sont éloignés de son site de libération (Dani and Bertrand, 2007; Vizi and Lendvai, 1999; Watanabe and Yamamoto, 2015). De plus, la libération d'Ach peut se faire sur des complexes non jonctionnels, c'est-à-dire que les terminaisons cholinergiques n'ont pas forcément de cibles post-synaptiques (Sarter et al., 2009, voir **Figure 23 b**). L'AChE, qui permet la dégradation de l'Ach, est localisée principalement au niveau de la fente synaptique. Ainsi, l'absence d'AChE en dehors des fentes synaptiques renforcerait l'effet de cette libération extrasynaptique d'ACh avec un effet qui pourrait être prolongée dans le temps. L'ensemble de ces arguments va en faveur d'une libération volumique (Sarter et al., 2009, **Tableau 1**).

2.7.3. Libération d'un point de vu biologique

Le débat entre les deux modes de transmission volumique et tonique est actuellement en cours. Dans la littérature, il semble que ces deux mécanismes soient mis en jeu. Les expériences de Sarter et collaborateurs ont permis de démontrer des pics transitoires d'acétylcholine, ce qui concorde avec un rôle modulateur. Il semblerait que les nAChRs jouent un rôle dans les deux modes de libération. Arrayo et collaborateurs (2012) ont étudié l'effet de la libération d'Ach au CPF en activant des interneurones. Ils ont montré que la libération d'Ach provoquait deux types de réponse, une rapide et une lente. La réponse rapide serait médiée par les récepteurs $\alpha 7$, alors que la réponse lente serait plutôt médiée par les récepteurs non $\alpha 7$, ce qui concorde avec le rôle fonctionnel de ces récepteurs. Les auteurs ont associé la libération rapide aux modes de transmissions phasiques, qui servirait à synchroniser l'activité

des interneurons. En revanche, la réponse lente serait plus compatible avec une libération volumique de l'Ach, et, ainsi, un rôle plutôt modulateur (Arroyo et al., 2012, 2014).

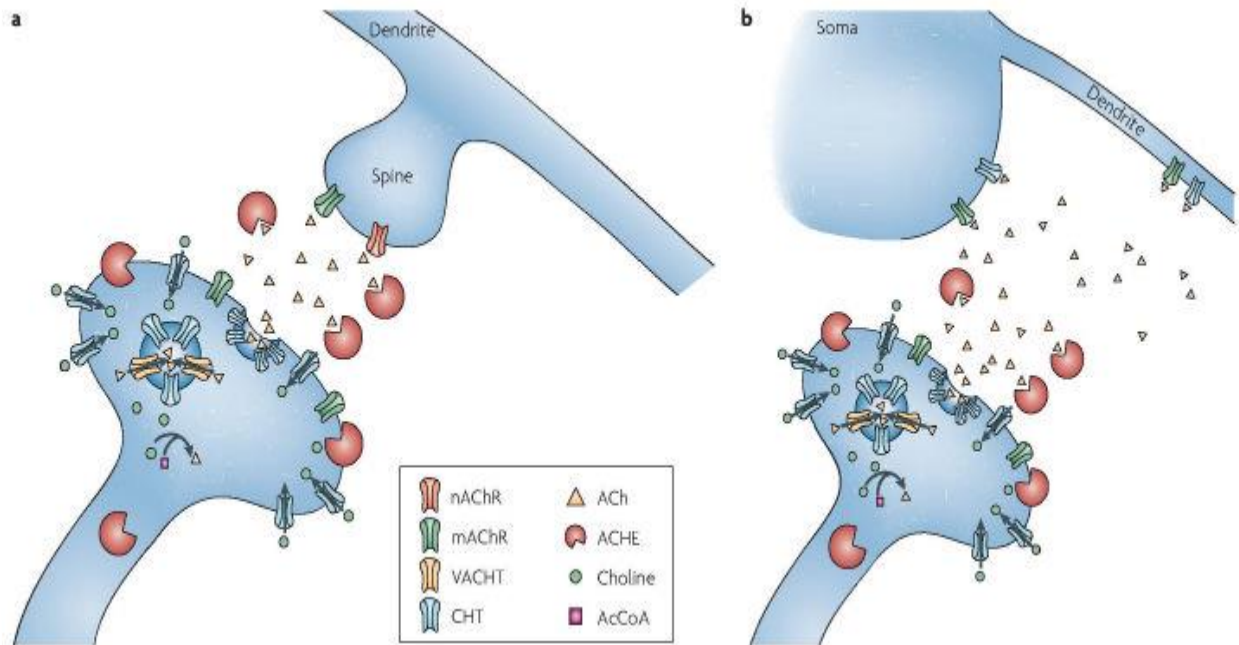


Figure 23. Exemple des deux modes de libération dans la synthèse de l'Ach. a) Mode de libération classique qui se déroule au niveau pré et post-synaptique. La libération d'Ach provoque une forte concentration d'Ach au niveau de la fente synaptique, puis elle va aller se fixer sur son récepteur avant d'être dégradée par l'AChE. b) Pour le mode de libération volumique, l'Ach peut être libérée au niveau des dendrites ou du soma des neurones cholinergiques. Elle est diffusée dans l'espace extracellulaire puis ensuite se fixe sur un récepteur nicotinique ou muscarinique. Abréviations : ACh : acétylcholine, nAChR : récepteur nicotinique, mAChR : récepteur muscarinique, VAcHT : transporteur vésiculaire de l'Ach, ChT : transporteur de la choline, AChE : acétylcholinestérase. (D'après Sarter et al., 2009).

Tableau 1. Caractéristique générale de la transmission classique et volumique (D'après Sarter and Kim, 2015 ; Sarter et al., 2009)

	Transmission classique	Transmission volumique
Spécificité de la liaison	L'Ach libérée se fixe sur une cible spécifique (réponse spécifique)	L'Ach libérée se fixe sur de nombreux sites (réponse non spécifique)
Délais de la réponse	Réponse rapide en quelques ms	Réponse lente pouvant aller de la seconde à la minute
Concentration d'Ach	Forte concentration	Faible concentration car l'Ach est diffuse
Coût énergétique	Faible coût énergétique	Fort coût énergétique
Fonction	Détection des indice	Augmente l'attention

2.8. Vieillessement du système cholinergique

Des études ont montré que le vieillissement chez les mammifères entraîne une diminution de l'épaisseur corticale et une perte neuronale, associé, dans certains cas, à l'émergence de pathologies dégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson (Wallace and Bertrand, 2013). Dans cette partie, nous allons nous intéresser aux effets du vieillissement sur le système cholinergique et essayerons d'expliquer les effets de ce vieillissement cholinergique. Ensuite, nous regarderons les conséquences au niveau comportemental et les moyens actuels permettant de diminuer les effets du vieillissement cholinergique.

Le vieillissement est souvent caractérisé par une perte de neurones. En effet, il a été montré que le vieillissement entraîne une atrophie des neurones cholinergiques (Cooper et al., 1994; Gage et al., 1988), ainsi qu'une régression dendritique (Burke and Barnes, 2006; Mora et al., 2007) ou des projections cholinergiques. Cette diminution est aussi accompagnée d'une perte de récepteurs cholinergiques (Decker, 1987; Nieves-Martinez et al., 2012; Zoli et al., 1999). Certaines études montrent que la perte des neurones cholinergiques pourrait occasionner une augmentation de la synthèse de ChAT, ce qui permettrait de compenser la perte neuronale en

augmentant la capacité de synthèse de l'Ach (Decker, 1987; Gage et al., 1988). Cependant, d'autres études montrent une diminution ou aucune altération de la ChAT avec le vieillissement.(Decker, 1987; Sherman and Friedman, 1990). La différence entre ces études peut s'expliquer par le choix des espèces utilisées (par exemple, rats ou souris), mais aussi par l'étude à des âges différents ou encore avec différentes techniques permettant de quantifier le niveau d'Ach et d'autres molécules impliquées dans la biosynthèse de l'Ach.

La perte de neurones cholinergiques pourrait être due à une diminution des facteurs neurotrophiques, comme le Nerve Growth Factor ou le TrkA (Cooper et al., 1994; Mora et al., 2007; Schliebs and Arendt, 2011). Ce facteur neurotrophique permet une augmentation de la survie, de la taille des neurones ainsi que le maintien des fonctions cognitives. Zoli et ses collaborateurs ont montré que la perte de la sous-unité $\beta 2$ entraînait une perte de neurones plus importante que pour les souris du même âge. Les auteurs en ont conclu que le nAChR- $\beta 2$ pouvait aussi être un facteur de protection face à la dégénérescence cholinergique au cours du vieillissement (Zoli et al., 1999).

Le vieillissement peut avoir des conséquences cellulaires et physiologiques. En effet, l'âge peut modifier les propriétés électrophysiologiques des cellules comme l'expression des gènes (Burke and Barnes, 2006), aboutissant à des changements de comportement. Chez le rongeur, il a été montré que la perte des neurones cholinergiques était corrélée à des dysfonctionnements cognitifs (Gallagher and Colombo, 1995). En effet, le vieillissement diminue les fonctions métaboliques (e.g Aasum et al., 2003), les processus de mémoire (Araujo et al., 2005), l'attention et la reconnaissance objet (Araujo et al., 2005), le contrôle moteur et locomoteur (Salchner et al., 2004; Shoji et al., 2016; Wu et al., 2007), l'anxiété (Shoji et al., 2016). En outre, les déficiences cholinergiques entraînent également une diminution de la flexibilité comportementale (Matamalas et al., 2016; Tait, 2013). En ce qui concerne le comportement social, le vieillissement entraîne une diminution du nombre de contacts sociaux (Boyer et al., 2019; Oizumi et al., 2019; Salchner et al., 2004; Shoji et al., 2016).

Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont des pathologies principalement dues à la dégénérescence neuronale et interviennent essentiellement auprès des personnes âgées. Il a été montré que pour ces deux pathologies, on pouvait observer une dégénérescence des neurones cholinergiques. Ainsi, trouver des traitements qui permettraient de booster l'activité

de l'acétylcholine ou d'empêcher la dégénérescence neuronale, pourrait être un moyen de traiter ces pathologies. Certains traitements sont allés dans ce sens, avec un succès relativement modeste, voire nul chez les patients humains. Par exemple, l'utilisation d'un anti-cholinestérase (inhibiteur de l'AChE), comme la tacrine, améliore les performances d'apprentissage de changement de règle chez les rats âgés (Tait, 2013). De plus, il a été montré que la restauration par lentivirus du facteur de croissance Nerve Growth Factor permettait de restaurer et de conserver les neurones cholinergiques au cours du vieillissement (Schliebs and Arendt, 2011). Il semblerait aussi, que vivre dans un environnement enrichi augmenterait la neurogenèse et, par conséquent, serait un facteur protecteur du vieillissement (Mora et al., 2007). Cependant, le système cholinergique a un rôle multiple sur le cerveau. De ce fait, la dégénérescence des neurones peut avoir de graves conséquences sur de multiples réseaux et, comme nous l'avons vu plus haut, de multiples systèmes de neurotransmission, affectant ainsi les fonctions cognitives, motivationnelles et émotionnelles au sens large. Quelques hypothèses ont suggéré que des mécanismes de compensation permettraient, dans un premier temps, de diminuer l'impact de cette perte de neurones cholinergiques. Cependant, si cette perte est trop importante, elle peut aboutir à différentes pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson qui font l'objet, comme on le sait, d'un nombre incalculable d'études pré-cliniques et cliniques.

2.9. Effet de la libération d'Ach

Effet de la libération d'Ach

Dans cette partie nous allons émettre une hypothèse sur le rôle potentiel de la libération d'Ach. Cette partie nous permettra d'avoir un meilleur aperçu du rôle fonctionnel de la libération d'acétylcholine car à l'heure actuelle encore beaucoup de choses restent à découvrir. Je me concentrerai alors uniquement sur un mécanisme qui a été assez bien décrit.

Des études sur tranches de cerveau ont montré que la libération d'acétylcholine provoquait une réponse biphasique au niveau des neurones cholinergiques : en premier lieu, on observe une hyperpolarisation (Couey et al., 2007), puis une dépolarisation lente (Arroyo et al., 2012, 2014; Couey et al., 2007; Guillem et al., 2011; Picciotto et al., 2012). L'hyperpolarisation est due à une inhibition des cellules pyramidales. Cette inhibition serait due à une

augmentation de l'activité des interneurons GABAergiques qui est médiée par la fixation d'Ach sur les mAChRs présents sur ces interneurons (McCormick and Prince, 1985, 1986). L'infusion de nicotine permettrait l'activation des nAChRs, qui vont ensuite augmenter l'activité des neurones GABAergiques. Cette augmentation de GABA diminue le Ca^{2+} ainsi que la quantité de potentiel d'action. Cela provoque alors une diminution de l'activité des neurones pyramidaux (Arroyo et al., 2012, 2014; Couey et al., 2007). Une autre étude a montré que l'acétylcholine pouvait inhiber directement l'activité des cellules pyramidales (Gulledge and Stuart, 2005, voir **Figure 24**).

L'inhibition au sein du cortex permettrait de rendre les neurones plus facilement excitable (Gulledge and Stuart, 2005). Cela permettrait de supprimer les réponses non spécifiques et donc d'amplifier la prochaine réponse provoquée par la dépolarisation lente.

De même, la dépolarisation lente est médiée par la fixation de l'Ach sur les récepteurs muscariniques M1 situés au niveau des neurones pyramidaux. De plus, on observe également une activation des interneurons exprimant la parvalbumine. L'activation de ces interneurons exprimant la parvalbumine diminue la libération du GABA ce réduit ainsi l'inhibition des neurones pyramidaux. Ces neurones pyramidaux seront donc au final activés (Gulledge and Stuart, 2005; Picciotto et al., 2012). En même temps, que l'activation de certains neurones pyramidaux, l'Ach libérée va aussi se fixer sur les récepteurs muscariniques (M2) situés au niveau des neurones pyramidaux. Ceci permet d'inhiber en parallèle la réponse aux stimuli non pertinents et d'aboutir à une diminution de la réponse corticocortical (Picciotto et al., 2012).

En parallèle, la libération d'acétylcholine permet d'activer le circuit thalamocortical. Soit, l'acétylcholine, par la présence de récepteurs nicotiques $\alpha 4$ et $\beta 2$, va pouvoir augmenter l'excitabilité et la synchronisation des neurones (Kawai et al., 2007; Lambe et al., 2003). Ce circuit va donc libérer du glutamate au niveau du cortex. Le circuit thalamo-cortical est surtout impliqué dans le traitement des informations sensorielles (Gil et al., 1997; Kawai et al., 2007; Kruglikov and Rudy, 2008; Lambe et al., 2003, voir **Figure 24**).

De plus, des études suggèrent que l'attention contrôle l'acquisition des stimuli sensoriels, en renforçant les entrées thalamo-corticales par rapport au traitement cortical

(Hasselmo and Giocomo, 2006; Kruglikov and Rudy, 2008). L'attention serait donc un des moyens qui permettrait au cortex préfrontal de filtrer les informations non pertinentes.

L'augmentation de l'excitabilité des neurones corticaux, des entrées thalamo-corticales et la réduction de l'activité cortico-corticale aboutit à une augmentation de l'activité thalamo-corticale permettant une augmentation du rapport signal/bruit (Gulledge and Stuart, 2005; Picciotto et al., 2012; Runfeldt et al., 2014). Par conséquent, la libération d'acétylcholine au cortex aurait un rôle dans le filtrage attentionnel (Runfeldt et al., 2014). et permettrait ainsi de diminuer l'impact des informations non pertinentes, dans un contexte donné. Cela peut être utile, par exemple, dans l'apprentissage d'une nouvelle règle. En résumé, il semblerait que l'Ach corticale joue un rôle de filtrage des informations et permettrait d'augmenter le rapport signal/bruit, ce qui favoriserait l'activation des inputs thalamo-corticaux, permettant d'obtenir une réponse spécifique à un stimulus pertinent. Cette hypothèse mécanistique (résumée en **Figure 24**) a été étudiée sur l'ensemble du néocortex et non spécifiquement sur le cortex préfrontal, mais elle reste tout de même intéressante. Le cortex préfrontal est une structure très importante pour la prise de décision, l'interaction sociale et les fonctions cognitives. Cette structure intègre les informations provenant de différentes régions du cerveau, ce qui permet de prendre une décision pertinente par rapport à cette information. Ainsi, après avoir reçu toutes les informations, il est nécessaire de faire un point et d'identifier les meilleures options. L'Ach peut jouer un rôle de filtrage de l'information par une augmentation du rapport signal/bruit qui permet de sélectionner et d'identifier les stimuli biologiquement pertinents.

Dans ce contexte de l'interaction sociale, le cortex préfrontal reçoit un grand nombre d'informations provenant de l'état interne de l'animal ainsi que de ses émotions résultant aussi de la prédiction de l'autre animal. L'hypothèse décrite en **Figure 24** et expliquée ci-dessus, semble fonctionnelle dans le cadre des interactions sociales, et peut parfaitement correspondre au rôle de filtrage de toutes les informations non pertinentes ou non saillantes afin d'identifier seulement les informations pertinentes au contexte donné. Il est fort probable que l'acétylcholine, au vu de ses actions pléiotropes (par exemple, sur le système nerveux autonome), possède d'autres fonctions physiologiques majeures. Toutefois dans le cadre d'une prise de décision dans un contexte social, le rôle de l'attention est probablement capital.

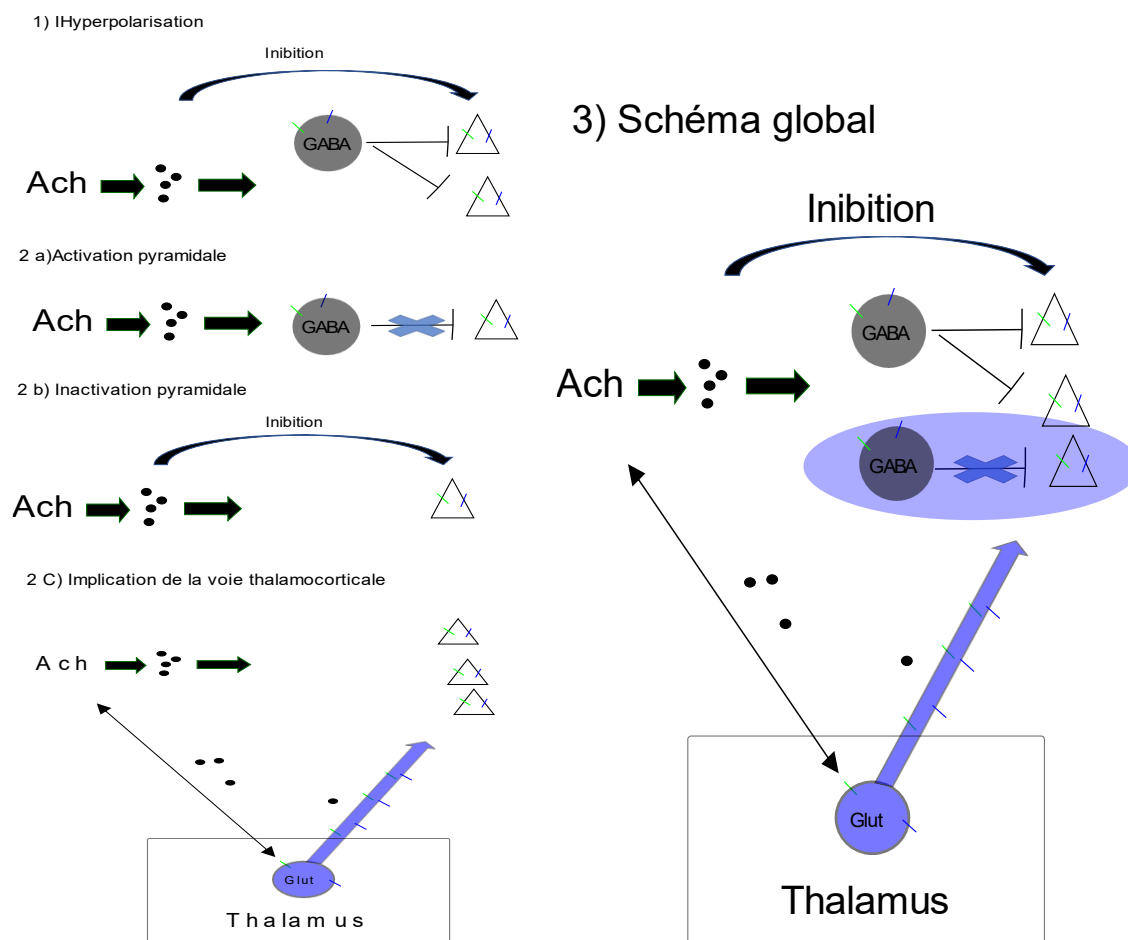


Figure 24. Schéma montrant les conséquences de la libération d'acétylcholine. Dans ce schéma, nous supposons que la libération d'Ach se produit dans tout le cerveau. **1)** Tout d'abord, est présentée une inhibition des neurones pyramidaux qui peut se faire directement par l'acétylcholine ou par l'intermédiaire des interneurons GABAergiques qui vont inhiber les cellules pyramidales. **2a)** Cette étape correspond à l'activation des cellules pyramidales. L'acétylcholine se fixe sur les interneurons à l'interneurone exprimant les récepteurs nicotiques. Ceci va permettre de diminuer l'inhibition favorisant l'excitabilité des neurones pyramidaux. **2b)** En même temps, les neurones pyramidaux vont continuer à être inhibés par l'acétylcholine. **2c)** L'acétylcholine se fixe sur les récepteurs nicotiques $\alpha 4\beta 2$ des neurones thalamo-corticaux, ce qui active la voie thalamo-corticale, augmentant ainsi l'excitabilité et la synchronisation des neurones. La fixation d'Ach va également entraîner une augmentation de la libération de glutamate dans le cortex préfrontal. **3)** Résumé de l'ensemble de ces processus. Toutes ces étapes se déroulent en parallèle, aboutissant ainsi à une inhibition de la voie cortico-corticale et augmentant le rapport signal/bruit. Le cercle bleu montre que l'attention permet de réaliser un filtrage des stimuli jugés pertinents. Les barres bleues représentent les récepteurs nicotiques et les barres vertes les récepteurs muscariniques. Les ronds noirs représentent la fixation de l'Ach. Abréviations : Glut : glutamine, Ach : acétylcholine, GABA : GABAergique, PV : parvalbumine. Schéma issu de Couey et al. (2007), Gil et al. (1997), Gullidge and Stuart (2005), Hasselmo and Giocomo (2006), Kruglikov and Rudy (2008), Lambe et al. (2003), McCormick and Prince (1985, 1986), Parikh et al. (2010).

Dans le cadre de cette hypothèse attentionnelle, on peut noter que, au niveau du cortex préfrontal, les récepteurs nicotiques se trouvent sur les terminaisons dopaminergiques, sérotoninergiques, noradrénergiques, GABAergiques et glutamatergiques (dos Santos Coura et Granon, 2012), provoquant, lorsqu'ils sont stimulés, la libération des différents neurotransmetteurs. Ainsi, l'ensemble de ces données indique que la libération d'Ach dans le cortex préfrontal joue un rôle dans de multiples fonctions.

2.10. Méthode pour étudier le système cholinergique

2.10.1. Méthode pharmacologique

Différentes méthodes existent afin d'étudier le système cholinergique, l'une des premières utilisées est la pharmacologie. La pharmacologie se base sur la fixation d'une molécule sur un récepteur. Dans le cas de l'acétylcholine, il existe 2 types de récepteur : les récepteurs nicotiques et les récepteurs muscariniques (**voir la partie 2.4 "Récepteurs à l'Ach"**). Ainsi, les substances pharmacologiques peuvent se fixer sur les récepteurs nicotiques, sur les récepteurs muscariniques ou les deux. Lors des études pharmacologiques, on regarde l'effet de la substance pharmacologique sur un animal par rapport à un autre animal qui n'a pas reçu la substance ou qui a eu une substance sans effet comme une solution saline. On regarde les différences comportementales, physiologiques, électrophysiologiques ou comportementales. Dans le cas de l'Ach, il existe des agonistes et antagonistes nicotiques et muscariniques. Les agonistes ont pour effet d'activer la signalisation alors que les antagonistes ont pour but d'inactiver cette signalisation (Kokaz et al., 2020).

Il existe une multitude d'agonistes nicotiques, comme la lobéline, la nicotine, la cystine, la varénicline (leurs structures sont montrées dans la **Figure 25 A**). Pour les antagonistes nicotiques, quelques exemples peuvent être cités comme le trimetaphan, la mécamylamine ou la succinylcholine. Concernant les agonistes muscariniques, nous pouvons citer l'acroléine, la xanomeline, la cevimeline, la milamedine, la sabcomeline ou bien le béthanéchol (Kokaz et al., 2020 voir **Figure 25 B**). Comme nous le montre la **Figure 25C**, il existe des agonistes ou antagonistes sélectifs ou non sélectifs. De manière générale, les agonistes ou antagonistes non sélectifs sont des antagonistes qui vont agir sur tous les

récepteurs muscariniques ou nicotiniques. Ils permettent de comprendre principalement une voie de simulation plutôt qu'une autre. On peut aussi trouver ce qu'on appelle des agonistes ou antagonistes sélectifs, ces molécules sont en général spécifiques à un seul type de sous-unité nicotinique ou muscarinique.

La pharmacologie a permis une meilleure compréhension du système cholinergique, par exemple des études ont montré que l'Ach avait une application sur les performances cognitives et permettait une meilleure attention lors d'une tâche d'attention soutenue ainsi qu'une amélioration de la mémoire de travail (Kokaz et al., 2020), des processus de récompense, de l'apprentissage, du contrôle de l'anxiété et de la douleur (Zarrindast and Khakpai, 2019).

Même si les études pharmacologiques ont permis une meilleure compréhension du système cholinergique, elles comportent aussi plusieurs inconvénients majeurs. Le premier est le manque de spécificité des substances pharmacologiques (Champtiaux and Changeux, 2004). Par exemple, le béthanéchol est un antagoniste qui agit sur les récepteurs M1 et M2 (Kokaz et al., 2020). Le BuTAC ([5R-(exo)]-6-[4-butylthio-1,2,5-thiadiazol-3-yl]-1-azabicyclo-[3.2.1]-octane) reste un agoniste muscarinique qui produit une pleine activité lorsqu'il se fixe sur le récepteur M2, mais il peut aussi se fixer sur les récepteurs M1 et M4 et dans ce cas aura une activité partielle, alors que cette même molécule tient un rôle d'antagoniste chez les récepteurs M3 et M5. Il a été montré que cette molécule est impliquée dans l'activité d'un antipsychotique chez des modèles animaux de schizophrénie, mais cette multitude d'activités rend difficile la compensation du système cholinergique. Une autre étude a montré par exemple que la scopolamine, qui est un antagoniste non-spécifique, était capable de moduler dans une certaine mesure la nicotine, le récepteur NMDA et même les récepteurs nicotiniques comme la sous-unité $\alpha 7$ (Falsafi et al., 2012 ; Schmeller et al., 1995). Cette non spécificité se retrouve dans beaucoup de molécules pharmacologiques, ce qui limite les interprétations. Un autre grand problème des études pharmacologiques est la concentration des substances injectées qui est nettement supérieure aux conditions physiologiques. Les effets observés seront alors des effets généraux qui empêchent l'étude d'effets subtiles.

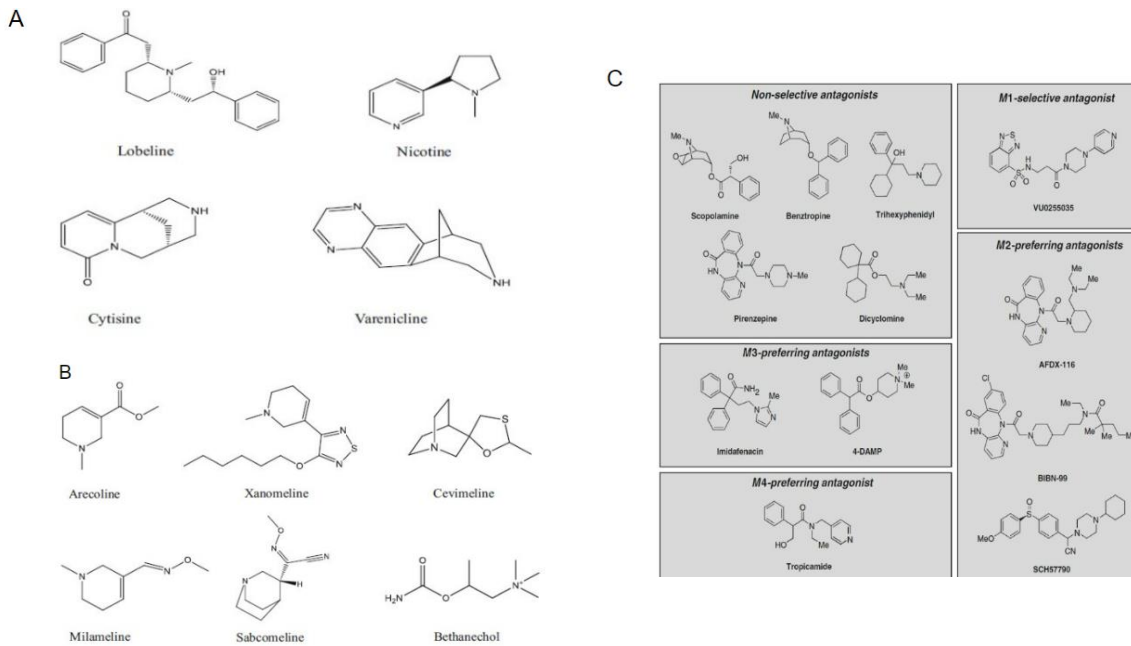


Figure 25. Les agonistes et antagoniste nicotinique et muscarinique A) Agoniste nicotinique B) Agoniste muscarinique C) Antagoniste muscarinique (D'après Kokaz et al., 2020).

2.10.2. Modèle de souris KnockOut (KO)

Une autre méthode a été aussi beaucoup utilisée afin de comprendre le fonctionnement du système cholinergique. Cette méthode consiste à utiliser la technologie KnockOut (KO) qui permet d'inhiber un gène spécifique. Le plus gros avantage de cette technique est qu'elle permet d'étudier l'effet d'un seul gène et d'observer les conséquences comportementales, électrophysiologiques et physiologiques entre autres (Picciotto and Wickman, 1998). L'utilisation des KO par rapport aux études pharmacologiques peut comporter plusieurs avantages. Lors des études pharmacologiques, il est souvent nécessaire d'utiliser des agonistes ou des inhibiteurs qui soient suffisamment sélectifs et il est parfois difficile de trouver ces agonistes ou antagonistes (Docherty, 2007). L'utilisation des souris KnockOut permet de contourner ce problème en ciblant spécifiquement le gène qui nous intéresse. Dans le cas de ce manuscrit nous allons nous intéresser aux études qui ont réalisées un KO des sous-unités nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine.

Cette technique a beaucoup été utilisée afin de comprendre le rôle des récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine. Il existe à l'heure actuelle des KO pour toutes les sous-unités nicotiques cérébrales (Champiaux and Changeux, 2004; Picciotto et al., 1995)

et pour tous les récepteurs muscariniques (Bubser et al., 2012). De même, certains auteurs ont réalisé des doubles KO comme c'est le cas pour l'étude de la sous-unité $\alpha 9$ - $\alpha 10$ (Morley et al., 2017). La réalisation de tous ces KO a permis de mieux comprendre le rôle de chaque sous-unité nicotinique et muscarinique de l'acétylcholine (Bubser et al., 2012; Champtiaux and Changeux, 2004). Par exemple, la réalisation de KO a permis de montrer que les récepteurs nicotiques $\beta 2$ et $\alpha 4$ étaient impliqués dans les déficiences cognitives ou lors de problèmes attentionnels (Champtiaux and Changeux, 2004). Il a été aussi montré que la sous-unité $\beta 2$ était impliquée dans des mécanismes de renforcement (Champtiaux and Changeux, 2004) où d'interaction sociale (Avalé et al., 2011). De la même façon, pour les récepteurs muscariniques, la réalisation de KO nous a montré leur implication dans plusieurs processus cognitifs. Par exemple, un KO de la sous-unité muscarinique M2 provoque des perturbations au niveau de la flexibilité comportementale et de la mémoire de travail (Bubser et al., 2012; Seeger et al., 2004).

Les modèles KO peuvent aussi être utilisés en complément des études pharmacologiques. Il a été montré que la nicotine stimule la libération de dopamine dans le striatum ventral chez les souris WT, mais on ne retrouvait pas cet effet chez les souris $\beta 2$ KO. Les auteurs en ont donc conclu que l'injection de la nicotine et la sous-unité $\beta 2$ permettaient d'augmenter la libération dopaminergique, et qu'ainsi, la sous-unité $\beta 2$ était responsable de la libération de dopamine dans le striatum (Picciotto et al., 1998).

Ce modèle, comme tous les autres modèles, présente quelques inconvénients. Par exemple, la modification d'un gène dès la naissance peut perturber le comportement normal de la souris. De plus, le fait que les souris KO n'expriment plus le gène depuis la naissance, nous laisse supposer l'existence de mécanismes compensatoires qui peuvent limiter les effets observés. Une autre limite tout à fait envisageable est qu'il existe différents types de récepteurs nicotiques. Ces récepteurs sont pentamériques et peuvent s'assembler de différentes façons, de telle sorte que l'on obtient différents types de sous-unités nicotiques. Nous pouvons supposer que plusieurs récepteurs nicotiques par exemple peuvent avoir la même fonction, ainsi l'inactivation d'un seul récepteur nicotinique peut causer des conséquences limitées (Champtiaux and Changeux, 2004).

La pharmacologie ainsi que l'utilisation de modèles KnockOut ont permis de mieux comprendre le fonctionnement du système cholinergique, mais ces méthodes ne nous permettent pas d'étudier l'effet de la libération d'acétylcholine. De plus, il a été montré que l'utilisation de la souris $\beta 2$ entraînait une altération de différents neurotransmetteurs dont l'acétylcholine (Coura et al., 2013, **Figure 26**). Par conséquent, les modèles KnockOut ne sont pas optimaux pour essayer de comprendre l'effet de la libération d'Ach. Une autre méthode est apparue, l'optogénétique. Grâce à cette technique, il est possible d'étudier l'effet de la libération d'Ach et elle permet de combler certaines limites des modèles KO. Dans les parties suivantes, nous expliquerons le principe de cette technique, son utilisation et le type de souris utilisé.

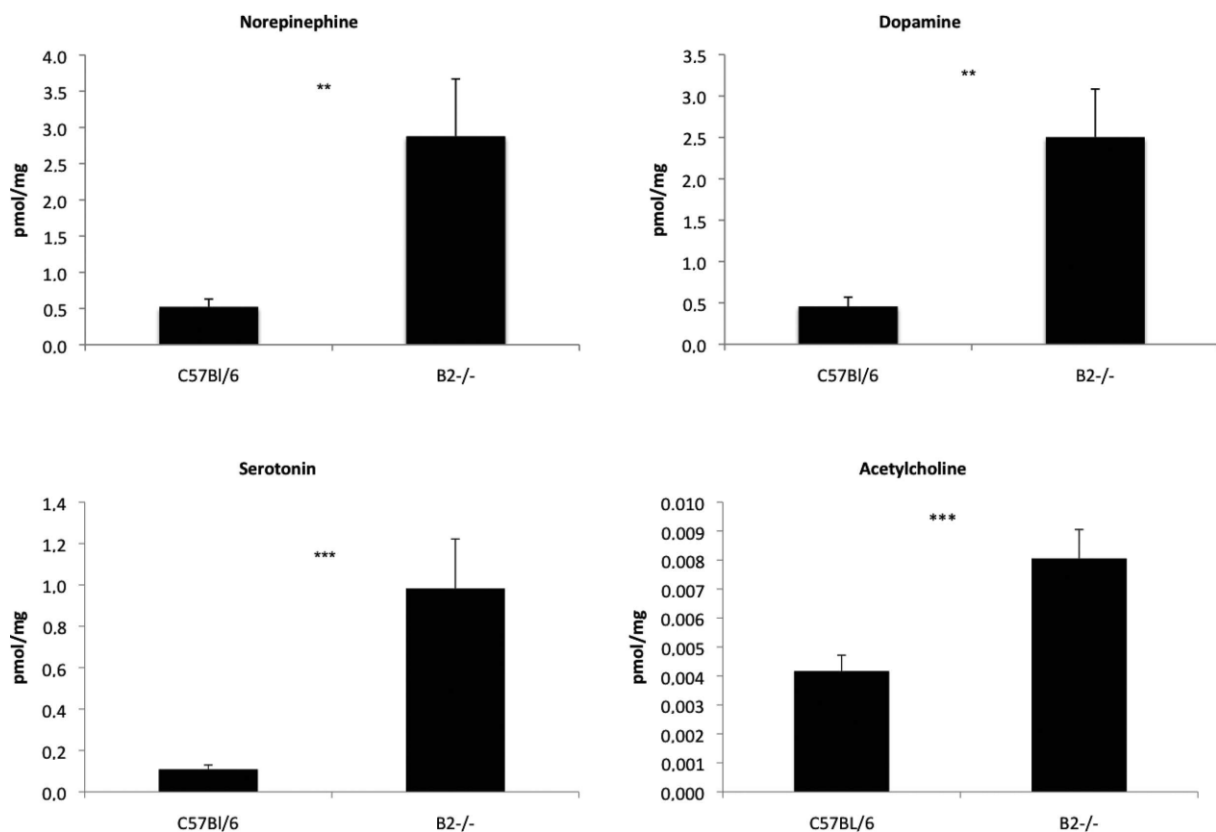


Figure 26. Niveau de monoamines et d'Ach dans le PrL de souris C57BL/6 et $\beta 2$ KO. D'après Coura et al. (2013).

2.10.3. L'optogénétique technique permettant la libération des neurotransmetteurs

L'optogénétique est une méthode qui utilise des opsines (protéine sensible à la lumière) dans le but de contrôler l'activité neuronale (Bernstein and Boyden, 2011; Deisseroth, 2011, 2015; Dugué and Tricoire, 2015; Song and Knöpfel, 2016; Zhang et al., 2010). L'avantage de cette

technique est sa spécificité car en effet, on peut entraîner ou bloquer la libération spécifique d'un neurotransmetteur. Ainsi, cette technique permet de contrôler grâce à la lumière l'activité neuronale avec une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde. Même si la stimulation électrophysiologique demeure quand même plus précise, nous pouvons contrôler aussi à quel moment nous souhaitons avoir la stimulation. Cette technique peut être utilisée en complément des études pharmacologiques.

2. 10.3. 1. Les opsines

Les opsines ont été découvertes pour la première fois en 1971. Ces chercheurs ont découvert que l'*Halobacterium halobium* exprimait une bactériorhodopsine qui agit comme une pompe à proton et qui peut être activée par des photons de lumière visible (Oesterhelt and Stoeckenius, 1971). Peu de temps après cette découverte, l'halorhodopsine fut ensuite découverte en 1977 (Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977), puis la channelrhodopsine en 2002 (Nagel et al., 2002). L'halorhodopsine est une opsine activée par une lumière jaune et qui va créer une hyperpolarisation. La channelrhodopsine, quant à elle, est une opsine activée par la lumière bleue et qui va permettre de dépolariser les cellules. En 2005, des chercheurs ont réussi à utiliser les opsines afin de contrôler l'activité neuronale par la lumière (Boyden et al., 2005). C'est à partir de cette étude que l'optogénétique commença. La **Figure 27 A** retrace l'intérêt déjà porté à cette technique depuis la découverte des opsines jusqu'en 2010.

Propriété des opsines naturelles et leurs dérivées

À la suite de cette première étude, trois opsines naturelles seront utilisées et dérivées. Ces opsines sont : la Channelrhodopsine (ChR2), l'Halorhodopsine (Halo) et l'Archaerhodopsine-3 (Arch).

La channelrhodopsine (ChR2) est issue de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette opsine s'active à la suite d'une lumière bleue et laisse ensuite entrer des ions sodiums, ce qui créera une dépolarisation (voir **Figure 27 B**, Bernstein and Boyden, 2011). Le spectre d'activation de cette opsine est montré à la **Figure 27 C**.

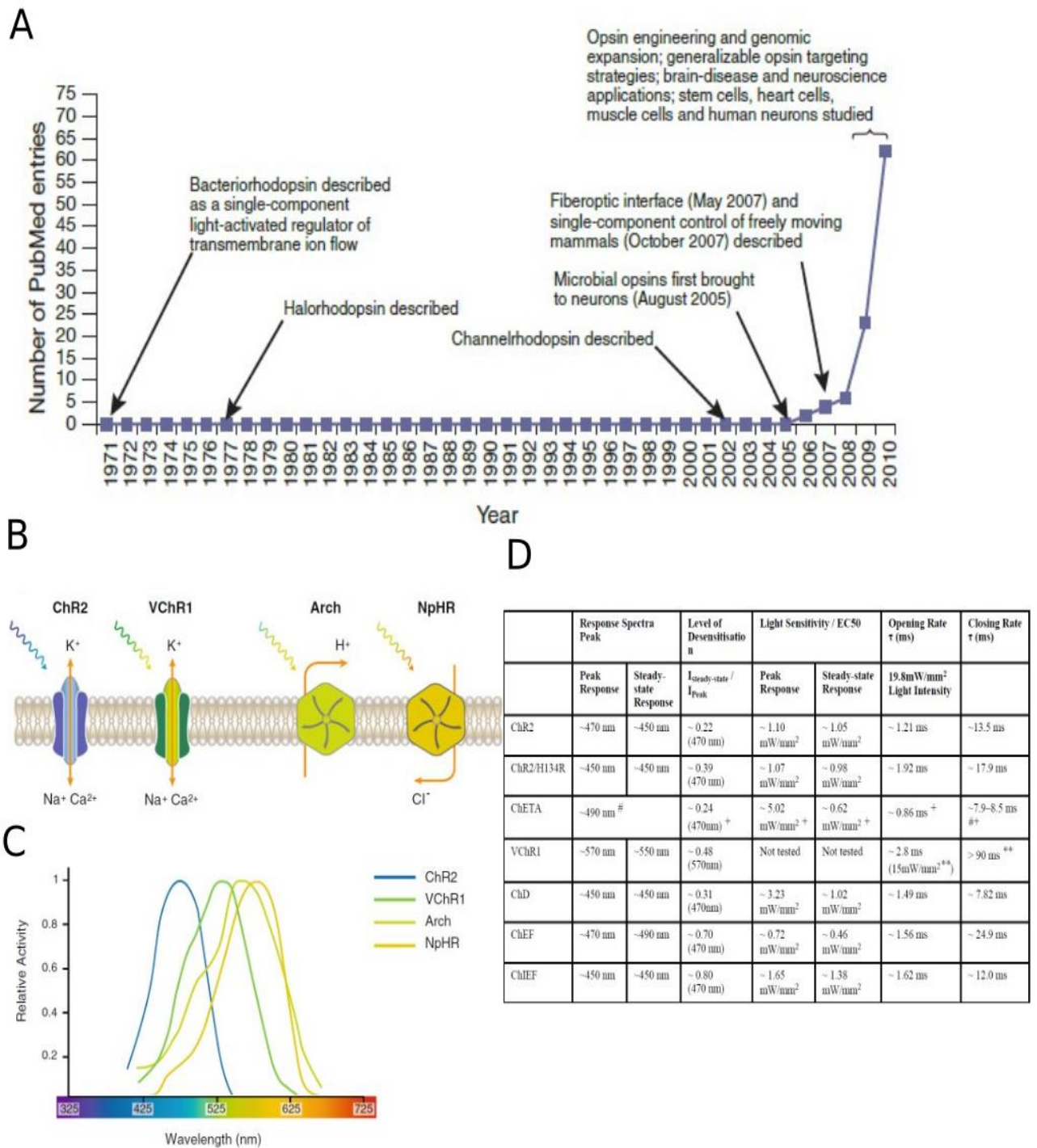


Figure 27. Développement et quelques opsines utilisées en optogénétique. A) Image représentant l'importance et l'intérêt de l'optogénétique au fil des années. Sur cette figure on remarque que l'essor de cette technique a commencé principalement après l'étude de Boyden et al. (2005). Image issue de l'article de Deisseroth (2011). B) Propriétés de quatre opsines (ChR2, VChR1, Arch, NpHR) couramment utilisées en optogénétique (Rein and Deussing, 2012). C) Propriétés spectrales des quatre opsines montrées en B). Image issue de Rein and Deussing (2012). D) Propriétés cinétiques de quelques opsines : ChR2, ChR2/H134R, ChETA, VChR1, ChD, ChEF and ChIEF. Image issue de Lin (2011).

L'Halorhodopsine (Halo/NpHR), a été extraite de l'espèce *Natronomonas pharaonis*. Cette opsine va s'activer à la suite d'une lumière verte. Elle va faire entrer des ions chlores du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire ce qui va créer une hyperpolarisation **Figure 27 B**. Le spectre d'activation de cette opsine est montré en **Figure 27 C**.

L'Halorhodopsine (Halo/NpHR) a été extraite de l'espèce *Natronomonas pharaonis*. Cette opsine s'active à la suite d'une lumière verte et fait entrer des ions chlores du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire ce qui crée une hyperpolarisation (voir **Figure 27 B**, Bernstein and Boyden, 2011). Le spectre d'activation de cette opsine est montré en **Figure 27 C**.

L'Archaerhodopsine-3 (Arch) est une opsine provenant de l'espèce *Halobacterium sodomense*. Cette opsine s'active à la lumière verte et est une pompe à proton qui passe du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire, ce qui entraîne alors une inactivation de la cellule (**Figure 27 C**, Bernstein and Boyden, 2011). Le spectre d'activation de cette opsine est montré à la **Figure 27 C**.

Ces trois opsines sont majoritairement utilisées dans la littérature et sont extraites chez les espèces de manière naturelle. Ces opsines ont fait l'objet de nombreuses modifications afin d'améliorer leur efficacité ou de répondre à un besoin spécifique. En règle générale, le chercheur modifie l'un des paramètres suivant : la conductance des canaux, la sélectivité des ions, la cinétique, leur désensibilisation et leur récupération de l'état de désensibilisation, la sensibilité à la lumière, la réponse spectrale ou bien l'expression et le trafficking de la membrane (Lin, 2011). Prenons l'exemple du NpHR, extrait de l'espèce *Natronomonas pharaonis*, des chercheurs ont modifié cette opsine afin d'améliorer l'intégration de cette opsine sur différents tissus, de diminuer sa toxicité et d'augmenter son pouvoir inhibiteur. Les chercheurs de cette étude ont nommé cette molécule eNpHR (le « e » pour « enhanced » soit « améliorée » en français (Gradinaru et al., 2008). D'autres opsines ont été créées par différents laboratoires, par exemple, une nouvelle opsine créée s'appelle VCHR1. La VCHR1 est très similaire à la ChR2, sauf que cette opsine est excitée par une lumière verte et non par une lumière bleue (Zhang et al., 2008). D'autres opsines ont été créées afin d'être stimulées en rouge, ce qui donne l'opsine Red-activatable Channelrhodopsin (ReaChR) pour une Channelrhodopsine activable par la lumière rouge ($\lambda \sim 590$ to 630 nm Lin et al., 2013).

L'avantage du changement de spectre d'émission est que cela permet des combinaisons multiples si l'on veut réaliser différentes modulations simultanées. Un autre grand avantage pour les opsines stimulées en lumière rouge est l'utilisation de la technologie infrarouge. En effet, les infrarouges sont plus pénétrants dans les tissus où l'on peut stimuler sans avoir besoin d'implanter une fibre optique. Cette application peut être fort utile dans le traitement de nombreuses pathologies. Il existe à l'heure actuelle de nombreuses autres opsines modifiées (Glock et al., 2015; Husson et al., 2012; Lin, 2011; Lin et al., 2013; Mattis et al., 2011; McIsaac et al., 2015; Rein and Deussing, 2012; Zhang et al., 2008). Un exemple est montré dans la **Figure 27 D**.

L'optogénétique a déjà été couplé à diverses techniques, comme la microdialyse (Tritschler et al., 2017; Zant et al., 2016), ou l'électrophysiologie (Eggermann et al., 2014; Kalmbach and Waters, 2014). Avec plusieurs fibres optiques, il est possible de cibler différentes zones cérébrales avec la même opsine (Bernstein and Boyden, 2011). En utilisant les bonnes opsines et les bons virus, il est possible de moduler deux populations cellulaires différentes. Cette étude a été réalisée chez le *C.elegans* afin de mieux comprendre le fonctionnement des neurones ASH (Husson et al., 2012). De plus, de nombreuses possibilités avec cette technique sont réalisables car elle est encore en plein développement et de nouvelles opsines ou applications devront apparaître prochainement.

2.10.3.2 Le système Cre-Lox permet de cibler les neurones d'intérêt

Afin de réaliser de l'optogénétique il est nécessaire d'introduire l'opsine d'intérêt dans nos neurones d'intérêt (par exemple, les neurones cholinergiques). Pour ce faire, nous pouvons utiliser le système de recombinaison Cre (pour « cause recombinaison ») -LoxP (pour « locus of crossing over »). Ce système est relativement simple car il nécessite d'activer une protéine, la Cre recombinase, et deux sites spécifiques LoxP. La Cre recombinase est spécifique aux sites LoxP. Par recombinaison génétique, le gène de la Cre va être introduit de manière spécifique au sein des neurones cholinergiques. On aura des animaux Cre inducibles de telle manière que seuls les neurones cholinergiques peuvent exprimer la Cre. De plus, notre opsine d'intérêt, entourée de deux sites LoxP, sera introduite dans un vecteur contenant notre opsine d'intérêt entourée de deux sites LoxP à chaque extrémité. Ce vecteur sera ensuite infusé près des neurones cholinergiques et grâce au système Cre-Lox, il sera possible d'introduire notre opsine

d'intérêt uniquement dans les neurones cholinergiques (Babinet, 1995 ; Dugué and Tricoire, 2015). La position des sites LoxP est très importante car si les deux sites Lox sont dans la même position, la Cre va induire la délétion du fragment d'ADN situé entre les deux sites LoxP qui sera dégradé. En revanche, si les deux sites Lox sont dans des sens opposés, la Cre recombinase introduira notre gène d'intérêt au sein des neurones cholinergiques. Le principe de cette méthode est résumé dans la **Figure 28** ci-dessous (Babinet, 1995; Dugué and Tricoire, 2015).

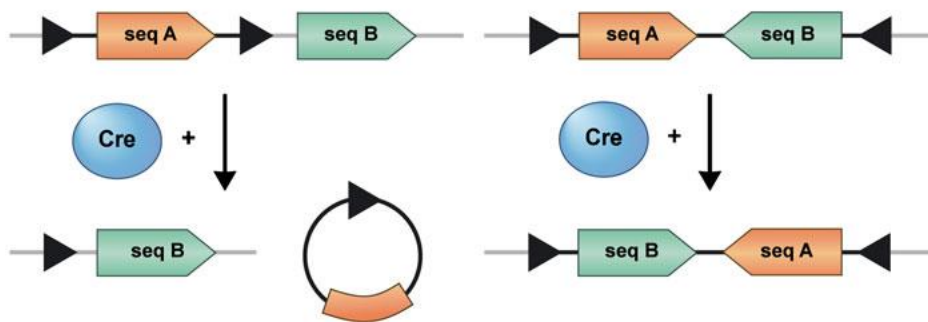


Figure 28. Principe du système Cre-LoxP Les flèches noires représentent les sites LoxP. A) les deux sites LoxP sont du même côté. La recombinase de la Cre va donc induire la suppression du gène seq A mais garder le gène seq B. B) Les deux sites Cre-Lox sont de sens opposés donc la Cre recombinase va donc insérer ces deux séquences (D'après Renninger et al., 2011)

2.10.3.3 Les lignées Cre

2.10.3.3.1 Quelques lignées Cre

À ce jour, il existe un bon nombre de lignées Cre et chaque lignée présente ses caractéristiques et à pour but de cibler une population spécifique. Par exemple, il existe les PV-Cre permettant de cibler les interneurons exprimant la parvalbumine (Kuchibhotla et al., 2017; Scheggia et al., 2020), les SOM Cre permettent de cibler les interneurons exprimant la somatostatine (SOM) (Kuchibhotla et al., 2017; Scheggia et al., 2020), les Bacterial Artificial Chromosome (BAC), la Cre recombinase qui permet de cibler les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe (Tritschler et al., 2017), les ChAT-Cre qui permettent de cibler les neurones cholinergiques (Gritton et al., 2016; Kalmbach et al., 2012; Vandecasteele et al., 2014). Cette liste est évidemment non exhaustive et a juste pour but de montrer la diversité des lignées Cre existantes, mettant en valeur ainsi les différentes possibilités d'utilisation de ces lignées. Le **Tableau 2** montre quelques lignées Cre qui ont déjà été utilisées dans la littérature.

Tableau 2. Exemple de différentes lignées de Cre (D'après Madisen et al., 2010)

Cre line *	Reporter	CISH data	DFISH data	XFP data	Expression highlight [#]	JAX or MMRRC #
<i>8030451F13Rik-Tg2-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Scattered populations in the cortex and hippocampus	JAX #008848
	Ai2			EYFP		
<i>A930038C07Rik-Tg4-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Scattered populations enriched in layers 3/4/5	JAX #009616
<i>Camk2a-Cre</i> ³⁸	Ai2	EYFP, Cre	EYFP/Gad1	EYFP	Widespread in forebrain areas, e.g. cortex, hippocampus, striatum	JAX #005359
	Ai9	tdTomato	tdTomato/Gad1	tdTomato		
<i>Camk2a-CreERT2</i> (uninduced) [§]	Ai14	tdTomato	tdTomato/Gad1	tdTomato	Scattered populations in cortex	
	Ai6			ZsGreen		
<i>Camk2a-CreERT2</i> (induced) [§]	Ai14	tdTomato	tdTomato/Gad1	tdTomato	Widespread in forebrain areas, e.g. cortex, hippocampus, striatum	
	Ai6			ZsGreen		
<i>Chat-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Chat, tdTomato/Gad1	tdTomato	Cholinergic neurons	JAX #006410
	Ai6			ZsGreen		
<i>Drd1a-Cre</i> ³⁹	Ai3	EYFP, Cre	EYFP/Gad1, EYFP/Drd1a	EYFP	Striatum and cortex	
	Ai9	tdTomato		tdTomato		
<i>Emx1-ires-Cre</i> ⁴⁰	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1, Emx1/tdTomato	tdTomato	Widespread in cortex	JAX #005628
<i>ErbB4-2A-CreERT2</i> (induced) [§]	Ai14	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1, Pvalb/tdTomato, ErbB4/tdTomato	tdTomato	Scattered interneuron populations in cortex, hippocampus	
<i>Gfap-Cre</i> ⁴¹	Ai3	EYFP	Gfap/EYFP		Both astrocytes and widespread neuronal expression	JAX #004600
	Ai6	ZsGreen, Cre	Gfap/ZsGreen	ZsGreen		
<i>Ntsr1-Cre</i> ²⁷	Ai3	EYFP	EYFP/Gad1	EYFP	Layer 6 specific	MMRRC #017266
	Ai14	tdTomato	tdTomato/Gad1	tdTomato		
<i>Pvalb-2A-Cre</i>	Ai14	tdTomato	tdTomato/Gad1, Pvalb/tdTomato	tdTomato	Pvalbumin-positive interneurons and excitatory neurons in layer 5	
	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1, Pvalb/tdTomato	tdTomato		
<i>Pvalb-ires-Cre</i> ³⁴	Ai14	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1, Pvalb/tdTomato	tdTomato	Pvalbumin-positive interneurons	JAX #008069
	Ai9	tdTomato	tdTomato/Gad1, Pvalb/tdTomato	tdTomato		
<i>Pcp2-Cre</i> ²⁶	Ai2	EYFP	Pcp2/EYFP	EYFP	Purkinje cells, scattered population of cells (glial) throughout the brain, also	JAX #006207
	Ai9	tdTomato	Pcp2/tdTomato	tdTomato		

Cre line *	Reporter	CISH data	DFISH data	XFP data	Expression highlight [#]	JAX or MMRRC #
	Ai6	ZsGreen, Cre		ZsGreen	enriched neuronal expression in visual cortex	
	Ai3	EYFP		EYFP		
<i>Pomc-Cre</i> ⁴	Ai3	EYFP, Cre	EYFP/Pomc1	EYFP	POMC-positive neurons in hypothalamus, also in dentate gyrus	JAX #005965
	Ai9			tdTomato		
<i>Scn1a-Tg1-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Enriched in layer 4, plus scattered widespread expression	JAX #009111
<i>Scn1a-Tg2-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Very sparse cells in layer 4, mostly in somatosensory area	JAX #009112
<i>Scn1a-Tg3-Cre</i>	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Layer 4 specific	JAX #009613
<i>Six3-Cre</i> ³²	Ai3	EYFP	EYFP/Gad1	EYFP	Enriched in layer 4, plus scattered populations in cortex, striatum	
	Ai9	tdTomato	tdTomato/Gad1	tdTomato		
<i>Slc6a3-Cre</i> ²⁵	Ai3	EYFP, Cre	EYFP/Slc6a3	EYFP	Dopamine neurons, plus sparse populations elsewhere	
	Ai9	tdTomato	Slc6a3/tdTomato	tdTomato		
<i>Wfs1-Tg2-CreERT2</i> (induced) [§]	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Enriched in layers 2/3	JAX #009614
<i>Wfs1-Tg3-CreERT2</i> (induced) [§]	Ai9	tdTomato, Cre	tdTomato/Gad1	tdTomato	Enriched in layers 2/3 plus scattered populations in cortex	JAX #009103

Dans les prochains paragraphes de ce manuscrit, nous allons nous intéresser à la lignée des ChAT-Cre. Cette lignée permet de moduler l'acétylcholine car elle comporte la Cre recombinase au sein des neurones cholinergiques.

2.10.3.3.2 Les souris ChAT-Cre permettent l'étude du système cholinergique

Il existe deux types de souris transgéniques fréquemment utilisées exprimant la Cre recombinase au sein des neurones cholinergiques : les ChAT(BAC)Cre et les ChAT-IRES-Cre. Les lignées transgéniques Bacterial Artificial Chromosome (BAC) sont de grands fragments génomiques englobant à la fois le gène d'intérêt et les gènes adjacents indésirables. De manière générale, ces gènes supplémentaires sont introduits dans le génome en copies multiples avec le transgène BAC, et leur surexpression involontaire peut avoir des conséquences fonctionnelles (Ting and Feng, 2014). Au sein du système cholinergique, la quantité de VACHT permet de contrôler la quantité d'Ach (Lima et al., 2010; Nagy and Aubert, 2012; Song et al., 1997). Ainsi, une altération du VACHT peut avoir des conséquences importantes sur la libération d'Ach. Des études ont montré que chez les souris ChAT-BAC, on pouvait observer une augmentation de l'expression protéique de la ChAT et du VACHT dans l'hippocampe (Chen et al., 2018). Cette augmentation du VACHT a aussi été montrée dans le cortex préfrontal du rat (Mantanona et al., 2019). De plus, les souris ChAT-ChR2-EYFP BAC (exprimant directement l'opsine ChR2 dans les neurones cholinergiques) montrent une libération de la protéine ChAT normale dans l'hippocampe et le tronc cérébral, mais une surexpression de la protéine VChAT dans l'hippocampe, le tronc cérébral ainsi que le striatum et le cortex (Crittenden et al., 2014; Kolisnyk et al., 2013). Ces altérations cholinergiques peuvent par la suite provoquer des altérations comportementales (Chen et al., 2018; Kolisnyk et al., 2013; Mantanona et al., 2019).

Les souris ChAT-IRES-Cre ont été créées avec une stratégie de Knock-In en insérant la séquence IRES (de l'anglais « Internal Ribosome Entry Site » qui pourrait se traduire par « Site d'Entrée du Ribosome Interne »). Cette séquence IRES va être fusionnée à la Cre qui se trouvera en aval du codon stop du gène de la ChAT (Rossi et al., 2011). La **Figure 29** schématise la construction des souris ChAT-IRES-Cre. Des études ont montré qu'au niveau de l'hippocampe la quantité de ChAT est augmentée, alors que la quantité de protéine VACHT est similaire aux WT (Chen et al., 2018). De plus, la Cre recombinase présente des niveaux plus élevés chez les souris ChAT-BAC-Cre que chez les souris ChAT-IRES-Cre (Chen et al., 2018). Plusieurs études ont montré que l'expression de la Cre pouvait être toxique au sein des neurones cholinergiques

(Gong et al., 2007; Harno et al., 2013; Schmidt et al., 2000; Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007). Cette toxicité peut entraîner des effets délétères au niveau des neurones cholinergiques.

D'après les données présentées ci-dessous, il semblerait que les souris ChAT-IRES-Cre aient moins d'altération au niveau du système cholinergique. De plus, elles ont moins de risques de développer de multiples copies du gène délétère et leur niveau de Cre est moins important, ce qui diminue les effets secondaires. De ce fait, il semblerait que l'utilisation des ChAT-IRES-Cre soit plus appropriée afin de disséquer l'implication du système cholinergique par des approches optogénétiques.

Ensemble, toutes les données ci-dessus soutiennent fortement l'utilisation de souris ChAT-IRES-Cre pour cibler les neurones cholinergiques afin d'élucider la contribution relative des circuits cholinergiques au comportement des souris par des approches optogénétiques ou chémo-génétiques.

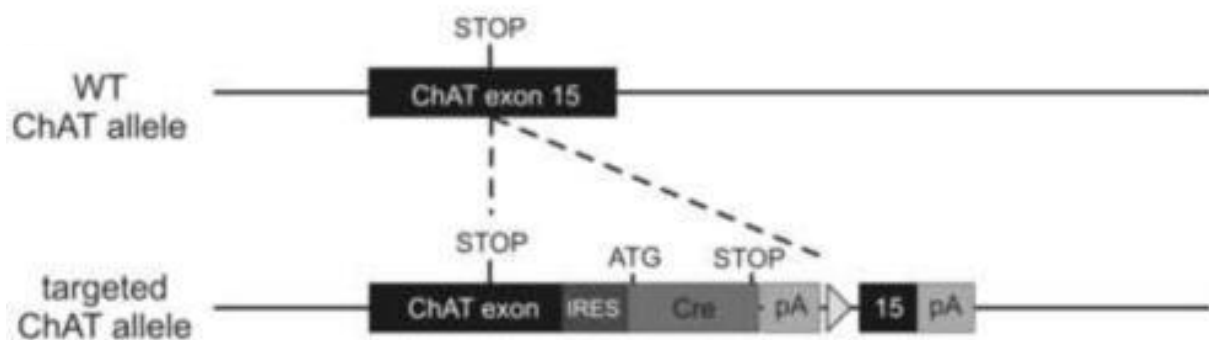


Figure 29. Génération des souris transgéniques ChAT-IRES-Cre. Au niveau du gène *ChAT* la séquence d'entrée interne du ribosome (*IRES*) couplée à la *Cre* recombinase en amont du codon stop par technique de recombinaison homologue (D'après Rossi et al., 2011).

Même si beaucoup d'études utilisent les souris ChAT-Cre, peu d'études ont essayé de caractériser le phénotype de ces souris. Néanmoins, une étude tenta de comparer le phénotype des deux souris ChAT-BAC-Cre et ChAT-IRES-Cre aux souris WT (Chen et al., 2018). Les résultats montrent que les souris ChAT-BAC-Cre n'ont pas de trouble locomoteur, la cataplexie induite par le médicament est normale et la hypolocomotion médiée par la nicotine ou l'entraînement alimentaire opérant est similaire aux contrôles. En revanche, les souris transgéniques ChAT-BAC-Cre ont présenté des déficits dans l'auto-administration de nicotine par voie

intraveineuse. Au niveau des souris ChAT-IRES-Cre, elles présentent un niveau d'anxiété normal, une cataplexie induite par les médicaments ou un comportement d'auto-administration de la nicotine par rapport à leurs congénères WT. Néanmoins, elles présentent une hypolocomotion et un retard dans l'acquisition d'un conditionnement alimentaire opérant comparées aux WT.

Objectif de ma thèse

L'ensemble des données présentées précédemment permet de montrer que les processus qui sous-tendent les interactions sociales sont complexes. En effet, l'interaction sociale implique de nombreux processus cognitifs incluant aussi bien l'attention, la motivation que les émotions entre autres. L'interaction sociale peut être influencée par de nombreux neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, le GABA, le glutamate ou la sérotonine. L'acétylcholine, quant à elle, est un neurotransmetteur impliqué dans beaucoup de fonctions cognitives. Des études ont montré qu'il y avait des terminaisons cholinergiques au sein du cortex préfrontal. De plus, nous avons vu dans ce manuscrit la présence de récepteurs nicotiques et muscariniques dans le cortex préfrontal. L'utilisation du modèle de souris $\beta 2$ KO a permis de montrer l'implication des récepteurs nicotiques dans l'interaction sociale (Avalé et al., 2011). Même si le modèle de souris $\beta 2$ permet de montrer l'implication des récepteurs nicotiques, il ne nous permet pas de comprendre l'effet de la libération d'Ach dans l'interaction sociale. Le modèle présente bien une altération de la neurotransmission cholinergique (Coura et al., 2013) mais ne nous permet pas de comprendre l'impact d'une modulation fine et précise de l'Ach lors du comportement social.

Ainsi, l'objectif de ma thèse était de comprendre l'impact de la modulation de l'acétylcholine au sein du cortex préfrontal dans le comportement social.

Afin de réaliser ces objectifs, nous allons moduler la quantité d'acétylcholine au sein du cortex préfrontal par optogénétique chez des souris ChAT-IRES-Cre exprimant la Cre recombinase dans les neurones cholinergiques. Les ChAT-IRES-Cre sont des souris beaucoup utilisées pour comprendre le rôle de l'acétylcholine, mais peu d'études qui ont essayé de caractériser le phénotype social de ces souris existent.

Dans le but de valider notre méthodologie, nous avons dans un premier temps vérifié et caractérisé le phénotype social des souris ChAT-IRES-Cre. Cette étape permettait de savoir quelles étaient les altérations sociales des souris ChAT-IRES-Cre. Nous avons donc réalisé un test d'interaction sociale qui permet une interaction sociale libre avec enregistrement de la communication vocale par l'intermédiaire des USVs. Nous avons également mesuré la motivation sociale, les capacités sensorielles et le niveau d'anxiété, éléments très importants

dans l'interaction sociale. De plus, certaines études de la littérature montrent un vieillissement accéléré du système cholinergique. Donc nous avons aussi voulu tester si ces souris pouvaient être utilisées à un âge intermédiaire. Nous avons alors comparé le phénotype social des souris ChAT-IRES-Cre jeunes (2-3 mois) et des souris ChAT-IRES-Cre d'âge intermédiaire (11-12 mois) par rapport à des WT de même âge que les ChAT-IRES-Cre. Le dernier objectif de cette première étape de validation était de mesurer et de quantifier l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'Ach dans le striatum dorsal. Le striatum dorsal est une structure riche en interneurons cholinergiques qui est impliquée dans les comportements motivationnels, élément également important lors de l'interaction sociale. Les résultats montrent que la souris ChAT-IRES-Cre présente un comportement social et un état émotionnel normal. De plus, le vieillissement des souris ChAT-IRES-Cre n'est pas différent des WT et l'âge provoque une diminution de la dominance. Nous avons aussi montré une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'Ach. L'ensemble de cette première étape de validation a fait l'objet d'une publication scientifique qui est actuellement en révision.

Dans un deuxième temps, après avoir caractérisé notre modèle de souris ChAT-IRES-Cre et vérifié qu'elles ne présentaient pas de troubles sociaux, nous avons vérifié que nous obtenions bien une libération et un blocage de l'Ach lors d'une modulation de l'Ach par optogénétique. Pour ce faire, nous avons réalisé un test c-Fos. Ce test permet de mesurer l'activité cellulaire après 1h30. Notre hypothèse était que la libération ou le blocage de l'Ach devait perturber l'activité du c-Fos. Pour ce faire, nous avons décidé de stimuler uniquement le cortex prélimbique droit, le cortex prélimbique gauche nous servait de contrôle. Les résultats n'ont pas permis de voir de différence d'expression du c-Fos entre le cortex prélimbique droit et le gauche. Suite à ce résultat nous avons décidé d'utiliser une autre méthode afin de vérifier la stimulation optogénétique, la microdialyse. Cette méthode consiste, par l'intermédiaire d'une sonde de microdialyse, à collecter le milieu extracellulaire du cerveau. Les résultats nous ont permis de conclure que notre méthode optogénétique était fonctionnelle.

Après avoir vérifié que les souris ChAT-IRES-Cre pouvaient être utilisables dans l'étude des comportements sociaux et après avoir validé que notre méthode optogénétique était opérationnelle, nous avons étudié les conséquences de la libération ou du blocage de l'Ach dans l'interaction sociale qui est un test où les souris peuvent interagir librement. Dans le test,

le choix de l'animal est incertain et risqué car il ne peut prévoir la réaction de son congénère. L'animal doit donc avoir un comportement flexible afin de s'adapter en réponse à son congénère. Durant la tâche d'interaction sociale, les USVs seront également enregistrées car elles sont un marqueur émotionnel chez l'animal (Chabout et al., 2012). De plus, nous allons aussi regarder l'effet de la modulation d'Ach dans un test de trois chambres. Dans ce test, une souris sera coincée sous un pot et ne pourra donc pas interagir librement. Le choix de l'animal libre dépendra alors uniquement de sa propre motivation. Dans ce test nous allons ainsi observer si la libération ou le blocage de l'Ach perturbe la motivation de la souris libre pour aller voir son congénère.

Matériel et Méthode

Résultats

1. Chapitre premier caractérisation des ChAT-IRES-Cre

L'ensemble des données présentées dans ce chapitre a fait l'objet d'une soumission à PLOS ONE le 10-03-2022. Une demande de révision a été faite le 11 avril 2022. Il est actuellement en cours de révision.

PLOS ONE

Characterization of social behavior in young and middle-aged ChAT-IRES-Cre mouse --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Characterization of social behavior in young and middle-aged ChAT-IRES-Cre mouse
Short Title:	Social characterization of ChAT-IRES-Cre mouse
Corresponding Author:	cyril lhopitalier, phd UMR9197: Institut des Neurosciences Paris-Saclay Saclay, FRANCE
Keywords:	ChAT-IRES-Cre mouse; acetylcholine; Social interactions; aging
Abstract:	The cholinergic system is an important modulator of brain processes. It contributes to the regulation of several cognitive functions and emotional states, hence altering behaviors. Previous works showed that cholinergic (nicotinic) receptors of the prefrontal cortex are needed for adapted social behaviors. However, these data were obtained in mutant mice that also present alterations of several neurotransmitter systems, in addition to the cholinergic system. ChAT-IRES-Cre mice, that express the Cre recombinase specifically in cholinergic neurons, are useful tools to investigate the role of the cholinergic circuits in behavior. However, their own behavioral phenotype has not yet been fully characterized, in particular social behavior. In addition, the consequences of aging on the cholinergic system of ChAT-IRES-Cre mice has never been studied, despite the fact that aging is known to compromise the cholinergic system efficiency. The aim of the current study was thus to characterize the social phenotype of ChAT-IRES-Cre mice both at young (2-3 months) and middle (10-11 months) ages. Our results reveal an alteration of the cholinergic system, evidenced by a decrease of ChAT, CHT and VAcHT gene expression in the striatum of the mice, that was accompanied by mild social disturbances and a tendency towards anxiety. Aging decreased social dominance, without being amplified by the cholinergic alterations. Altogether, this study shows that ChAT-IRES-Cre mice are useful models for studying the cholinergic system's role in social behavior using optogenetic tools.
Order of Authors:	Cyril Lhopitalier Charlotte Perrault Frédéric Chauveau Francoise Saurini Sylvie Berrard Sylvie Granon Faure Alexis
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the submission guidelines for detailed requirements. View published research articles from PLOS ONE for specific examples.	The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Les souris ChAT-IRES-Cre sont beaucoup utilisées pour étudier le rôle de l'Ach. Malgré une très grande utilisation de ces souris, peu d'études ont regardé leur phénotype social. Le but de cette étude est par conséquent d'étudier le phénotype social de ces souris. Pour cela, nous allons réaliser un test de trois chambres permettant de mesurer la motivation sociale de ces souris ainsi qu'un test d'interaction sociale pour mesurer les interactions sociales de l'animal dans un contexte de décision risquée et incertaine. L'olfaction est un sens très important chez le rongeur. Donc nous avons décidé de mesurer les capacités olfactives de l'animal en testant sa capacité à discriminer et à s'habituer à une odeur neutre, une odeur non sociale et une odeur sociale. Nous réaliserons aussi un test d'anxiété visuelle mesurant les réactions de l'animal face à un stimulus menaçant. L'olfaction et l'anxiété visuelle sont des paramètres très importants dans l'interaction sociale. Ces expériences comportementales permettent de définir le phénotype social. Nous nous sommes également intéressés à l'effet du vieillissement sur le système cholinergique chez des souris ChAT-IRES-Cre jeunes (2-3 mois) et d'âge moyen (11-12 mois) par rapport à des souris WT de même âge. Cette expérience nous permettrait de savoir jusqu'à quel âge ces souris peuvent être utilisées. Nous avons également réalisé des expériences de qPCR dans le striatum dorsal de ces souris. Ces expériences avaient pour objectif de vérifier si ces souris présentaient des altérations du système cholinergique. Ensemble, ce premier chapitre permet de mieux connaître le comportement social de ces souris et, par la suite, de savoir si ces souris présentent des troubles sociaux. La compréhension de ce phénotype nous permettra aussi de mieux interpréter nos résultats optogénétiques.

1.1. Matériel et méthode

1.1.1. Animaux

Les souris ChAT(IRES)-Cre, appelées ici souris ChAT-Cre, ont été initialement obtenues auprès du Jackson Laboratory (B6 ; 129S6Chattm2(Cre)Lowl/Lowl/J, <https://www.jax.org/strain/006410>, RRID:IMSR_JAX:006410), puis élevées par croisement homozygotes-homozygotes dans notre animalerie. Les souris C57BL/6J ont été soit obtenues auprès des Laboratoires Charles Rivers France (L'Arbresle Cedex, France) pour les souris d'âge moyen, soit élevées dans notre animalerie pour les souris jeunes.

Toutes les expériences ont été menées conformément à la réglementation locale en matière d'expérimentation animale ainsi qu'aux recommandations émises par la directive européenne 2010/63/UE, le décret N 2013-118 du 1er février 2013 et le Comité national français (87/848). La référence du projet éthique était 2014-13.

Les souris mâles sont arrivées à l'animalerie à l'âge de huit semaines (obtenues auprès de Charles Rivers) ou après le sevrage (élevage à domicile), et ont été maintenues dans des cages collectives (3 à 4 souris par cage). Les animaux ont été maintenus dans des cages domestiques de 20,5 * 32,5 cm avec de l'eau et de la nourriture ad libitum et un cycle de lumière circadien de 12h de lumière / 12h d'obscurité (commençant à 8h). Les jeunes souris étaient âgées de 2-3 mois (n=8 souris ChAT-Cre et 8 souris WT) et les souris d'âge moyen de 11-12 mois (n=7 souris ChAT-Cre et 8 souris WT). Sur la **Figure 30**, les animaux ont été notés WT jeune, ChAT-Cre jeune, WT M.A. (âge moyen), ChAT-Cre M.A. (âge moyen). Toutes les souris testées ont été isolées en cage individuelle de 3 à 4 semaines avant les expériences sociales. Les souris utilisées comme animaux visiteurs pour les expériences sociales (souris WT jeunes (n=6) et souris WT âge moyen (n=6) sont quant à elles maintenues en cage social (voir protocole)).

La **Figure 30** montre la chronologie de nos expériences. Soit, les souris étaient âgées de deux mois avant le commencement de l'isolement social. Après 3 semaines d'isolement, la tâche d'interaction sociale était réalisée. Une semaine après cette tâche, le test des 3 chambres qui contrôle la motivation sociale était réalisé. Afin de vérifier la présence ou non d'un déficit sensoriel de nos animaux ChAT-IRES-Cre, nous avons réalisé une tâche de perception visuelle 35 jours après le début de l'expérience. Finalement, une semaine après l'expérience visuelle, un test olfactif a été réalisé. À la fin des expériences, nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acétylcholine au sein du striatum dorsal qui contient des interneurons cholinergiques.

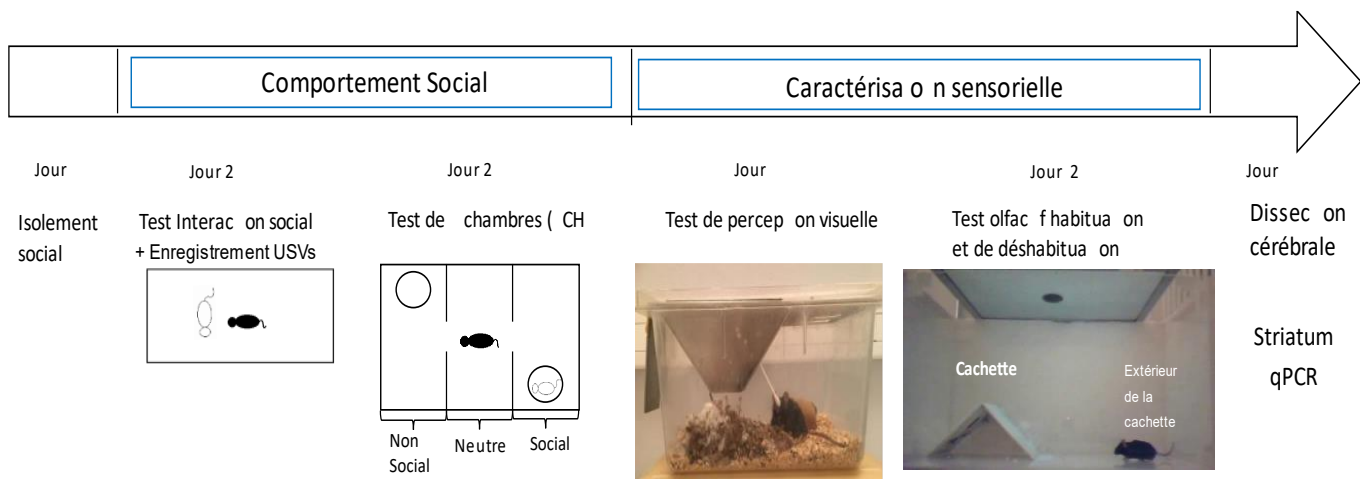


Figure 30. Chronologie de nos expériences Dans le test d'interaction sociale et le test des 3 chambres, la souris noire représente la souris hôte et la blanche représente la souris visiteuse. La souris hôte est celle qui a été isolée alors que la souris visiteuse a vécu en cage sociale

1.1.2. Le test des trois chambres

L'arène utilisée pour nos expériences était une boîte rectangulaire en plexiglass mesurant 64*42 cm divisé en 3 compartiments de surface égale (un schéma du dispositif est représenté dans la **Figure 30**). Sur les 2 compartiments opposés, nous plaçons 2 pots en plexiglass transparent (diamètre 9,2 cm et hauteur 10,2 cm) contenant 30 trous. La lumière diffuse était de 100 lux. Au début de l'expérience, l'animal (souris hôte) était placé dans le centre de l'arène et pouvait explorer de manière libre son environnement durant 15 min. Après cette période d'habituation, un autre animal (souris visiteuse non familière de même âge et de même sexe) était placé sous un pot en plexiglass. L'animal visiteur ne pouvait bouger librement, mais il pouvait mettre son nez dans les trous du pot et toucher la souris hôte. La chambre qui contenait le visiteur coincé sous le pot était appelée zone sociale, alors que la chambre contenant le pot vide était appelée zone non sociale. La chambre entre les deux était appelée zone intermédiaire (**Figure 30**). La localisation des souris visiteuses était contrebalancée entre chaque expérience. Le comportement de la souris hôte était mesuré durant 8 minutes par une webcam connectée au logiciel ANY-maze. Les paramètres comportementaux analysés après les expériences étaient les suivants : la vitesse totale parcourue, la durée d'immobilité totale, la vitesse maximum totale. Le temps passé, la durée d'immobilité et la distance parcourue dans chaque chambre ainsi que le temps de contact avec un congénère.

1.1.3. Test d'interaction sociale (IS)

L'arène utilisée lors du test d'interaction sociale était une arène rectangulaire transparente en plexiglass (L 50 cm * l 25 cm * h 30 cm). L'expérience se déroulait dans une pièce calme éclairée autour de 100 lux. L'animal isolé appelé « souris hôte » était introduit dans la cage pour 30 min d'habituation. Après ces 30 minutes d'habituation, on introduit une nouvelle souris dans la cage d'IS, cette dernière étant appelée « souris visiteuse ». Les comportements ont été mesurés durant 8 minutes avec une caméra vidéo numérique. Durant ce test, les animaux peuvent établir des interactions libres et réciproques et devront prendre des décisions ainsi que s'adapter aux congénères. De plus, le choix de l'animal est beaucoup plus risqué que dans le test des trois chambres car l'animal ne peut prédire la réaction de l'autre animal. Le comportement des souris est analysé après l'expérience avec le logiciel Solomon Coder (version bêta 19. 08. 02) développé par A. Peter. Durant ce test nous distinguons de multiples catégories de comportements sociaux :

Les comportements affiliatifs : ces comportements sont le nombre et la durée de contact initié par la souris hôte ou la souris visiteuse, comme par exemple lorsque l'animal va toucher une partie du corps de l'autre animal.

Les comportements de dominance : ces comportements expriment le nombre et la durée des poursuites de l'hôte ou de la souris visiteuse. D'autres paramètres de dominance sont également mesurés comme les « contrôles de la patte », ce qui réfère au nombre de fois où l'animal hôte a posé ses pattes avant sur la tête ou le dos du visiteur.

Les comportements d'échappements : Le nombre et la durée d'échappement sont scorés chaque fois que la souris hôte ou la souris visiteuse interrompent le contact.

Les comportements exploratoires : Le nombre de redressement est scoré et sont un marqueur du comportement exploratoire de l'autre animal.

Les comportements agressifs : ils sont mesurés par le nombre de morsures et la latence d'attaque.

1.1.4. L'enregistrement des vocalisations ultrasoniques (USVs)

Les USVs sont enregistrées durant les 8 minutes de l'interaction sociale. Un microphone ultrasonore à condensateur Polaroid/COMPA a été placé au-dessus de la chambre expérimentale, suffisamment haut pour que l'angle de réception du microphone couvre toute la zone expérimentale. Le microphone était relié à une interface d'enregistrement ultrasonore Ultrasound Gate 416H, qui était branchée sur un ordinateur équipé du logiciel d'enregistrement Avisoft Recorder USG (Fréquence d'échantillonnage : 250 kHz, longueur FFT : 1024 points, 16 bits). Tous les matériels et logiciels d'enregistrement ont été fournis par Avisoft Bioacoustics H (Berlin, Allemagne). Les USVs ont été analysées après manipulation avec le logiciel SASLab Pro (Avisoft Bioacoustic H, Berlin, Allemagne). Lors de l'analyse des USVs, les spectrogrammes ont été générés pour chaque appel détecté (fréquence d'échantillonnage : 250 kHz, longueur de la FFT : 1024 points, 16 bits, fenêtre Blackman, chevauchement: 87,5 %, résolution temporelle : 0,512 ms, résolution en fréquence : 244 Hz). Les USVs ont ensuite été classées selon les 11 catégories distinctes basées sur leur durée et leur modulation de fréquence pendant toute la tâche d'interaction sociale : S : court, F : plat, OFJ : saut de fréquence simple, MFJ : saut de fréquence multiple, U : en forme de U, C : Chevron , M : modulé, W : composite, H : ascendant, D : descendant et UND : non défini (22). Le calcul des pourcentages du répertoire prenait en compte uniquement les animaux de chaque groupe émettant des vocalisations. Les USVs d'une souris ChAT-IRES-Cre d'âge moyen et d'une jeune souris WT ont été rejetées en raison de problèmes techniques.

1.1.5. Test de perception visuelle : réponse défensive face à un stimulus menaçant

Ce protocole a été décrit par (Yilmaz and Meister, 2013). Le but de ce test est d'évaluer la capacité visuelle des souris en utilisant des réactions écologiques de défense face à un stimulus visuel imitant la présence d'un prédateur qui apparaît en haut de la cage d'expérimentation. Le dispositif expérimental consiste en une cage de plexiglass (L 50 cm * l 25 * h30 cm) recouverte d'un écran d'ordinateur et contenant un abri en carton sur l'un des côtés de la cage. L'animal a été habitué à son environnement pendant 10 min, après quoi le « stimulus menaçant » apparaissait. Le stimulus menaçant consistait en la présentation, sur un écran d'ordinateur gris, d'un disque noir qui apparaît directement au-dessus de la tête de

l'animal avec un diamètre de 2° d'angle visuel et qui s'agrandit à 20° en 250 ms. Il restera à cette taille durant 250 ms. Le stimulus a été répété 15 fois avec des pauses de 500 ms et a duré au total 15 secondes. L'habituation et la réaction au stimulus ont été enregistrées par une caméra (logitech) placée à 40 cm en face de la cage avec, pendant toute l'expérience, une lumière réglée à 100 lux. Les mesures réalisées durant l'expérience sont le temps de latence pour la première réaction au stimulus menaçant ainsi que le pourcentage de réaction défensive « freezing » durant le stimulus menaçant. Toutes les souris étant dans la cachette lors de la présentation du stimulus menaçant ont été exclues de l'analyse car nous ne pouvions être sûrs qu'elles aient réellement perçu le stimulus et par conséquent, nous ne pouvions déterminer leur réaction face au stimulus menaçant. Trois souris ChAT-IRES-Cre d'âge moyen et une souris WT jeune ont été exclues pour ces raisons (voir **Figure 30** pour set up expérimental).

1.1.6. Test olfactif d'habituation/déshabituaton

Le protocole utilisé est adapté de (Yang and Crawley, 2009). Cette tâche permet de tester si la souris est capable de discriminer différentes odeurs, parmi lesquelles nous avons une odeur sociale et une odeur non sociale. Trois odeurs ont été présentées durant ce test : une odeur neutre (eau), une odeur non sociale (amande, Vahiné®) diluée au 1/100 dans de l'eau distillée et une odeur sociale. L'odeur sociale a été obtenue à partir de deux cages contenant des souris du même sexe en tamponnant des cotons au fond des cages. Toutes les odeurs étaient présentées sur des cotons-tiges et étaient préparées fraîchement chaque jour. Les souris étaient testées dans leur cage de vie dans une pièce expérimentale non familière. Un coton-tige propre était placé 30 min à travers les grilles de la cage afin que l'animal puisse le renifler. Cette étape permettait l'habituation à un nouvel objet. Puis les odeurs sont présentées de manière séquentielle sur un nouveau coton tige à chaque fois dans l'ordre suivant : eau, amande, odeur sociale. Chaque odeur est présentée 3 fois durant 2 minutes avec une pause d'1 minute entre chaque présentation. Le temps de reniflage de l'odeur était enregistré à chaque fois (voir **Figure 30**). L'habituation était mesurée en comparant le résultat des 3 expositions de la même odeur. Si on trouvait une différence significative, nous considérons que la souris s'habitue à cette odeur. La mesure de déshabituaton consistait en une différence significative entre la troisième présentation d'une odeur et la première présentation d'une nouvelle odeur.

1.1.7. PCR quantitative à transcriptase inverse

L'ARN total des échantillons du striatum dorsal ont été prélevés, extraits et purifiés en utilisant un micro kit d'extraction d'ARN sur une colonne selon les instructions de la société (Macherey-Nagel, France) après homogénéisation dans le NucleoZOL™. La concentration d'ARN est quantifiée par spectrophotométrie (Nanodrop™, Thermofisher Scientific, MA, USA). La transcriptase reverse est réalisée à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant le kit de synthèse d'cADN iScript™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) pour 42 min à 42°C. La PCR quantitative en temps réel (qPCR) est réalisée dans un système de détection de la PCR en temps réel CFX384 (Biorad, Hercules, CA, USA). Les réactions de qPCR sont réalisées en triplicate pour 5 ng d'ADNc en utilisant comme super mix du SYBR Green Bio-Rad) dans un volume total de 10 µL, suivant les deux suivantes dénaturations initiales répétées plusieurs fois. On a d'abord une dénaturation initiale (30 s à 98°C) et puis 45 cycles de 8 s à 95°C (dénaturation) et 20 s à 60°C (élongation). Les contrôles négatifs (eau ou contrôle de la transcriptase inverse réalisés sans transcriptase inverse au lieu de l'ADNc) sont inclus dans chaque étape de la PCR. La spécificité de l'amplification a été évaluée par l'analyse de la courbe de fusion. Les paires d'amorces suivantes ont été conçues à l'aide des logiciels Primer3 plus ou Primer blast et ont été choisies sur différents exons, sauf pour le VACHT, qui ne contient pas d'introns chez les mammifères (Bejanin et al., 1994 ; Erickson et al., 1994). Pour la ChAT (85 pb) brins sens 5'-CCAGCTAAGGTTTGCAGCCA-3' et brins reverse 5'-CCAGTCAGTGGGAATGGATTG-3'. Pour la ChT (143 pb), brins sens 5'-CTTTTGCCTGTACATCCT-3' et brins reverse 5'-TCCACCCAGCATCAATAACA-3'. Pour VACHT (142 bp), brins sens 5'-TCATGTTTCGCTCCACAGTC-3' et brins reverse 5'-AGGCTCCTCGGGATACTTGT-3'. Et pour le gène de référence *Rpl13a* (146 pb), brins sens 5'-ACAGCCACTCTGGAGGAGAA-3' (forward) et brins antisens 5'-GAGTCCGTTGGTCTTGAGGA-3' (reverse). L'efficacité de chaque paire de primer était entre 95 et 105%. L'expression de chaque gène d'intérêt est normalisée à celle du gène de référence Rpl13, puis ce gène a été évalué dans la même série de PCR et calculé en utilisant la méthode du Ct comparatif ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Les données sont présentées en tant qu'abondance relative de l'ARNm du transcrit par rapport aux jeunes souris WT.

1.1.8. Analyse statistique

L'analyse non paramétrique est réalisée en utilisant le logiciel R (version 3.5.0 de la fondation R pour le calcul statistique avec le package Rcmdr). Comme une partie de nos données expérimentales ne suivent pas une distribution normale, nous utilisons le test de Kruskal-Wallis χ^2 pour comparer tous les groupes (noté « H » dans la partie résultat du Chapitre 1) ainsi qu'un test de la somme de rang de Wilcoxon (notée « W » dans la partie Résultats) quand nous comparons deux groupes indépendants. L'expression des gènes est elle analysée en utilisant l'analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs d'âge et de génotype (logiciel Graphpad Prism 8, San Diego, CA). La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$. L'analyse en composante principale (PCA) était réalisée en utilisant le package Factomine R. Les données manquantes ont été remplacées par la moyenne du groupe pour ce paramètre.

1.2. Résultat des ChAT-IRES-Cre

1.2.1. Motivation sociale dans le test de trois chambres

Le test de trois chambres permet l'évaluation de la motivation sociale chez la souris. Le schéma de l'expérience est montré dans la **Figure 31 A**. Dans ce test, les souris ChAT-IRES-Cre parcourent significativement moins de distance que les animaux WT (effet du groupe : $H=16.63$, $df=3$, $p<0.001$; effet du génotype : $W=32$, $p<0.001$) et il n'y a aucun effet de l'âge (effet de l'âge : $W=99$, NS) (**Figure 31 B**). De plus, les souris ChAT-IRES-Cre sont significativement plus immobiles que les animaux WT ($H=18.304$, $df=3$, $p<0.001$; effet du génotype : $W=177$, $p<0.05$) et l'âge n'a pas d'effet sur la durée d'immobilité ($W=129$, all NS) (**Figure 31 C**). De plus, on observe une corrélation négative entre la distance parcourue et le temps d'immobilité ($S=7690$, $p<0.01$, **Figure 32**) et les groupes ne sont pas significativement différents en termes de vitesse maximale ($H=3.81$, $df=3$, NS) (**Figure 31 D**), ce qui suggère que la faible distance parcourue par les souris ChAT-IRES-Cre comparée aux contrôles ne peut pas être expliquée par une altération motrice globale mais plutôt par une augmentation du temps d'immobilité. Seulement les souris ChAT-IRES-Cre jeunes montrent une réduction significative de la distance parcourue, avec une augmentation de l'immobilité comparées aux WT jeunes (ChAT-IRES-Cre jeunes vs. WT jeunes, effet sur la distance parcourue : $W=2$, $p<0.001$, et pour le temps d'immobilité : $W=52$, $p<0.05$), en comparaison avec les souris d'âge moyen (ChAT-

IRES-Cre M.A vs. WT M.A pour la distance : $W=17$, et pour le temps d'immobilité : $W=34$, NS) (**Figure 31 B-C**).

Dans le but d'évaluer la motivation sociale, nous distinguons chaque mesure prise dans le test des trois chambres. Les résultats montrent une motivation sociale normale dans tous les groupes, avec significativement une plus grande distance parcourue ($V=484$, $p<0.001$) (**Figure 31 F**), un temps d'immobilité plus important ($V=3$, $p<0.001$) (**Figure 31 G**) et un temps passé plus important ($V=1$, $p<0.01$) (**Figure 31 H**) dans la chambre sociale comparé à la chambre non sociale (**Figure 31 F-H**). De plus, tous les groupes passent un temps équivalent à interagir avec son congénère en réalisant, par exemple, des contacts nez-nez à travers les trous du pot en plexiglass ($H= 3.43$, $df=3$, NS) (**Figure 31 E**).

Dans la chambre neutre, aucune différence significative existe entre les groupes en regardant la distance parcourue, le temps d'immobilité ou le temps passé (respectivement $H=4.26$, $df=3$, NS ; $H=7.60$, $df=3$, NS ; $H=3.02$, $df=3$, NS) (**Figure 31 F-H**).

Pour la chambre non sociale, les groupes sont différents significativement par le temps d'immobilité ($H=10.94$, $df=3$, $p<0.05$) (**Figure 31 G**), mais pas pour la distance parcourue ou le temps passé dans la chambre non sociale (respectivement $H=6.43$, $df=3$, NS ; $H=5.86$, $df=3$, NS) (**Figure 31 F-G**). Les souris ChAT-IRES-Cre sont significativement plus immobiles que les animaux WT (effet du génotype : $W=189$, $p<0,01$) et l'effet du génotype est restreint pour les animaux d'âge moyen (ChAT-Cre jeunes vs. WT jeunes : $W=42$, NS ; ChAT-Cre M.A vs. WT M.A : $W=54$, $p<0.01$) (**Figure 31 H**). L'âge n'a pas d'impact significatif sur les paramètres d'immobilité ($W=87$, NS).

Enfin, dans la chambre sociale, toutes les mesures comportementales diffèrent entre les groupes : la distance parcourue ($H=18.95$, $df=3$, $p<0.001$), le temps d'immobilité ($H=8.83$, $df=3$, $p<0.05$) et le temps passé dans la chambre ($H=8.22$, $df=3$, $p<0.05$) (**Figure 31 F-H**). Plus précisément, les souris ChAT-Cre parcourent significativement moins de distance dans la chambre sociale que les animaux WT, sans évolution avec l'âge (effet du génotype : $W=17$, $p<0.001$; effet de l'âge : $W=121$, NS) (**Figure 31 F**). En regardant le temps d'immobilité et le temps passé dans la chambre sociale, l'effet du groupe global n'est pas dû à l'effet du génotype ($W=112$, NS ; $W=82$, NS) ni à l'effet de l'âge ($W=145$, NS ; $W=152$, NS) (**Figure 31 F et H**).

Cependant, un examen plus approfondi montre que l'effet global peut être dû à une diminution significative du temps d'immobilité et du temps passé des souris ChAT-Cre d'âge moyen comparées aux souris WT age moyen (âge moyen : temps d'immobilité : $W=9$, $p<0.05$, temps : $W=3$, $p<0.001$, NS ; jeunes : temps d'immobilité : $W=48$, NS, temps : $W=37$, NS). De plus, aucune corrélation n'existe entre la distance parcourue et le temps d'immobilité dans la chambre sociale ($S=4608$)(Figure 32).

Ces données ensemble montrent que les souris ChAT-Cre jeunes témoignent d'une motivation sociale normale, qui se maintient à l'âge moyen. Cependant, les souris ChAT-Cre montrent une réduction globale de la distance parcourue liée à plus d'immobilité dans ce test.

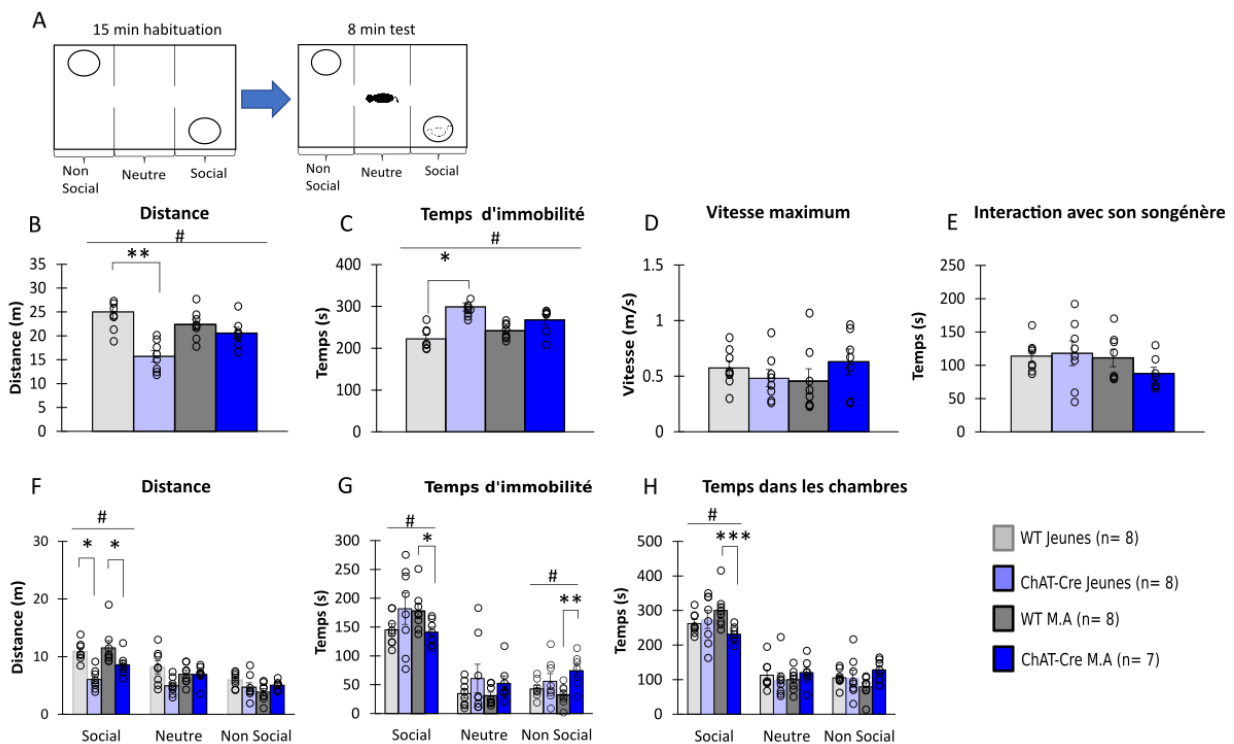


Figure 31. Comportements dans le test de trois chambres.A) Schéma expérimental. Les souris hôte utilisées pour ces expériences sont les WT jeunes ($n=8$), les ChAT-Cre jeunes ($n=8$), les WT d'âge moyen ($n=8$) et les ChAT-Cre d'âge moyen ($n=7$). Les visiteurs utilisés sont tous des WT de même âge et de même sexe que la souris hôte (jeune: $n=6$, âge moyen: $n=6$) maintenus en cage sociale. B) Distance parcourue. C) Temps d'immobilité. D) Vitesse maximum. E) Temps d'interaction avec un congénère. F) Distance parcourue dans chaque chambre. G) Immobilité dans les chambres. H) Temps passé dans les chambres. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

Corrélation entre le temps d'immobilité (en s) et la distance parcourue (en m)

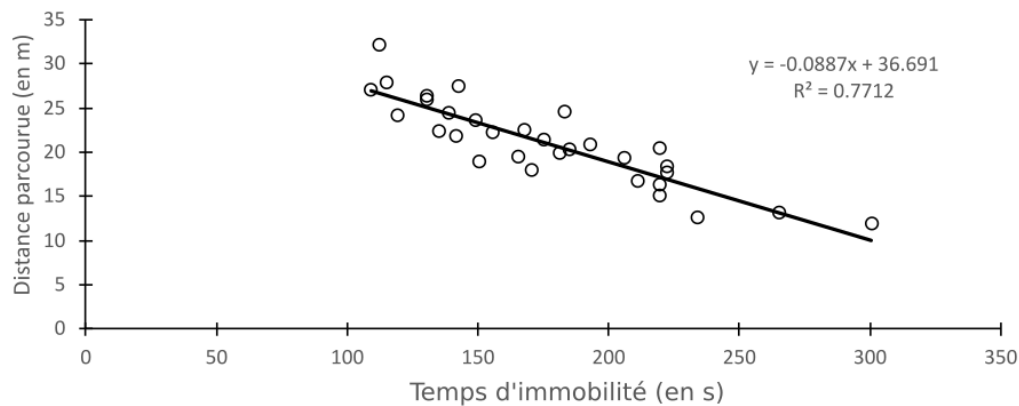


Figure 32. *Corrélation entre le temps d'immobilité et la distance parcourue dans le test de 3 chambres. Test de Spearman réalisé.*

1.2.2. Organisation du comportement social dans le test d'interaction sociale

Le test d'interaction sociale permet d'évaluer une interaction sociale libre dont le schéma expérimental est montré dans la **Figure 33 A** et **34 A**. Durant le test d'interaction sociale, les souris ChAT-Cre montrent des comportements affiliatifs normaux qui ne sont pas affectés par l'âge. Tous les groupes de souris ne montrent pas de différence pour le nombre de contact ni pour la durée de contact initié par l'animal hôte (respectivement $H=5.11$, $df=3$, NS ; $H=4.67$, $df=3$, NS)(**Figure 33 B et C**) ou par l'animal visiteur (respectivement $H=1.66$, $df=3$, NS; $H=5.86$, $df=3$, NS)(**Figure 33 D et E**).

Nous avons précédemment montré que les comportements dans l'IS sont des points de choix qui ouvrent vers de multiples comportements (de Chaumont et al., 2012 ; Nosjean et al., 2015). L'âge ou le génotype n'a pas d'impact sur la durée des stops ($H=4.46$, $df=3$, NS)(**Figure 33 F**). Cependant, les groupes diffèrent dans la durée des stops ($H=9.50$, $df=3$, $p<0.05$)(**Figure 33 G**). En effet, les ChAT-Cre font des stops significativement plus longs que les animaux WT (effet du génotype : $W=185$, $p<0.05$). Il n'y a pas d'impact de l'âge (effet de l'âge : $W=115$, NS)(**Figure 33 G**). Cependant, l'effet du génotype est significatif seulement pour les ChAT-Cre d'âge moyen (ChAT-Cre jeunes vs. WT jeunes : $W=39$, NS; ChAT-Cre M.A vs. WT

M.A : $W=54$, $p<0.01$)(**Figure 33 G**), probablement en raison d'une variabilité importante au sein du groupe de souris ChAT-Cre jeunes. L'effet de l'âge ou l'effet du génotype n'ont pas modifié de manière significative les redressements, qui sont un marqueur des comportements exploratoires ($H=5.73$, $df=3$, NS)(**Figure 33 H**).

Même si le nombre de poursuites de l'animal hôte est équivalent dans tous les groupes ($H=6.23$, $df=3$, NS)(**Figure 34 B**), la durée de ces poursuites est significativement différente entre ces groupes ($H=10.60$, $df=3$, $p<0.05$)(**Figure 34 C**). En comparaison avec les animaux jeunes, les souris âgées montrent une diminution de la durée des poursuites, indépendamment du génotype (effet de l'âge : $W=199$, $p<0,01$; effet du génotype : $W=101.5$, NS)(**Figure 34 C**). Le nombre et la durée des poursuites réalisées par la souris visiteuse sont comparables dans tous les groupes (respectivement $H=0.93$, $df=3$, NS; $H=1.08$, $df=3$, NS)(**Figure 34 D et E**).

Nous pouvons observer que la dominance diminue avec l'âge et qu'en parallèle, elle augmente le nombre d'échappements de l'animal hôte. Bien que les animaux hôte n'ont pas de différence significative pour le nombre d'échappements entre les groupes ($H=7.33$, $df=3$, NS), les souris d'âge moyen montrent un plus grand nombre d'échappements que les souris jeunes (effet de l'âge : $W=64.5$, $p<0.05$) sans effet au niveau du génotype ($W=143$, NS)(**Figure 34 F**). L'effet de l'âge sur le nombre d'échappements de la souris hôte est restreint aux animaux WT (effet de l'âge chez les WT : $W=10.5$, $p<0,05$; effet de l'âge chez les ChAT-Cre : $W=19.5$, NS)(**Figure 34 F**). Les comportements d'échappement par la souris visiteuse ne diffèrent pas entre les groupes ($H=2.40$, $df=3$, NS)(**Figure 34 F**). Également, aucune différence n'existe pour le nombre de "paw control" entre les groupes ($H=2.34$, $df=3$, NS)(**Figure 34 H**). La diminution de la dominance observée chez les souris d'âge moyen est de la même manière observée pour les comportements agressifs (**Figure 34 I**). Il n'existe aucun effet du groupe ou du génotype (effet du groupe : $H=8.87$, $df=3$, NS; effet du génotype : $W=77.5$, NS) pourtant on observe un effet significatif de l'âge ($W=165.5$, $p=0.051$, données non montrées). Cette différence peut

être expliquée par une réduction du comportement agressif seulement chez les animaux WT (effet d'âge chez les WT : $W=52.5$, $p<0.05$; effet de l'âge chez les ChAT-Cre : $W=33.5$, NS).

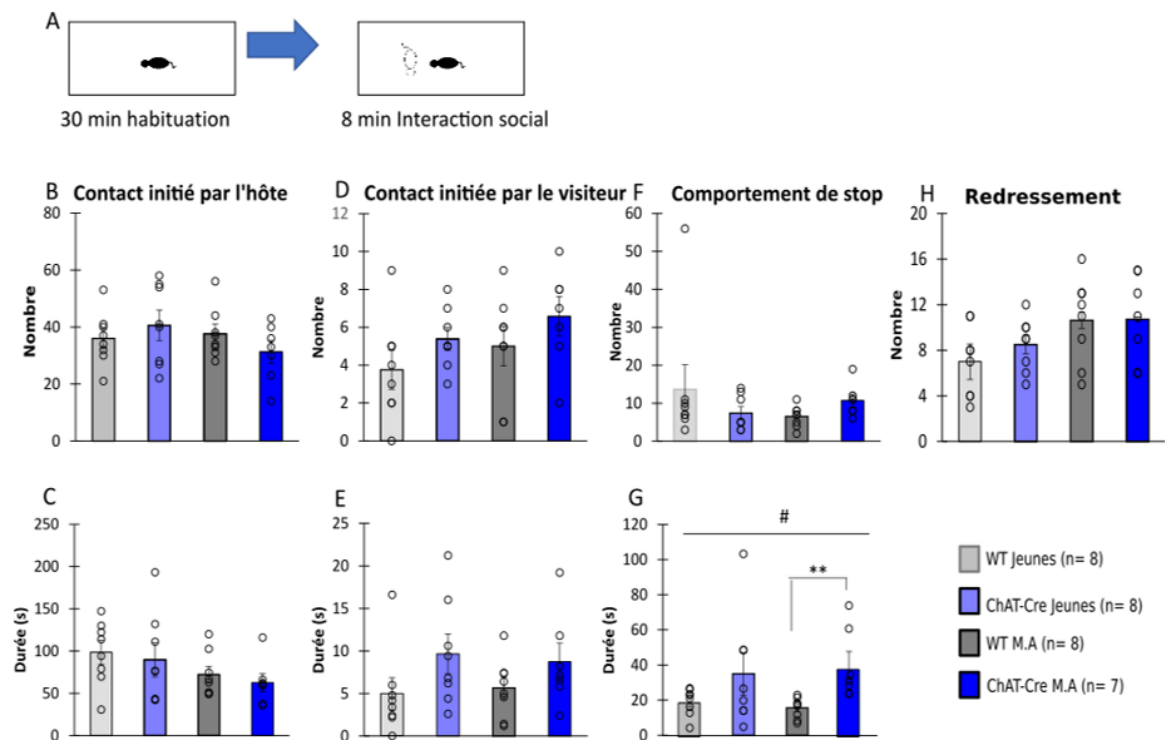


Figure 33: Comportements de contact, stop et d'exploration dans l'interaction sociale. A) Schéma expérimental de l'interaction sociale. B) Nombre de contacts initiés par la souris hôte. C) Durée de contacts initiés par la souris hôte. D) Nombre de contacts initiés par la souris visiteuse. E) Durée de contacts initiés par la souris visiteuse. F) Nombre d'épisodes de stops. G) Durée d'épisodes de stops. H) Nombre de redressements réalisés par la souris hôte. La souris hôte a été précédemment isolée pendant trois semaines puis exposée à un nouvel environnement pendant 30 minutes avant d'être présentée à une souris visiteuse. Groupes expérimentaux: WT jeunes ($n=8$), ChAT-Cre jeunes ($n=8$), WT d'âge moyen ($n=8$), ChAT-Cre d'âge moyen ($n=7$). Les souris visiteuses, jeunes ($n=6$) et d'âge moyen ($n=6$), sont des WT de même âge et de même sexe maintenues en cage sociale avant l'expérience. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

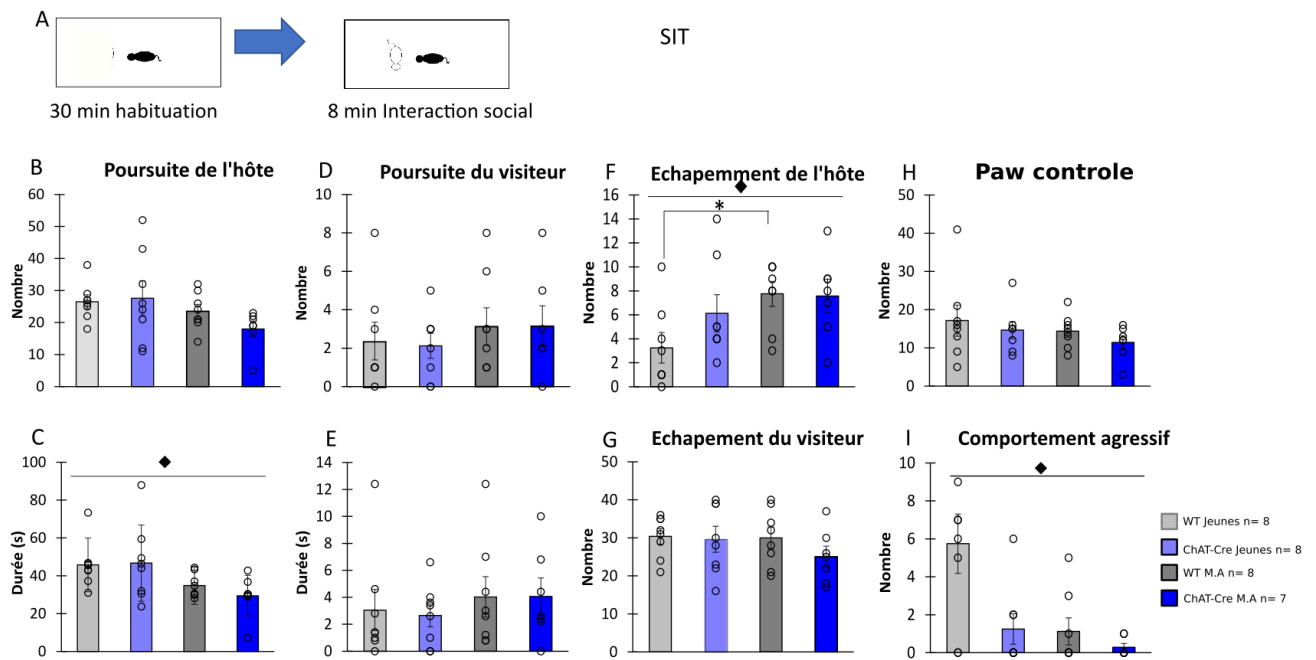


Figure 34. Comportement dans l'interaction sociale A) Schéma expérimental de l'interaction sociale. B) Nombre de poursuites émises par la souris hôte. C) Durée d'épisodes de poursuites (par exemple, poursuite avec contact oral-génital) fait par la souris hôte. D) Nombre d'épisodes de poursuites réalisés par la souris visiteuse. E) Durée d'épisode de poursuites émises par la souris visiteuse. F) Nombre d'échappements (par exemple, interruption de contacts) de la souris hôte. G) Nombre d'échappements de la souris visiteuse. H) Nombre de contrôles de la patte réalisés par la souris hôte (par exemple, nombre de fois où les souris hôtes posent leurs pattes avant sur la tête ou le dos des souris visiteuses). I) Nombre de comportements agressifs de la souris hôte. Groupes expérimentaux : WT jeunes (n=8), ChAT-Cre jeunes (n=8), WT d'âge moyen (n=8), ChAT-Cre d'âge moyen (n=7). Les souris visiteuses, jeunes (n=6) et d'âge moyen (n=6), sont des WT de même âge et de même sexe maintenues en cage sociale avant l'expérience. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

Les vocalisations ultrasoniques (USVs) sont enregistrées durant le IS. Les USV sont un marqueur émotionnel. Tous les groupes ne montrent pas de différence significative sur le nombre USV ($H=0.1034$, $df=3$, NS)(**Figure 35 A**), ni sur leur fréquence (fréquence maximale : $H=7.32$, $df=3$, NS)(**Figure 35 B**)(fréquence minimale : $H=4.22$, $df=3$, NS)(**Figure 35 C**). Nos données ne montrent aucune différence sur la durée moyenne d'une vocalisation ou sur la bande de fréquence (respectivement $H=7.54$, $df=3$, NS; $H=6.11$, $df=3$, NS ; données non montrées). Quand nous regardons le répertoire vocal (c'est-à-dire le pourcentage d'USVs émis par l'animal), aucune différence significative est trouvée entre les groupes (C : $H=2.77$, $df=5$, NS; D : $H=7.78$, $df=5$, NS; F : $H=4.5$, $df=5$, NS; H : $H=5.99$, $df=5$, NS ; M : $H=2.27$, $df=5$,

NS ; MFJ : H=6.7881, df = 5, NS; OFJ : H=6.68, df = 5, NS; S : H=6.18, df = 5, NS; U : H=4.03, df = 5, NS; UND : H=9.96, df = 5, NS; W : H=9.04, df = 5, NS)(**Figure 35 D**). L'âge et le génotype n'est pas affecté par le répertoire vocal de la souris.

Pris ensemble, ces résultats montrent que les ChAT-Cre diffèrent des WT seulement pour la durée des stops. De plus, les comportements de dominance et d'agressivité diminuent avec l'âge.

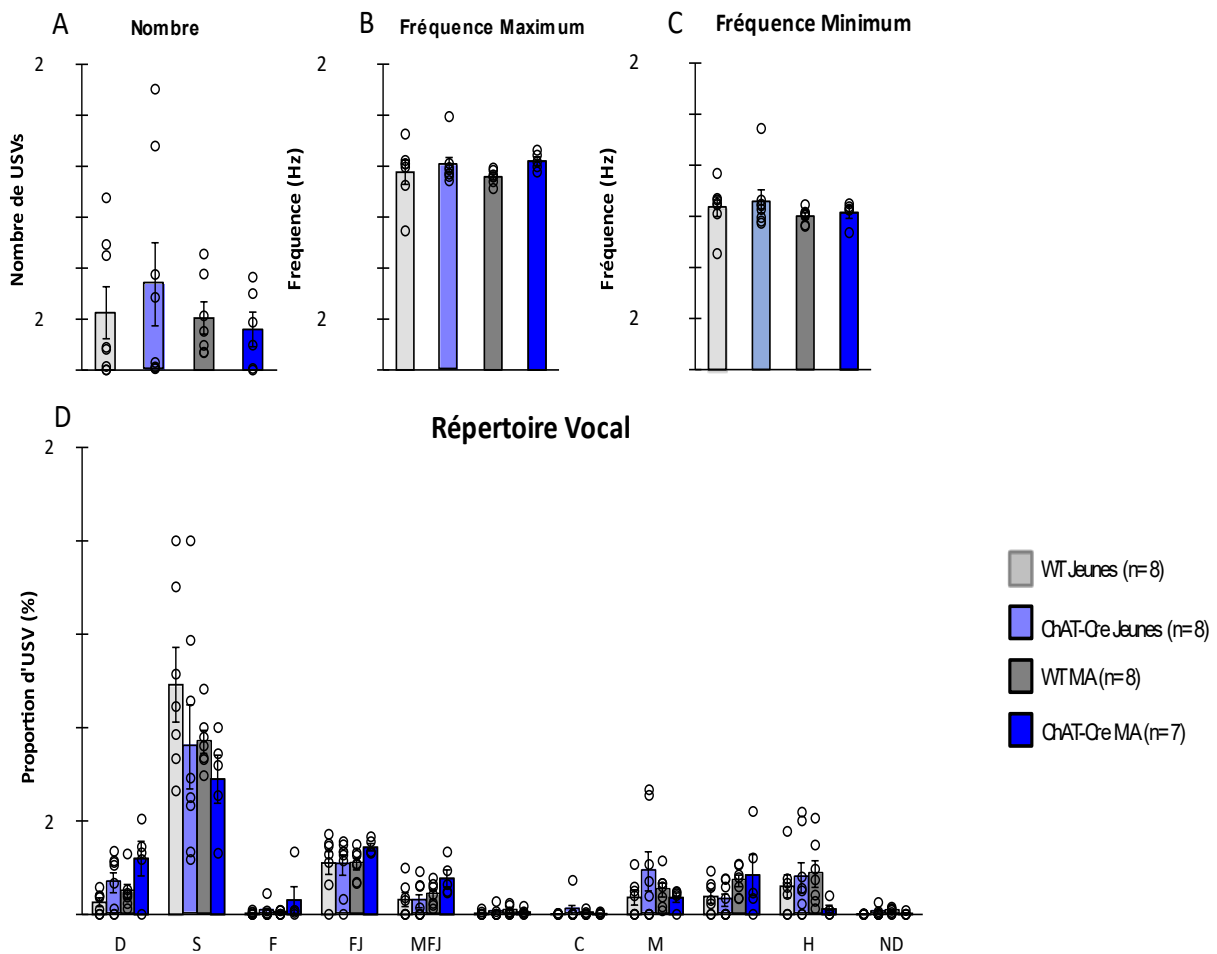


Figure 35. Vocalisations ultrasoniques (USVs) émises durant l'IS. A) Nombre d'USVs. B) Fréquence maximum d'USV. C) Fréquence minimum d'USV. D) Répertoire vocal de l'animal. Groupes expérimentaux : WT jeunes (n=8), ChAT-Cre jeunes (n=8), WT d'âge moyen (n=8), ChAT-Cre d'âge moyen (n=7). Les souris visiteuses utilisé (jeunes (n=6) et d'âge moyen (n=6)). Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

1.2.3. Réaction face aux stimuli visuels menaçants

Ce test permet d'évaluer si la souris perçoit le stimulus visuel. Le schéma expérimental est montré dans la **Figure 36 A**. La latence de la première réaction (Immobilisation ou fuite) après la présentation du stimulus menaçant n'est pas significativement différente entre les groupes ($H=6.92$, $df=3$, $p=0.074$)(**Figure 36 B**), probablement à cause d'une importante variabilité pour le groupe WT jeunes. Cependant, les animaux ChAT-Cre répondent significativement plus rapidement que les animaux WT ($W=36.5$, $p<0.01$) sans modification avec l'âge ($W=75.5$, NS)(**Figure 36 B**). Nous pouvons aussi observer que, même s'il n'existe pas de différence entre nos quatre groupes ($H=5.56$, $df=3$, NS) pour le pourcentage d'immobilisation durant le stimulus menaçant, les souris ChAT-Cre ont une tendance à augmenter le temps d'immobilisation ($W=169$, $p=0.054$) sans aucun impact sur l'âge ($W=128$, NS)(**Figure 36 C**). Les souris ChAT-Cre ont une tendance à surréagir aux stimuli menaçants.

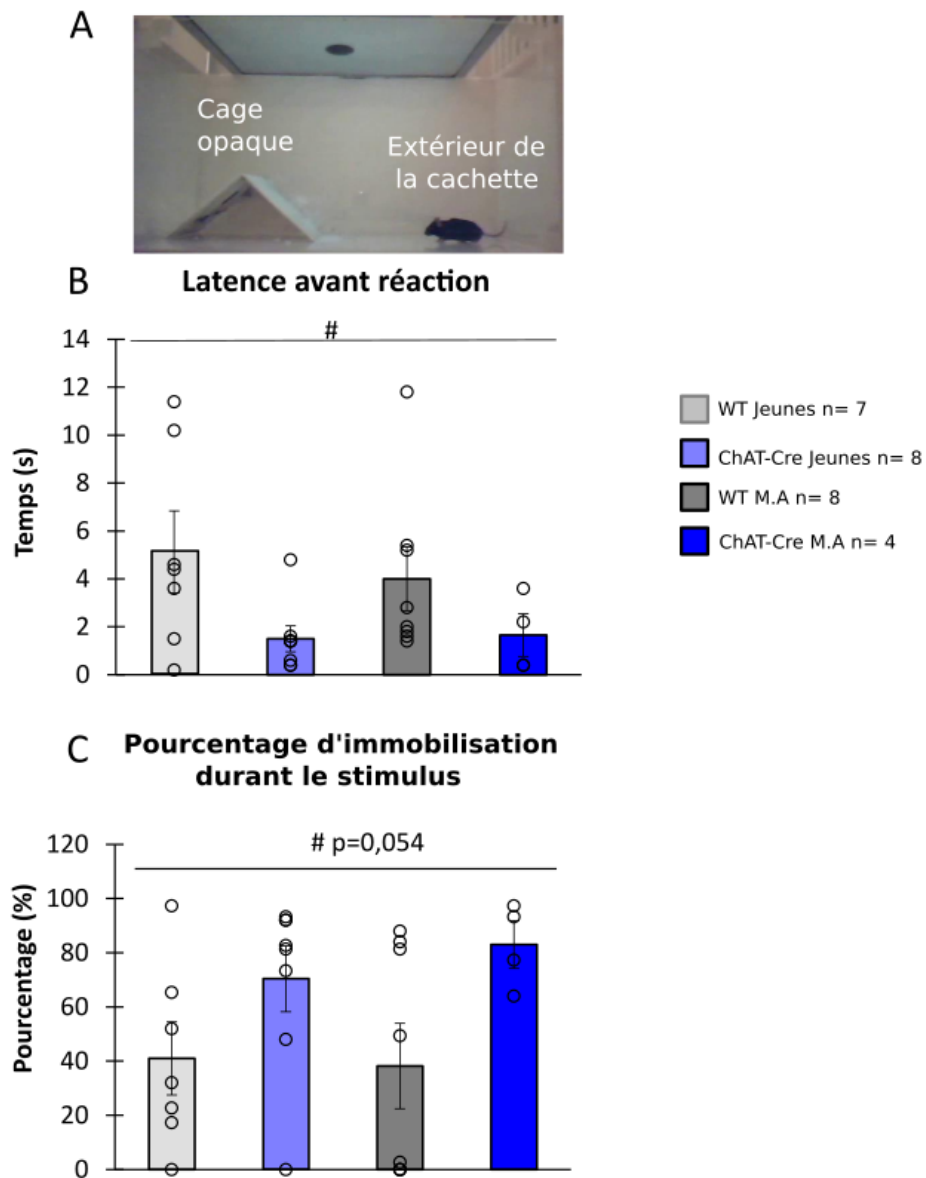


Figure 36. Réponse comportementale au stimulus menaçant. A) Schéma représentant l'expérience du looming. B) Latence avant réaction face au stimulus menaçant. C) Pourcentage du temps d'immobilisation. Dans cette expérience nous considérons les souris qui sont à l'extérieur de la cachette quand le stimulus menaçant apparaît. Groupes expérimentaux : WT jeunes ($n=7$), ChAT-Cre jeunes ($n=8$), WT d'âge moyen ($n=8$), ChAT-Cre d'âge moyen ($n=4$). Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$ # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

Capacité d'olfaction

Le test évalue si l'animal montre des problèmes olfactifs. Un schéma de cette expérience est montré dans la **Figure 37 A**. Après l'habituation à une nouvelle odeur, les capacités olfactives sont mesurées par la réaction à une nouvelle odeur (déshabituatation). Tous les groupes montrent que l'habituation à l'odeur eau montre une diminution significative du temps de reniflage durant les trois présentations de l'odeur eau (WT jeunes : Friedman Chi-squared=9, df=2, $p<0.05$; ChAT-Cre d'âge moyen : Friedman Chi-squared=13.56, df=2, $p<0.01$; ChAT-Cre jeunes : Friedman Chi-squared=11.81, df=2, $p<0.01$), sauf pour les WT d'âge moyen (Friedman Chi-squared=3, df=2, NS)(**Figure 37 B et C**). Seules les souris ChAT-Cre montrent une déshabituatation de l'odeur d'eau à l'odeur d'amande, avec une augmentation significative du temps de reniflage entre la présentation de la troisième odeur d'eau et la première présentation de l'odeur d'amande (jeunes : $V=0$, $p<0.05$; d'âge moyen : $V=3$, $p<0.05$). En revanche, le temps de reniflage des animaux WT n'est pas impacté par ce changement d'odeur (jeunes : $V=9$, NS; d'âge moyen : $V=25$, NS). L'effet d'habituation à l'odeur d'amande était globalement significatif entre tous les groupes (WT jeunes : Friedman Chi-squared=15.54, df=2, $p<0.001$; WT d'âge moyen : Friedman Chi-squared=10.75, df=2, $p<0.01$; ChAT-Cre jeunes : Friedman Chi-squared=7.75, df=2, $p<0.05$; ChAT-Cre d'âge moyen : Friedman Chi-squared=12.07, df=2, $p<0.01$)(**Figure 37 B**). Cependant, seuls les animaux WT montrent une déshabituatation entre la dernière présentation d'odeur d'amande et la première présentation d'odeur sociale (jeunes : $V=0$, $p<0.05$; d'âge moyen : $V=1$, $p<0.05$)(**Figure 37 B**) Les souris ChAT-Cre ne montrent pas de différence de temps de reniflage durant ce changement d'odeur (jeunes : $V=3$, NS; d'âge moyen : $V=1$, NS)(**Figure 37 C**).

Si les animaux WT se sont habitués à l'odeur sociale avec une diminution du temps de reniflage durant les trois présentations d'odeurs (d'âge moyen : Friedman Chi-squared=7.71, df=2, $p<0.05$; jeunes : Friedman Chi-squared=12.28, df=2, $p<0.01$)(**Figure 37 B et C**), ce qui n'est pas le cas pour les souris ChAT-Cre (jeunes : Friedman Chi-squared=2.33, df=2, NS; d'âge moyen : Friedman Chi-squared=1.18, df=2, NS). Le temps de reniflage durant la première exposition à l'odeur sociale est significativement différent entre les groupes ($H=10.685$, df=3, $p<0.5$). Ces résultats montrent un effet du génotype significatif ($W=23$, $p<0.01$) mais pas d'effet de l'âge ($W=86$, NS). Cependant, l'âge ne semble pas affecter directement les souris entre les

deux génotypes : les souris ChAT-Cre jeunes ne diffèrent pas des WT jeunes ($W=8$, $p=0.07$), mais les souris ChAT-Cre d'âge moyen diffèrent significativement des souris WT d'âge moyen ($W=4$, $p<0.05$).

On peut remarquer que les animaux WT d'âge moyen montrent une altération de l'accoutumance à l'eau, qui rend la déshabituaiton à l'odeur d'amande assez difficile à évaluer. Dans le but de mieux appréhender ces résultats, nous représentons sur la **Figure 37 D** le pourcentage d'animaux montrant une déshabituaiton. Nous pouvons clairement voir que plus de la moitié des WT jeunes ne réagissent pas à l'odeur d'amande. De même, pour l'odeur sociale, la déshabituaiton non significative pourrait être expliquée par le fait que la proportion d'animaux augmentant leur temps de reniflage vers l'odeur sociale était réduite dans le groupe ChAT-Cre d'âge moyen (**Figure 37 E**), où moins de 60% des souris ont réagi à l'odeur sociale. Le temps de reniflage des ChAT-Cre est significativement différent de la proportion théorique (100% des animaux réagissent à l'odeur sociale, test exact de Fisher : $p<0,05$). Par conséquent, nous pouvons conclure que les souris ChAT-Cre ont un problème olfactif dans la détection des odeurs sociales.

Ces résultats montrent que les souris WT ont présenté une déshabituaiton pour l'odeur sociale mais pas pour l'odeur d'amande. En revanche, les souris ChAT-Cre ont montré une déshabituaiton à l'odeur d'amande mais pas à l'odeur sociale. Cela confirme que les ChAT-Cre sont capables de réagir aux odeurs mais présentent une altération de la réaction aux odeurs sociales.

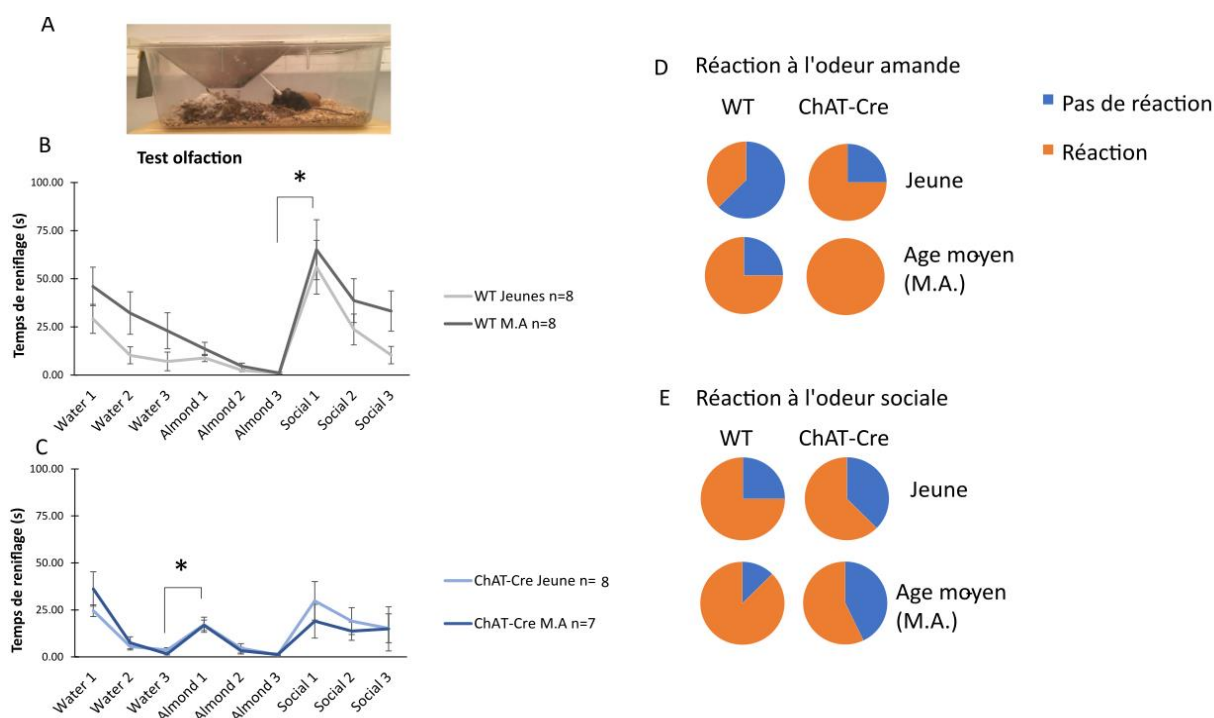


Figure 37. Résultats d'une tâche olfactive. Image de la présentation d'un coton tige dans la cage de vie de l'animal. B) Temps de reniflage du coton tige avec la présentation des odeurs successives chez les souris WT. C) Temps de reniflage du coton tige avec la présentation des odeurs successives chez les souris ChAT-Cre. D) Pourcentage de souris réagissant à l'odeur d'amande. E) Pourcentage de souris réagissant à l'odeur sociale. Groupes expérimentaux : WT jeunes (n=7), ChAT-Cre jeunes (n=8), WT d'âge moyen (n=8), ChAT-Cre d'âge moyen (n=4). Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

1.2.4. Expression des gènes impliqués dans la voie de la biosynthèse de l'Ach dans le striatum dorsal

Nous avons ensuite étudié l'expression des gènes nécessaires pour les fonctions présynaptiques cholinergiques. Les ARNm CHT, ChAT et VAcHT ont été analysés par RT-qPCR dans le striatum dorsal des souris jeunes et d'âge moyen. Une différence significative entre les groupes a été trouvée pour l'expression de ces trois gènes : respectivement CHT : $H=8.362$, $df=3$, $p < 0.05$; ChAT : $H=17.296$, $df=3$, $p < 0.001$; VAcHT : $H=13.873$, $df=3$, $p < 0.01$. Ces résultats montrent un effet du génotype (CHT : $W=36$, $p < 0.01$; ChAT : $W=19$, $p < 0.001$; VAcHT : $W=17$, $p < 0.001$) mais pas d'effet de l'âge (CHT : $W=120$, NS; ChAT : $W=129$, NS; VAcHT : $W=111$, NS)(Figure 38). Les souris ChAT-Cre jeunes et âgées affichent une diminution de 45 à 50% du

niveau de l'ARNm de CHT comparées aux souris WT jeunes et âgées respectivement. Cette réduction du taux d'ARNm de CHT est significative pour les souris jeunes (WT jeunes vs. ChAT-Cre jeunes : $W=8$, $p<0.01$) mais pas pour les souris d'âge moyen (WT M.A vs. ChAT-Cre M.A : $W=9$, NS)(**Figure 38 A**). Les niveaux d'ARNm du gène de la ChAT et de la VACHT sont plus bas chez les souris ChAT-Cre que chez les souris WT. Cette variation du génotype est identique pour les deux transcrits (par exemple, 70% pour les souris jeunes et 73% pour les souris âgées) et est significative quelque soit l'âge des souris (souris jeunes : ChT, WT vs souris ChAT-Cre : $W=0$, $p<0.01$; VACHT, WT vs ChAT-Cre : $W=0$, $p<0.01$; souris d'âge moyen : ChAT, WT vs ChAT-Cre: $W=4$, $p<0.05$) (**Figure 38 B**) (VACHT, WT vs ChAT-Cre : $W=4$, $p<0.05$) (**Figure 38 C**).

Ensemble, ces résultats témoignent d'une diminution de l'expression des gènes codant les marqueurs cholinergiques CHT, ChAT et VACHT chez les souris ChAT-Cre comparées aux WT.

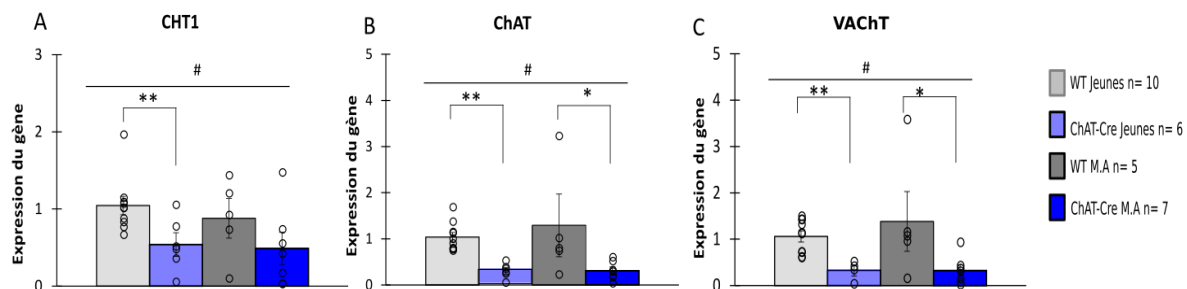


Figure 38. Analyse de l'expression des gènes CHT, ChAT et VACHT dans le striatum dorsal. Quantification de CHT-ARNm (A), ChAT-mRNAs (B) et VACHT-mRNAs (C) par RT-qPCR. Les niveaux d'ARNm sont présentés par rapport au groupe WT jeunes. Groupes expérimentaux: WT jeunes (n=10), ChAT-Cre jeunes (n=6), WT d'âge moyen (M.A.) (n=5), ChAT-Cre d'âge moyen (n=7). Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications: * = $p<0,05$, ** = $p<0,01$, *** = $p<0,001$, # = effet du génotype et de l'âge. Analyse par test des rangs de Kruskal-Wallis puis test de Wilcoxon.

1.2.5. Analyse en composante principale (ACP)

Notre but était de comprendre s'il y avait un lien entre les paramètres comportementaux et neurobiologiques dans les différents groupes de souris. Pour cela, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) sur les principaux paramètres de chaque test

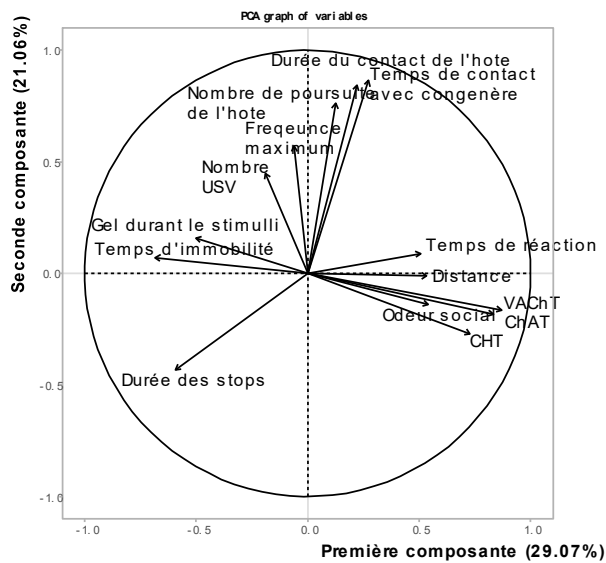
comportemental : nombre de poursuites réalisés par la souris hôte, nombre de vocalisations ultrasoniques, durée des stops et des contacts sociaux initiés par la souris hôte, le temps passé à interagir avec un congénère, la distance parcourue, la durée d'immobilité dans le test de 3 chambres, la latence pour réagir au stimulus menaçant, la proportion d'immobilisation durant la présentation du stimulus menaçant, le temps de reniflage durant l'odeur d'amande et l'odeur sociale et le niveau d'expression des gènes ChAT, CHT et VACHT. La carte factorielle des variables décrivant l'interaction entre ces paramètres (**Figure 39 A**) montre que deux composantes expliquent respectivement 29,07% et 21,06% de la variance. La description des composantes est détaillée dans le **Tableau 3**. L'expression des gènes VACHT, ChAT and CHT dans le dorsal striatum, l'odeur sociale, la distance ainsi que la latence pour réagir au stimulus menaçant sont positivement corrélés à la première composante (PC1). Cette composante est hétérogène et semble être due à l'altération mesurée chez les souris ChAT-Cre. Cette composante permet de séparer les souris WT des ChAT-Cre. La deuxième dimension (PC2) est clairement reliée à la dominance et au contact social, par exemple, au nombre d'épisodes de poursuites réalisées par la souris hôte ou au temps de contact. Cette composante représente les déficits sociaux liés à l'âge.

Fait important, cette analyse suggère que les altérations cholinergiques dans le striatum dorsal des animaux ChAT-Cre ne sont pas reliées au comportement social mais à l'âge. PC1 et PC2 sont analysées pour chaque groupe (**Figure 40 A et B**). La première dimension montre un effet du groupe significatif ($H=21.13$, $df=3$, $p<0.01$) expliqué par un effet du génotype ($W=4$, $p<0.001$) mais pas par un effet de l'âge ($W=98$, $p<0.05$)(**Figure 40 B**). Les groupes ne sont pas significativement différents pour la deuxième dimension ($H=5.23$, $df=3$, NS). Il n'y a pas d'effet du génotype ($W=58$, NS)(**Figure 40 B**) mais bien un effet significatif de l'âge ($W=98$, $p<0.05$)(**Figure 40 B**). Comme illustré sur la **Figure 39 B**, la répartition individuelle de chaque animal sur les 2 dimensions peut discriminer entre les 4 groupes de souris. En outre, elle montre la répartition au sein de chaque groupe et de chaque dimension.

Tableau 3. Résultats significatifs de l'ACP effectuée sur les principaux paramètres mesurés dans les expériences de comportement et d'expression génétique. La première composante inclut les marqueurs cholinergiques, les réactions olfactives, l'odeur sociale, la distance parcourue dans le test de 3 chambres et la latence pour réagir face au stimulus menaçant dans la tâche de looming. La seconde dimension inclut la durée des contacts sociaux dans le test d'interaction sociale, le nombre de poursuites et la fréquence d'USVs. L'absence de valeur indique qu'il n'a pas de corrélation avec un score de l'ACP.

	Première composante	Seconde composante
Vacht	0,87	
CHAT	0,83	
CHT	0,73	
Odeur Social	0,54	
Distance	0,53	
Temps de réaction	0,51	
Temps de contact avec un congénère		0,86
Durée de contact de l'hôte		0,84
Nombre de poursuite de l'hôte		0,76
Fréquence maximum		0,57
Immobilisation durant le stimulu	-0,50	
Durée de stop	-0,59	
Durée immobilité	-0,68	

A



B

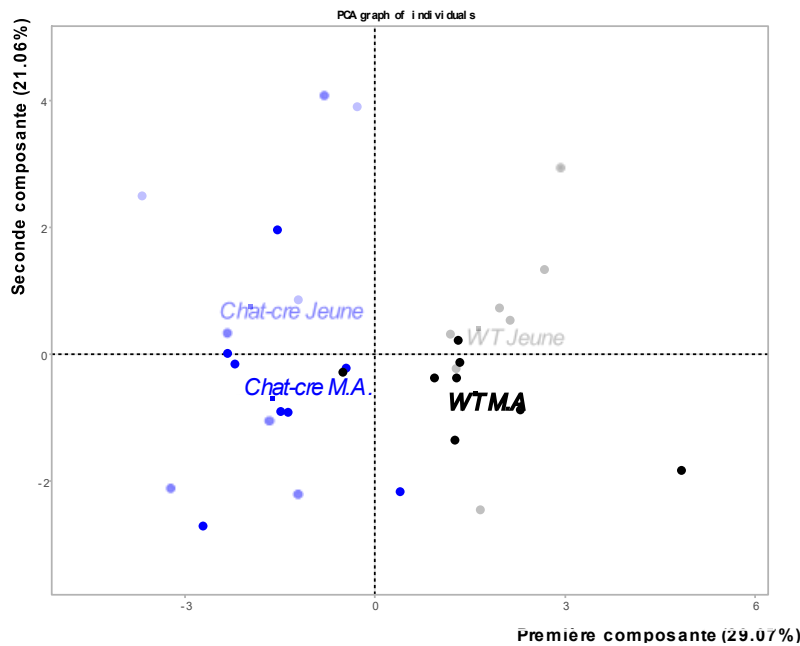


Figure 39. Illustration de l'analyse en composantes principales sur les paramètres d'expression de gènes et de comportements. A) Représentation vectorielle de la contribution de chaque paramètre. Les coordonnées de chaque variable sont les coefficients de corrélation avec les deux principales composantes (décrites en détails dans le **Tableau 3**). Entre les vecteurs et entre un vecteur et un axe, il existe une corrélation significative positive ou négative. B) Répartition individuelle pour chaque individu dans la carte des facteurs variables. La première dimension, expliquant environ 30% des données, sépare les souris WT des souris ChAT-Cre, tandis que la deuxième composante, expliquant environ 21% des données, sépare les jeunes souris des souris d'âge moyen.

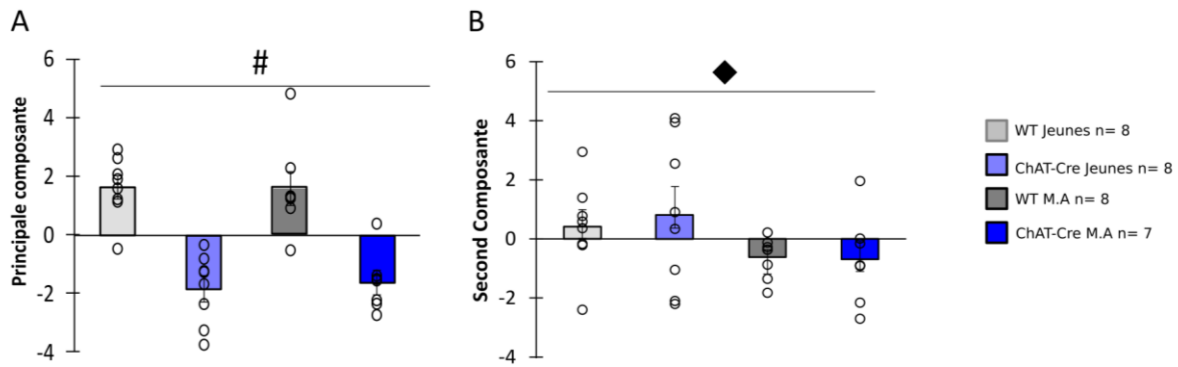


Figure 40. Répartition de chaque groupe de souris sur les principaux composants de l'ACP. A) Répartition de chaque groupe dans la principale composante 1. B) Répartition de chaque groupe dans la seconde dimension

Résumé

L'objectif de cette étude était de caractériser le phénotype social des souris ChAT-Cre et d'évaluer l'évolution de leur comportement social avec l'âge en se focalisant sur le milieu de la vie. Les résultats confirment tout d'abord une altération du système cholinergique chez les souris ChAT-Cre. Cependant, nous montrons que cette altération cholinergique ne perturbe pas l'interaction sociale, à l'exception d'une éventuelle augmentation du temps de décision. Nous avons également identifié un déficit sensoriel subtil, spécifique à la détection olfactive sociale, associé à une tendance à l'augmentation de l'anxiété. Les souris ChAT-Cre ne sont donc pas identiques aux animaux WT. Il est donc important de prendre en compte les différences phénotypiques décrites dans cette étude et d'effectuer des contrôles adéquats afin d'interpréter rigoureusement les résultats expérimentaux obtenus avec les souris ChAT-Cre dans le futur.

2. Chapitre 2 : Effet de la libération de l'Ach sur l'interaction sociale

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets de la libération et du blocage de l'Ach préfrontale dans les interactions sociales. Pour cela, je vais d'abord valider notre méthode d'optogénétique. Je vais ensuite étudier l'impact de la modulation d'Ach sur les comportements sociaux.

2.1 Matériel et méthode

2.1.1. Animaux et éthique

Les souris ChAT-IRES-Cre, appelées ici souris ChAT-Cre, ont été initialement obtenues auprès du Jackson Laboratory (B6 ; 129S6Chattm2(Cre)Lowl/Lowl/J, <https://www.jax.org/strain/006410>, RRID:IMSR_JAX:006410). Toutes les souris utilisées étaient issues d'élevage en laboratoire. Les souris visiteuses sont des C57BL/6J originaires des Laboratoires Charles Rivers France (L'Arbresle Cedex, France). Les souris C57BL/6J et ChAT-Cre utilisées durant mes expériences sont issues de l'animalerie.

Toutes les expériences ont été menées conformément à la réglementation locale en matière d'expérimentation animale ainsi qu'aux recommandations émises par la directive européenne 2010/63/UE, le décret N 2013-118 du 1er février 2013 et le Comité national français (87/848). La référence du projet éthique était 2014-13.

Les souris sont maintenues en cage collective par 3 ou 4 (20,5 X 32,5 cm) avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum* et un cycle de lumière de 12h de lumière / 12h d'obscurité (commençant à 8h). Les animaux sont isolés trois semaines avant les expériences comportementales. Au début de la chirurgie, les souris sont âgées de 2-8 mois. La souris isolée avant les expériences comportementales est appelée souris hôte. Ainsi, 42 souris hôte sont utilisées durant notre expérience optogénétique et 42 souris visiteuses C57BL/6J élevées en cage collective ont été utilisées lors de nos expériences. De plus, 21 animaux ont été utilisés en microdialyse, animaux qui ont tous été élevés dans les mêmes conditions que nos animaux optogénétiques. Un récapitulatif des expériences réalisées est détaillé sur la **Figure 40**.

Schéma expérience d'optogénétique

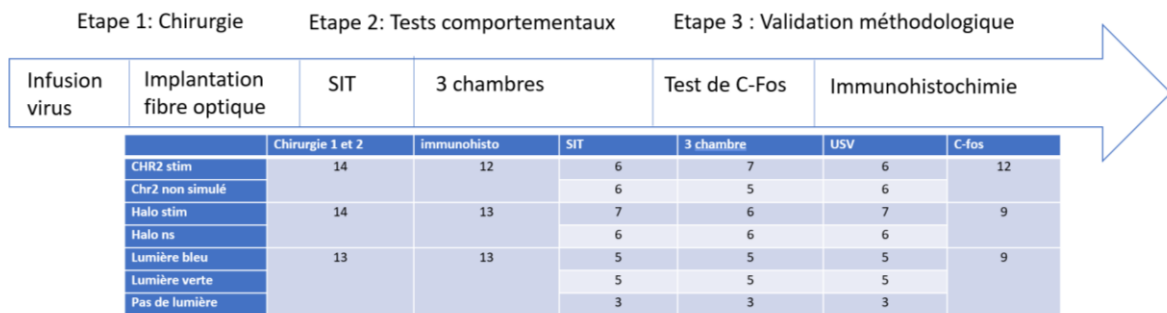


Schéma expérience de Microdialyse

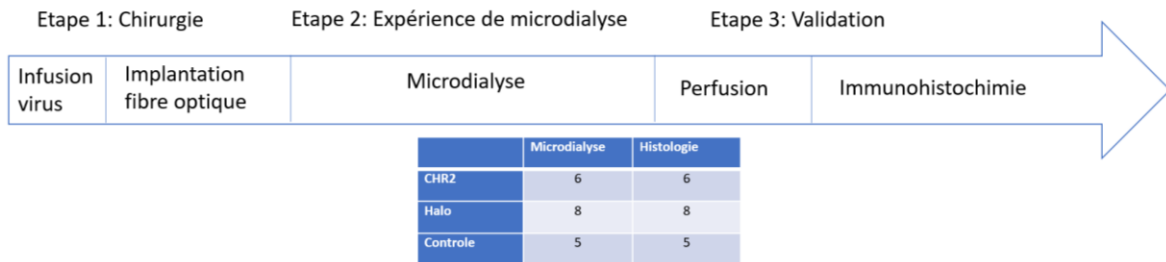


Figure 40. Schéma du plan expérimental et du nombre d'animaux utilisés dans nos expériences

2.1.2. Les étapes de la chirurgie pour réaliser l'expérience d'optogénétique et de microdialyse

2.1.2.1. 1ère étape : Infusion du virus

Durant mes expériences, 3 virus adéno-associés (AAV) sont utilisés (Penn Vector Core, University of Pennsylvania School of Medicine). Le virus *AAV9.EF1a.DIO.eNpHR3.0-eYFP.WPRE.hGH (Addgene26966)* permet l'expression de l'halorhodopsine (eNpHR3.0) et du Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), Le 2ème virus *AAV9.EF1.dflox.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.hGH (Addgene20297)* permet l'expression de la Channelrhodopsine (ChR2) et de la protéine fluorescente mCherry. Le dernier virus *AAV9.EF1a.DIO.eYFP.WPRE.hGH (Addgene27056)*, couplé à EYFP, permet de contrôler l'effet de la lumière seule puisque ce virus ne contient pas d'opsine. Tous les virus sont dilués au 1/10ème et sont conservés à -80°C.

Les animaux sont anesthésiés en utilisant l'isoflurane à 4% (1l/min) puis maintenus à 2% (0.5l/min) durant toute la durée de la chirurgie. Après ajout de la pommade ophtalmique, les animaux sont ensuite placés dans un appareil stéréotaxique. Durant toute la chirurgie, une couverture chauffante est placée sous l'animal. Une injection de tolfédine (0.02 ml de tolfédine dans 1 ml de NaCl9%) d'0.1 ml pour 20 grammes sous-cutané le jour même (et parfois du

métacalm 5 mg/ml à raison de 0.04ml/100 gramme/48h le jour d'avant et au moment de la chirurgie). La xylocaïne puis la bétadine sont mises sur la peau de la tête de l'animal avant de sectionner au niveau du crâne. Chaque animal reçoit une infusion intracraniale bilatérale de 0.5 μ l d'un des trois AAV utilisés (voir paragraphe ci-dessus). Le site d'injection se situe dans le noyau basal de Meynert (NBM) par les coordonnées antéro-postérieur (Ap) = 2.34 mm, médio latéral (ML) +/- 1.3 mm et dorso-ventral (DV) -4.4 et 5 mm en relation au bregma (voir **Figure 41** pour la localisation). La pipette d'injection a été abaissée sur 3 min pour atteindre DV -5 mm et restait en place pendant 3 minutes avant la perfusion. Le taux d'infusion était de 0.01ml/min. Après l'infusion, la pipette était maintenue 10 min dans le cerveau puis retirée en 3 minutes. Une suture sur la tête de l'animal était réalisée et de la bétadine ainsi qu'une crème cicatrisante étaient déposées sur la tête de l'animal. Puis, on réalisait une injection en sous-cutanée de 0.5 ml d'un mélange de glucose 5% et de Nacl (chauffé à 37°C).

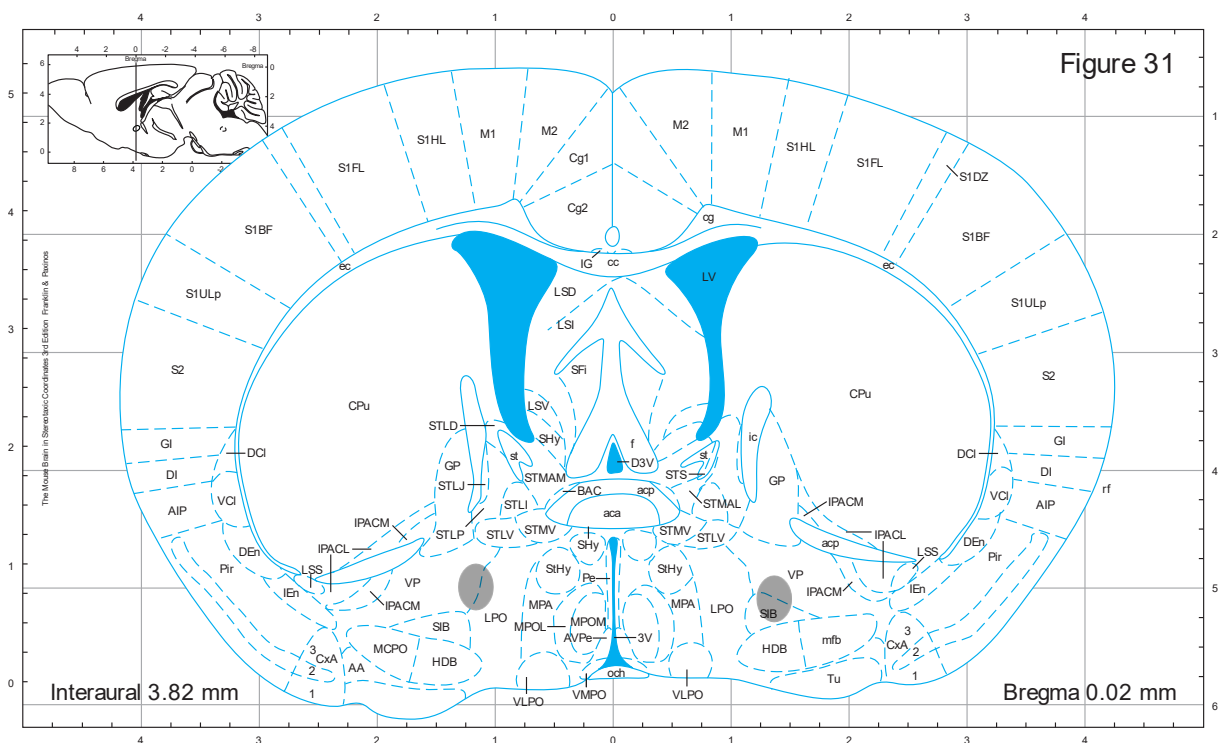


Figure 41. Coupe stéréotaxique représentant la zone infusion du virus. Les points gris représentent le site d'injection du virus.

2.1.2.2. 2ème étape : la chirurgie des fibres optiques

Trois semaines après l'infusion du virus, l'implantation des fibres optiques est réalisée. Les propriétés des fibres optiques sont : canules de 1.25mm, largeur 200um, diamètre 0.66,

protrusion de 6mm (Prizmatik). Les fibres optiques sont implantées en bilatéral au niveau du cortex prélimbique avec pour coordonnées : AP= +2.34mm, ML= +/-1.06mm et DV= -2 mm avec un angle de 20° (voir **Figure 42**). Ensuite, la fibre optique est fixée avec du ciment dentaire. Puis l'animal récupère après l'opération sous une couverture chauffante.

Après la chirurgie, le bien-être de l'animal est contrôlé par une grille de scores allant de 0 à 3. Sur ces grilles, est noté le poids de l'animal, son changement de poids corporel, son comportement ainsi que son apparence physique. Si l'animal avait un score de 1 sur l'un des paramètres précédents, j'augmentais nos fréquences d'observation. Si le score était de 2, une injection de buprénorphine était réalisée à 0.1mg/kg en sous-cutané. Si le score était de 3, l'animal était euthanasié.

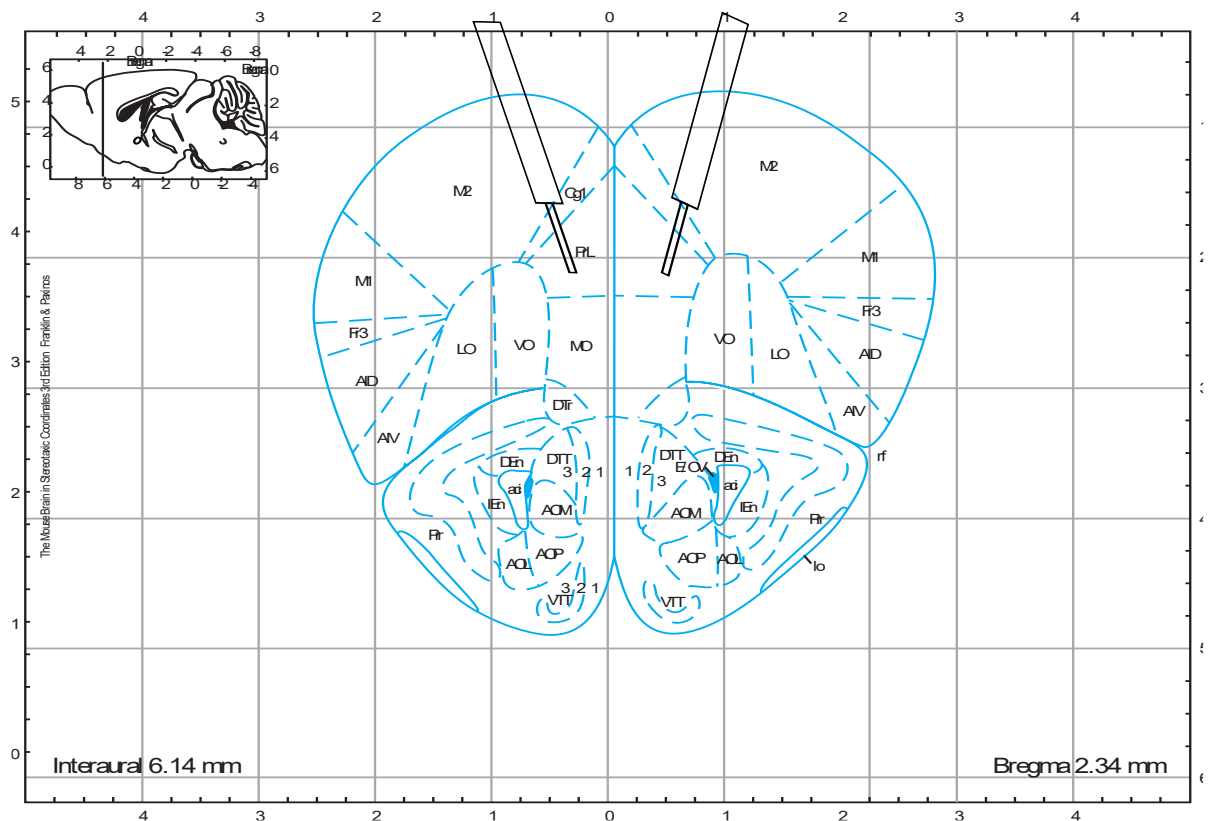


Figure 42. Implantation des fibres optiques

2.1.2.3. Protocole de stimulation optogénétique

Avant chaque expérience comportementale, les fibres optiques sont connectées à une source de lumière. Toutes les stimulations réalisées ont été effectuées à pleine puissance (nos fibres optiques et sources lumineuses viennent de Prizmatix, nos fibres incluant deux LEDs et

faisant 200µm et 0.66 NA). Nous travaillons à pleine puissance de la LED qui est pour la lumière bleue de >12 mW et pour la lumière verte >5.5 mW. En ce qui concerne l'irradiance, nous sommes à 380 mW/mm² alors que pour la lumière verte nous sommes à 170 mW/mm². Cette étape est réalisée avec de l'isoflurane 4% (1l/min) puis maintenue à 2% (0.5l/min). Après cette étape, 15 minutes ont été laissées à l'animal pour qu'il se remette de son opération. Les fibres optiques sont connectées à un connecteur tournant permettant de lier la fibre optique et le dispositif de stimulation.

Deux patterns de stimulation sont utilisés (voir **Figure 43**) :

- Pour la lumière bleue : 16 trains de stimulations de 10 secondes vont être réalisées. Suivi de 20 secondes sans stimulation. Chaque train de stimulation va être composé de 10 ms de stimulation avec 40 ms sans stimulation répété 200 fois.
- Pour la lumière verte : 24 stimulations (= 1 train) de 8000 ms de stimulation suivi de 2000 ms sans stimulation sont réalisées. Durant l'expérience 1 train de stimulation est réalisé.

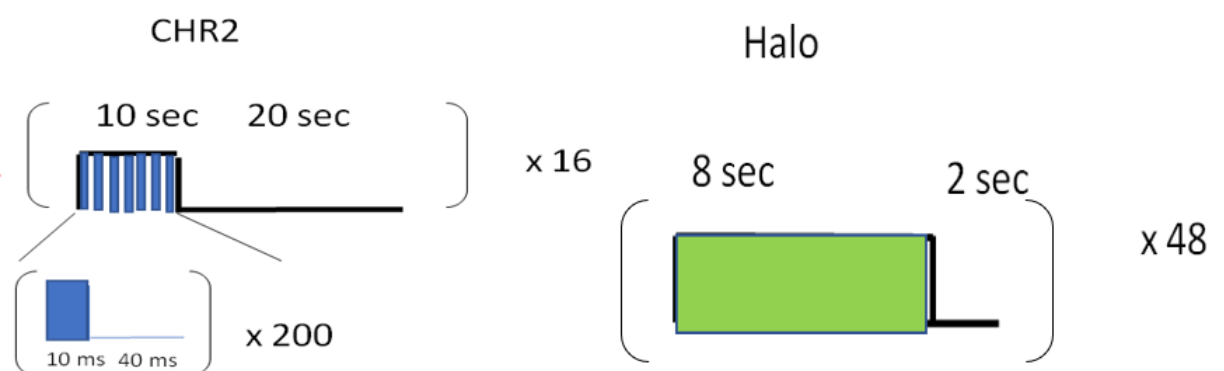


Figure 43: les patterns de stimulation utilisés en optogénétique

2.1.2.4. Implantation des sondes de microdialyse et de la fibre optique

L'infusion du virus se déroule de la même façon que pour l'optogénétique. Trois semaines après l'infusion, la fibre optique et les guides canules de microdialyse sont implantés. Les coordonnées de la fibre optique sont : AP= +2.34mm, ML= +0.3 mm, DV= 1.8 mm. Les guides canules des sondes de microdialyse droite et gauche sont implantées selon un angle de 20° suivant les coordonnées suivantes : AP= +2.34mm, ML= +0.3 mm, DV= 1.8 mm. Les sondes de microdialyse et la fibre optique sont fixées avec du ciment dentaire. Puis, l'animal

recupère après l'opération sous une couverture chauffante. Sur le côté gauche du cortex préfrontal de l'animal on aura uniquement une sonde de microdialyse, ce qui servira de contrôle. Au niveau du côté droit du cerveau, on aura une fibre optique et une sonde de microdialyse, ce qui sera le côté stimulé grâce à la fibre optique (voir **Figure 44**).

Après la chirurgie, le bien-être de l'animal est contrôlé par une grille de scores allant de 0 à 3. Sur ces grilles, on notait le poids de l'animal, son changement de poids corporel, son comportement ainsi que son apparence physique. Si l'animal avait un score de 1 sur l'un des paramètres précédents, j'augmentais nos fréquences d'observations. Si le score était de 2, une injection de buprénorphine était réalisée à 0.1mg/kg en sous-cutané. Si le score était de 3, l'animal était euthanasié.

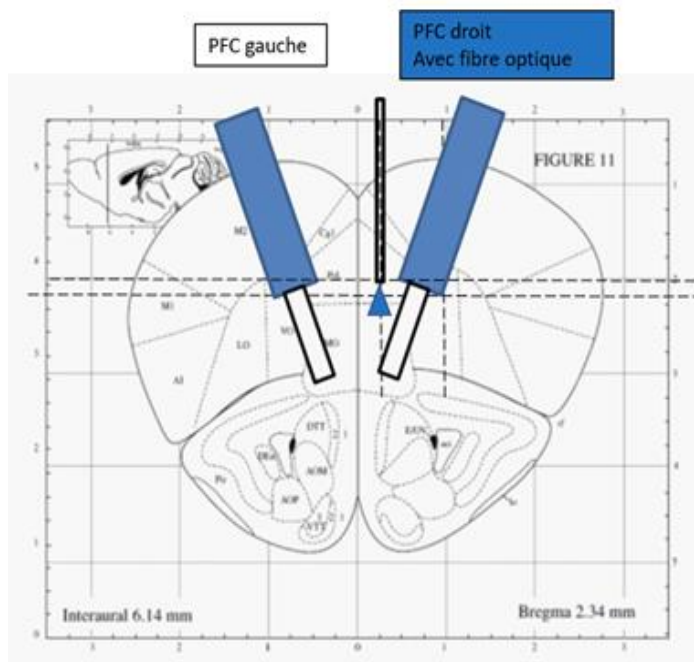


Figure 44. Représentation de l'implantation des sondes de microdialyse. Sur le cortex préfrontal gauche, nous avons uniquement une fibre optique alors que sur le cortex préfrontal droit nous avons une sonde de microdialyse et une fibre optique.

2.1.3. Validation de l'expression d'opsine par méthode immunohistochimique

Perfusion

Après les expériences comportementales, les souris sont perfusées avec une injection intrapéritonéale de dolethal (0.1 ml pour 10 g de souris) diluée dans du NaCl (2 ml de dolethal dans 3 ml de NaCl 0.9%). Une perfusion intracardiaque de 15-20 ml de NaCl 0.9%

supplémentée de 0.2% d'héparine. Puis, 100 ml de paraformaldéhyde (PFA) à 4% sont ajoutés avant de prélever les cerveaux. Ensuite, les cerveaux sont collectés et fixés dans du PFA toute la nuit avant d'être transférés dans trois bains de tampon phosphate (PBS) 0.1M de sucrose 20% séparés de 24h.

Congélation du cerveau

Le cerveau est déposé 2 min dans du 2-méthylbutane, refroidi à l'azote liquide approximativement à -50°C. Les cerveaux sont ensuite congelés à -20°C.

Coupe de cerveau au cryostat

Après congélation, des coupes coronales de 14 µm sont réalisées grâce à un cryostat à -20°C (HM550 microm-microtech-France). Les coupes conservées sont comprises entre +3,20 mm de bregma et -4,04 mm de bregma.

Immunologie anti ChAT dans le noyau basal de meynert (NBM)

Après réhydratation dans du PBS 0.1M, les coupes sont délimitées avec le super crayon PAP PEN (F/1701-SF – UGAP 2545924, MMFRANCE), puis après lavage, les coupes sont incubées 30 minutes dans du PBS 0.1M supplémenté de triton 0.5%. Après trois lavages de 5 min dans du PBS 0.1M, les coupes sont incubées 20 min dans une solution empêchant l'autofluorescence (NH₄Cl à 50mM/PBS 1X). Après trois lavages de 5 min dans le PBS 0.1M, les coupes sont incubées dans une solution de blocage (BSA1%, triton 0.1%, NDS 5% et PBS) durant 1h30 à température ambiante. L'anticorps primaire de chèvre polyclonale anti-choline acétyltransférase (AB144P, Merck Millipore) est ajouté dans la solution de blocage et incubé toute la nuit à 4°C. Pour les ChR2, l'anticorps primaire utilisé est un anticorps anti-chèvre de singe dylight 480 nm (A50-101D2, BERTHYL) dilué aux 1/400. Pour l'halorhodopsine et le virus contrôle, l'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de singe anti-chèvre alexa 450 nm dilué aux 1/400 (A21432, invitrogen). L'anticorps secondaire est ajouté à la solution BSA 4%, NDS 5% et PBS 0,1M et est incubé dans le noir durant 2 heures à température ambiante. Deux bains de 10 min de PBS 0.1M et 1 bain de 10 min PB 0.1M sont réalisés avant d'ajouter un fluoromount.

Réalisation d'une immunologie anti protéine fluorescente dans le cortex prélimbique et le NBM

Après réhydratation dans du PBS 0.1M, on effectue un démasquage avec dako en chauffant une solution dako (S1700, Agilent DAKO) 15 min au bain-marie à 95°C. Puis on place la lame dans le bain d'eau et on chauffe 20 min à 95°C. Après, on retire et laisse refroidir 20 min. La lame a été délimitée avec le super crayon PAP PEN (F/1701-SF – UGAP 2545924, MMFRANCE). Puis, après le lavage, les coupes sont incubées 30 minutes dans du PBS 0.1M supplémenté en triton 0.5%. Après trois lavages de 5 min dans du PBS 0.1M, la lame est incubée 20 min dans une solution anti-autofluorescence (NH₄Cl à 50mM/PBS 1X). Après trois lavages de 5 min dans du PBS 0.1M, la lame a été incubée dans une solution de blocage (BSA1%, triton 0.1%, NDS 5% et PBS) pendant 1h30 à température ambiante. Les Chr2 étaient couplés à une protéine fluorescente M-Cherry alors que les Halorhodopsines et les groupes qui contiennent un virus sans opsine sont couplés à la protéine fluorescente EYFP. Pour le Chr2, l'anticorps primaire était un anticorps de lapin mCherry (GTX128508, geneTex) dilué aux 1/100^{ème}. Pour les Halorhodopsine et les virus controle sont couplé avec la protéine fluorescente EYFP. L'anticorps était un anticorps Green Fluorescent Protein (GFP) de lapin (GTX113617, gene tex) dilué au 1/100^{ème}, puis ajouté à la solution de blocage et incubé toute la nuit à 4°C. Pour le Chr2, l'anticorps secondaire utilisé était un anticorps de singe dirigé contre le lapin dylight 550 (A120-108D3, BERTHYL) dilué au 1/400. Pour l'halorhodopsine et les virus contrôles, l'anticorps secondaire utilisé est l'anticorps de singe anti-lapin dylight 550 dilué aux 1/400 (A120-108D3, BERTHYL). L'anticorps secondaire est ajouté dans une solution de BSA 4%, NDS 5% et PBS 0,1M puis incubé dans le noir durant 2h à température ambiante. Deux bains de 10 minutes de PBS 0.1M et 1 bain de 10 min de PBS 0.1M sont réalisés avant d'ajouter un fluoromount.

2.1.4. Validation de l'effet de la stimulation optogénétique

2.1.4.1. Protocole expérimental du c-Fos

Après ces différentes étapes de chirurgie, nous avons voulu vérifier si la stimulation optogénétique modulait bien la quantité d'Ach. Pour réaliser ceci, un test de c-Fos a été réalisé. Le c-Fos est une protéine que l'on mesure et qui montre que de la transcription a été déclenchée par une activité de la cellule environ 1h30 avant. Ainsi, la présence de la protéine c-Fos indique une activité cellulaire d'une heure et demie avant. Nous avons donc décidé de stimuler uniquement le cortex prélimbique droit par optogénétique dans la cage de vie de l'animal, le cortex prélimbique gauche servant de contrôle. La stimulation durait 8 minutes et

se déroulait dans la cage de vie de l'animal. Des animaux optogénétiques non stimulés servent de contrôle. Je regarde l'expression du c-Fos dans le Prl. De plus, je regarde aussi l'expression de ce gène au niveau du bulbe olfactif. L'expression au niveau du bulbe olfactif permettra de contrôler la spécificité de la stimulation ainsi que de vérifier si la stimulation active des projections controlatérales. De plus, stimuler un seul côté uniquement permettra d'avoir un côté qui servira de contrôle au sein du même animal. Le Prl gauche permet également de vérifier si l'activation optogénétique provoque une activité des projections ipsilatérales.

2.1.4.1.1. Protocole

Après réhydratation dans du PBS 0.1M, les lames sont délimitées avec le super crayon PAP PEN (F/1701-SF - UGAP 2545924, MMFRANCE). Puis après le lavage, les coupes sont incubées 30 minutes dans du PBS 0.1M supplémenté en triton 0.5%. Après trois lavages de 5 min dans du PBS 0.1M, la lame est incubée 20 min dans une solution H₂O₂ à 3% diluée dans du PBS 0.1M. Après trois lavages de 5 min dans du PBS 0.1M, la lame a été incubée dans une solution de blocage (BSA1%, triton 0.1%, NDS 5% et PBS-Triton 0.1%) pendant 1h à température ambiante. Puis, l'anticorps primaire polyclonal de lapin anti c-Fos (proteintech) dilué au 1/500 est au final ajouté à la solution de blocage. Puis l'anticorps est incubé 48h à 4°C. Les coupes vont être ensuite rincées par trois lavages au Phosphate Buffer Saline Triton (PBST) 0.1% avant de re-délimiter les coupes au super crayon PAP PEN (F/1701-SF – UGAP 2545924, MMFRANCE). Puis, l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin biotinylé est dilué au 1/200 dans une solution de BSA 1%, NGS 5%, PBS 0.1M et laissé incubé durant 2h à température ambiante. 3 bains de 10 min de PBS sont ensuite réalisés sous agitation. Puis nous prenons le KIT ABC et mélangeons 1/100 de solution A + 1/100 de la solution B diluée dans du PBS. Nous attendons 20 minutes pour que l'avidine et la biotine se mélangent bien, puis nous mettons ces solutions sur les différentes lames et attendons 1h30 à température ambiante sous agitation. Nous effectuons 3 rinçages de 3* 5 min, puis ré-incubons les lames dans du DAB 0.06% pendant 5 min. Ensuite, on relevait au DAB dans une solution de DAB 0.06%, NiCl₂ 0.03%, H₂O₂ 0.6%. Dès que l'on jugeait que le seuil de coloration était atteint, nous arrêtons la réaction par l'ajout d'H₂O sur la lame. Les coupes sont déshydratées pendant 2 min dans différents bains, succinctement : d'alcool 70°, 90°, 100°, 100° Xylène et Xylène avant d'être montées entre lame et lamelle par du Eukitt.

2.1.4.1.2. Analyse

Les noyaux c-Fos positifs ont été comptés avec le logiciel ICY (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) après l'acquisition des images avec une caméra digitale (Nikon DXM 1200) sur un microscope Olympus BX600 couplé au logiciel (Mercator Pro : explora Nova, La Rochelle France). Les coupes ont été analysées à l'objectif 10X. Chaque région d'intérêt (ROI) a été délimitée pour chaque structure à l'aide de l'atlas de souris (Paxinos & Franklin, 2004). Le logiciel ICY compte directement le nombre de neurones marqués dans les ROIs. La densité de cellules par millimètre carré a été calculée ensuite. La structure d'intérêt était le Prl droit et gauche ainsi que le bulbe olfactif droit et gauche (voir **Figure 45**). Le bulbe olfactif va nous permettre de voir la spécificité de la stimulation. Normalement cette structure ne devrait pas être impactée par le changement de c-Fos étant donné que nous stimulons uniquement le cortex prélimbique.

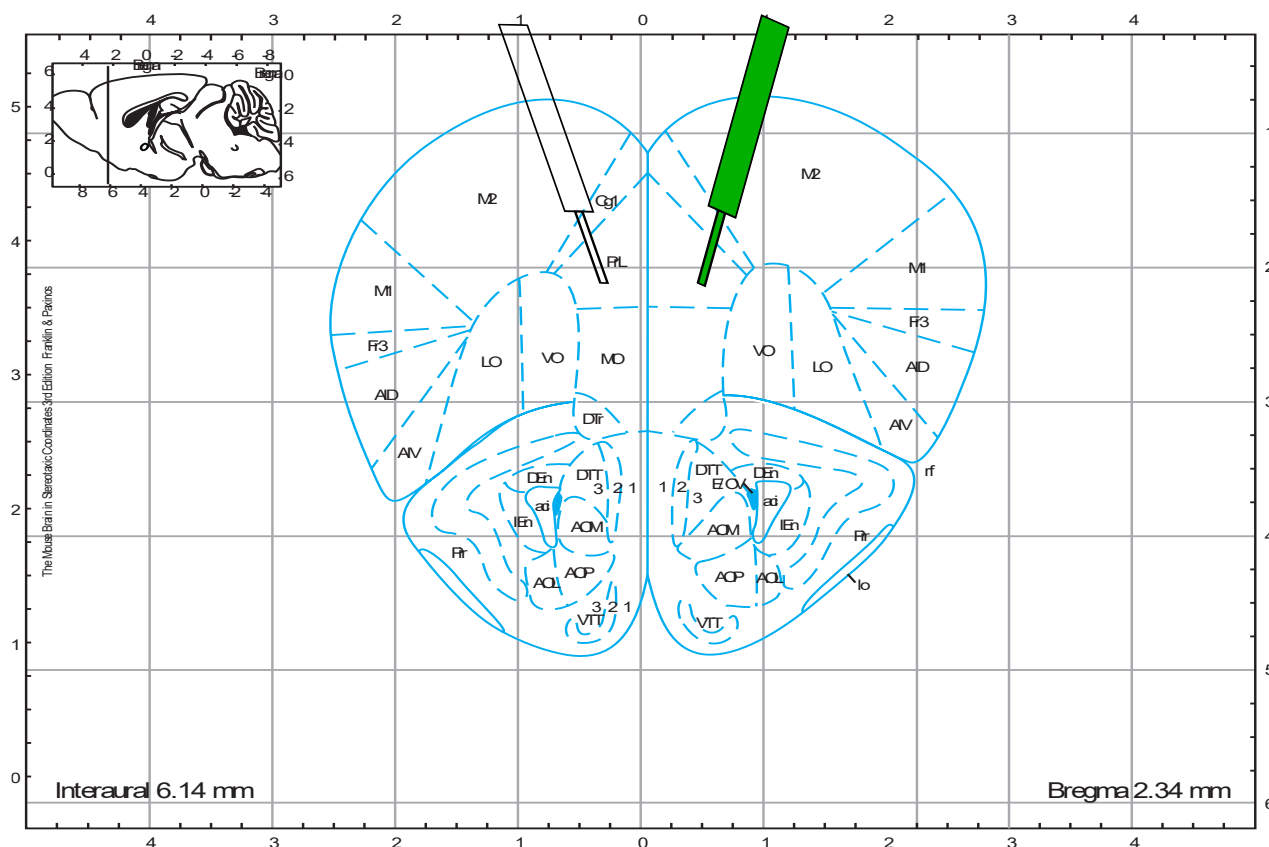


Figure 45. Méthode de mesure du c-Fos. Seule la fibre optique droite sera stimulée. Les carrés représentent la zone où l'on regarde l'expression du c-Fos dans le Prl. Les ronds représentent la zone où l'on regarde l'expression du c-Fos dans le bulbe olfactif.

2.1.4.2. Validation de l'effet de la stimulation optogénétique

2.1.4.2.1. La microdialyse

La microdialyse permet de vérifier la modulation cholinergique suite à la stimulation optogénétique. Le principe de cette technique repose sur le principe de diffusion (voir **Figure 46**). On implante proche de la région cérébrale d'intérêt une sonde de microdialyse (Chang et al., 2006; Darvesh et al., 2011; Defaix et al., 2018; Gardier, 2013; Shannon et al., 2013; Tritschler et al., 2017; Ungerstedt, 1991) dans laquelle on introduit du liquide céphalorachidien artificiel et, par principe de diffusion, on pourra récolter l'éluat cellulaire. Dans le cadre de mes expériences, je vais implanter deux sondes de microdialyse (une de chaque côté du cerveau) proche du cortex prélimbique (voir **Figure 47**). Au niveau du cortex préfrontal droit, une fibre optique est introduite en plus de la sonde de microdialyse. Ce côté sera le côté test là où l'autre côté servira de contrôle.

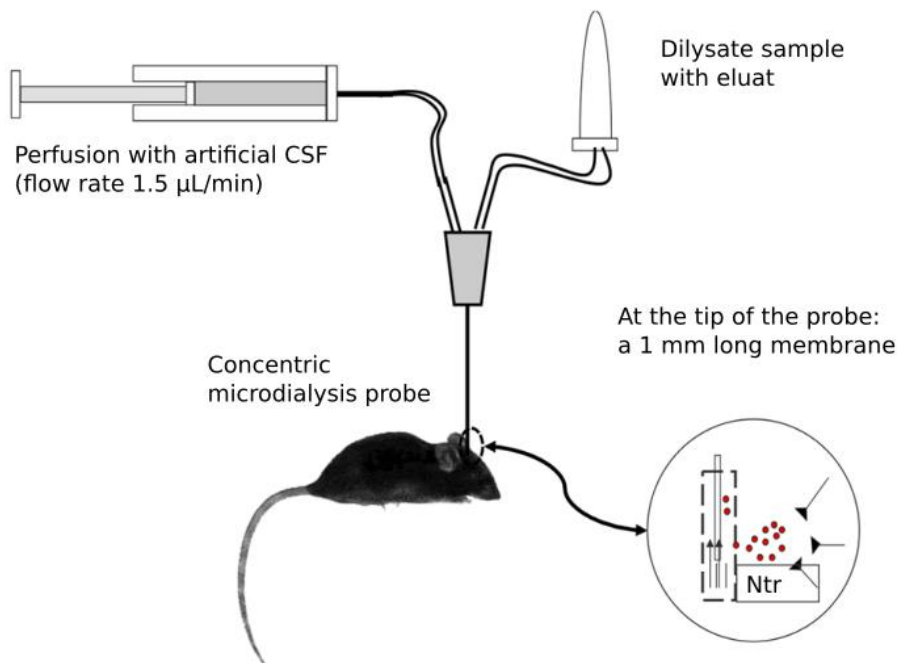


Figure 46. Principe de la microdialyse. Une sonde de microdialyse est implantée dans le cerveau et du liquide céphalorachidien artificiel passe à travers la membrane. Au niveau de la membrane de microdialyse, par principe de diffusion, on récolte les différentes molécules du cerveau. Puis ces tubes seront récoltés dans un tube et l'échantillon sera dosé afin de déterminer la quantité du neurotransmetteur (Ntr) d'intérêt (D'après Gardier, 2013).

2.1.4.2.2. Protocole de microdialyse

Les sondes de microdialyse étaient préparées manuellement. Le premier jour, la membrane de microdialyse est ajoutée au niveau de la sonde de microdialyse. On réalise une vérification du liquide, s'il passait bien à travers la sonde de microdialyse et s'il n'y avait pas de fuite. Puis les sondes de microdialyse sont introduites dans des portes canules de l'animal sous anesthésie. Dans la sonde de microdialyse, de l'eau distillée est ajoutée. L'animal est posé dans l'arène et laissé une nuit afin de s'habituer à son environnement. Cette habitude permet aussi à la sonde de microdialyse nouvellement introduite de s'équilibrer avec le milieu intracellulaire. Le deuxième jour, les protocoles seront différents pour « les groupes » Chr2, Halo et contrôle.

Pour les Channelrhodopsines

On prépare du LCR artificiel (PH 6.8) contenant 126.5 mM de NaCl, 27.5 mM de NaHCO₃, 2.4 mM de KCL, 0.5 mM de Na₂SO₄, 0.5 mM de KH₂PO₄, 1.2 mM de CaCl₂, 0.8 mM de MgCl₂ et 5.0 mM de dextrose. La néostigmine est ensuite ajoutée à 0.1µM. La néostigmine est un anti-acétylcholinestérase (AChE) qui permet de supprimer la dégradation d'Ach et ainsi d'augmenter sa quantité. L'animal est mis sous isoflurane 4% (1l/min) puis maintenu 2% (0.5l/min) nous branchons les sondes de microdialyses et la fibre optique (**Figure 47 A et B**) et nous regardons s'il n'y avait pas de problème de fuite. Une fois tous les branchements opérationnels, l'animal est laissé au repos durant 45 min, puis ensuite on réalise un recueil d'1h avec un débit de 1 µL/min. Ce premier recueil sera notre contrôle. Par la suite, un autre recueil est réalisé avec le même débit et la même concentration de néostigmine pendant 1h mais cette fois-ci avec une stimulation en lumière bleue (le protocole de stimulation est le même que celui utilisé en optogénétique à l'exception qu'il dure 1h). Ce point s'appellera point de stimulation. Nous utilisons 1h de recueil car en dessous la quantité d'Ach serait trop faible pour être quantifiée. C'est pour cette raison que la durée de stimulation n'est pas la même que le comportement. Enfin, un dernier recueil est réalisé. Pour ce faire, un stress de contention est réalisé et je récupère l'échantillon durant 10 minutes à un débit de 2 µL/min avec une concentration de néostigmine de 0.1µM. Le stress de contention permet d'obtenir une libération massive d'Ach. Une absence d'Ach après dosage lors de cette étape rendait les données non exploitables. Un schéma du protocole de microdialyse et de la stimulation est

détaillé **Figure 47 D**. L'animal est ensuite remis dans sa cage de vie. Une fois tous les échantillons recueillis, les échantillons sont envoyés à nos collaborateurs (J.M launay, Hôpital Lariboisière, Inserm U942).

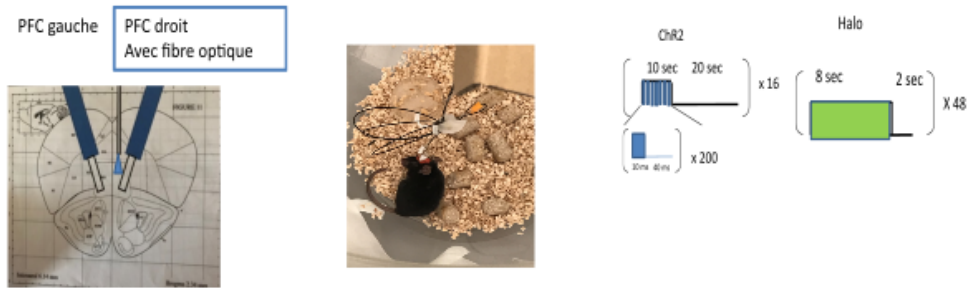
Pour les Halorhodopsines

Le principe est le même que pour la ChR2 sauf que cette fois ci, nous réalisons deux recueils d'avant notre stimulation optogénétique. Ainsi que 1 recueil après la stimulation. De plus, la quantité de néostigmine sera pour ce groupe à 10 μ M. Le protocole est expliqué **Figure 47 E**.

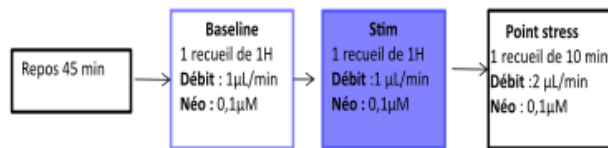
Pour les contrôles

Le principe est le même que pour la ChR2 sauf que nous réalisons un recueil sans stimulation d'1h, ensuite nous réalisons un autre recueil en lumière verte puis après 45 minutes de repos nous réalisons un dernier recueil sans stimulation puis un recueil avec la lumière verte. La stimulation a été contrebalancé durant la stimulation. Pour la stimulation en lumière bleue, la quantité de néostigmine était de 0.1 μ M, alors que lorsque l'on récoltait en lumière verte, la quantité de néostigmine était de 0.1 μ M afin de correspondre à la quantité utilisée pour nos opsines.

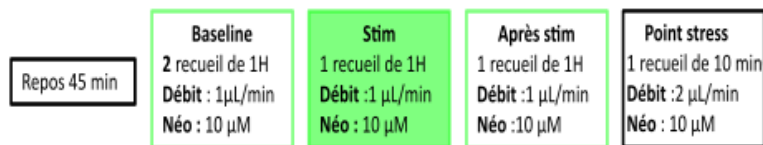
A Emplacement fibre optique et sonde de microdialyse **B** Souris avec sonde de microdialyse **C** Pattern de stimulation optogénétique



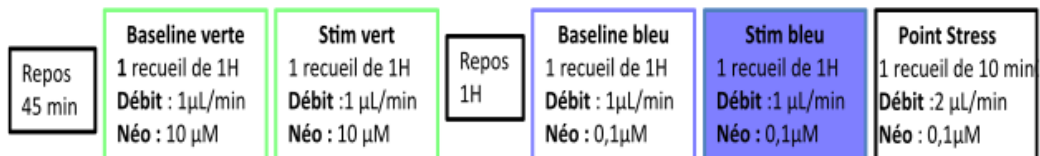
D Protocole ChR2



E Protocole Halo



F Protocole Contrôle



Ou

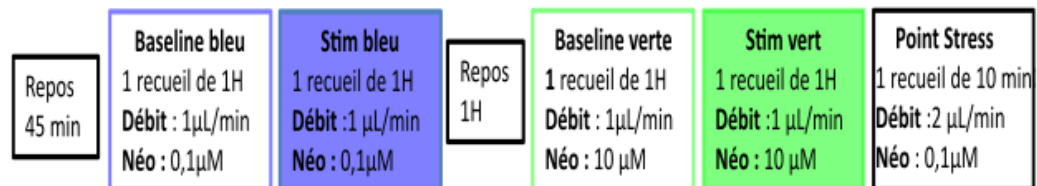


Figure 47. Protocole de microdialyse A) Schéma représentant la position des sondes de microdialyse et de la fibre optique sur une coupe stéréotaxique de cerveau. B) Souris avec les sondes de microdialyse et la fibre optique. C) Protocole de stimulation pour la lumière bleue ou la lumière verte. D) Protocole de microdialyse ChR2. E) Protocole de stimulation Halo. F) Protocole de stimulation contrôle.

2.1.5. Expérience comportementale

2.1.5.1. Test d'interaction sociale

Le test d'interaction sociale (IS) est précisément décrit en détails dans les références suivantes (de Chaumont et al., 2012; Nosjean et al., 2015) et l'expérience est résumée **Figure 33 A**. Le jour de l'expérience, la souris est anesthésiée en utilisant l'isoflurane 4% (1l/min) puis maintenue à 2% (0.5l/min) le temps de brancher les fibres optiques. Ensuite, l'animal est laissé afin de se reposer 15 min après la chirurgie. La souris isolée « souris hôte » est placée dans une cage transparente en Plexiglas (50 cm longueur*25 cm de large*30 cm de hauteur) contenant de la litière propre, dans une pièce silencieuse non familière pour 30 minutes d'habituation. La lumière de la pièce est de 100 lux. Après l'habituation, un autre animal « souris visiteuse », de même âge et de même sexe, est introduit dans la cage. La souris visiteuse est une souris WT qui a vécu dans une cage collective. La souris hôte et la souris visiteuse ne se sont jamais rencontrées avant.

L'interaction sociale est enregistrée durant 8 min grâce à une caméra numérique (webcam) connectée à un ordinateur. La stimulation optogénétique se déroule durant tout le test selon le protocole de stimulation montré en **Figure 47 C**. L'interaction sociale est analysée avec le logiciel Mice Profiler (de Chaumont et al., 2012). Toutefois, les redressements (indicateurs d'exploration), les comportements de dominance et d'agressivité sont quantifiés manuellement car ces comportements ne sont pas pris en charge par le logiciel Mice Profiler. Tous les résultats statistiques sont récapitulés dans les **Tableaux 6-11**.
















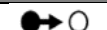
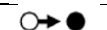







Analyse du comportement social

Le logiciel Mice Profiler a été développé par le laboratoire en collaboration avec Fabrice de Chaumont de l'Institut Pasteur (de Chaumont et al., 2012). C'est un logiciel semi-automatique qui permet d'analyser tout le répertoire comportemental de la souris. Le **Tableau 4** résume l'ensemble des comportements enregistrés par ce logiciel. Après sélection de l'animal hôte ou de l'animal visiteur, le logiciel traque l'animal par une analyse de la tête et du corps. Après tracking de l'animal, il est possible d'analyser l'ensemble du comportement social avec le temps et la durée de chaque comportement. La détection automatique réalisée par le logiciel n'est pas optimale (confusion entre les deux animaux, inversion de la tête et de la queue...), ce

qui requiert des temps d'analyse assez longs pour corriger les erreurs manuellement. Mise à part les comportements mis dans le **Tableau 4**, d'autres comportements ont été analysés :

- Les comportements agressifs : attaques, morsures, combats,
- Les « paw control » : la patte ou une partie du corps de l'animal est au-dessus de l'autre animal, comportement qui est un marqueur de la dominance,
- Les redressements : marqueur de l'exploration,
- La vitesse et la distance parcourue dans le test d'interaction sociale sont également enregistrées.

Tableau 4. Comportements enregistrés avec Mice Profiler. Les ronds noirs correspondent à la souris hôte, les ronds blancs à la souris visiteuse (de Chaumont et al., 2012).

	Contact
	Contact : La distance minimal doit être inférieure à 1cm
	Contact : La distance doit être inférieure à 3 cm
	Contact oral hôte-génital visiteuse
	Contact oral visiteur génital hôte
	Contact oral-oral
	Contact sur le flanc de l'animal de sens opposée
	Contact sur le flanc de l'animal dans le même sens
Succession évènement approche avec contact suivie echapement	
	Approche de l'hôte suivie d'un contact suivie de l'échappement de l'hôte
	Approche du visiteur suivie d'un contact suivie de l'échappement de l'hôte
	Approche de l'hôte suivie d'un contact suivie de l'échappement du visiteur
	Approche de la visiteuse suivie d'un contact suivie de l'échappement du visiteuse
Approche avec contact	
	Approche de l'hôte suivie d'un contact
	Approche du visiteur suivie d'un contact
Echappement après un contact	
	Echappement du visiteur après un contact
	Echappement de l'hôte après un contact
Approche sans contact	
	Approche de l'hôte sans contact
	Approche du visiteur sans contact
Echappement sans contact	
	Echappement de l'hôte sans contact
	Echappement du visiteur sans contact
Relative position	
Hôte voie Visiteuse	La souris hôte peut voir la souris visiteuse
Visiteuse voie Hôte	La souris visiteuse peut voir la souris Hôte
	La souris hôte se trouve derrière la souris visiteuse
	La souris visiteuse se trouve derrière la souris Hôte
Dominance	
	La souris Hôte poursuit la souris visiteuse
Comportement de stop	
	Stop de l'hôte
	Stop du visiteur

2.1.5.2. Le test de 3 chambres

L'arène du 3 chambres est une boîte rectangulaire en plexiglass de 64 X 42 cm divisée en trois compartiments de surface égale. Sur les deux coins opposés, 2 pots en plexiglas (diamètre 9.2cm hauteur 10.2 cm) comportant 30 trous de 1 cm, sont disposés. Durant

l'expérience, la lumière était de 100 lux. Le jour de l'expérience, la souris est anesthésiée par isoflurane à 4% (1 l/min) puis maintenue à 2% (0.5l/min) le temps de brancher les fibres optiques sur la tête de l'animal. Ensuite l'animal est laissé afin de se reposer 15 min, à la suite de quoi il est placé au centre de l'arène et peut explorer librement son environnement pendant 15 minutes. Après cette période d'habituation, l'animal est confiné au centre de l'arène pendant qu'un autre animal (souris visiteuse) est placé sous un des pots en plexiglass. La souris visiteuse n'est pas contrainte mais ne peut pas bouger librement et seulement réaliser des contacts nez à nez avec la souris hôte. Le visiteur est du même âge et même sexe et demeure inconnu à la souris visiteuse. L'expérience dure 8 min. La stimulation optogénétique se déroule durant tout le test selon le protocole de stimulation détaillé en **Figure 31**. La chambre qui contient la souris visiteuse est appelée chambre sociale en comparaison avec le coin opposé contenant le pot vide, appelé chambre non sociale. La chambre neutre est elle entre la chambre sociale et la chambre non sociale. La localisation de la souris visiteuse est contrebalancée entre chaque expérience. Le comportement de la souris hôte est enregistré grâce à une webcam connectée au logiciel ANY-Maze. Le comportement est analysé et enregistré après l'expérience, comprenant : la distance globale, le temps passé dans chaque chambre, la distance parcourue et le temps d'immobilité dans chaque chambre.

2.1.5.3. Enregistrement des USV

Les USVs sont enregistrées durant les 8 minutes de l'interaction sociale. Les vocalisations sont un marqueur émotionnel chez l'animal (Chabout et al., 2012). Un microphone ultrasonore à condensateur Polaroid/CMPA a été placé au-dessus de la chambre expérimentale, suffisamment haut pour que l'angle de réception du microphone couvre toute la zone expérimentale. Le microphone est relié à une interface d'enregistrement ultrasonore Ultrasound Gate 416H, qui était branché sur un ordinateur équipé du logiciel d'enregistrement Avisoft Recorder USG (fréquence d'échantillonnage : 250 kHz, longueur FFT : 1024 points, 16 bits). Tous les matériels et logiciels d'enregistrement ont été achetés par Avisoft Bioacoustics H (Berlin, Allemagne). Les USVs ont été analysées après manipulation avec le logiciel SASLab Pro (Avisoft Bioacoustic H, Berlin, Allemagne). Lors de l'analyse, des spectrogrammes ont été générés pour chaque appel détecté (fréquence d'échantillonnage : 250 kHz, longueur de la FFT : 1024 points, 16 bits, fenêtre Blackman, chevauchement 87,5 %, résolution temporelle : 0,512

ms, résolution en fréquence : 244 Hz). Les USVs ont ensuite été classées selon 11 catégories distinctes basées sur leur durée et leur modulation de la fréquence pendant toute la tâche d'interaction sociale : S : court, F : plat, OFJ : saut de fréquence simple, MFJ : sauts de fréquence multiples, U : USV en forme de U, C : chevron, M : modulé, W : composite, H : ascendant, D : descendant et UND : non défini (Chabout et al., 2012). Pour l'étude du répertoire, nous avons considéré uniquement les animaux de chaque groupe émettant des vocalisations. Les animaux qui n'émettaient pas de cris ont été exclus de l'analyse.

2.1.6. Analyse statistique

Nous avons 3 virus différents : la Channelrhodopsine, l'HaloRhodopsine et un virus contrôle qui ne contient pas d'opsine. Afin de s'affranchir de l'effet du virus, nous avons décidé de réaliser toutes nos analyses en % de contrôle. Pour le ChR2, nous avons des animaux contenant le virus ChR2 stimulé en lumière bleue et d'autres animaux indépendants contenant le virus ChR2 non stimulé. Pour les Halo, nous avons un groupe d'animaux Halo stimulé en lumière verte et un autre groupe d'animaux indépendants Halo non stimulés. En ce qui concerne le virus contrôle (animaux qui contiennent un virus sans opsine) nous avons un groupe d'animaux stimulé en lumière bleue, un autre groupe indépendant stimulé en lumière verte et un autre groupe indépendant non stimulé (voir **Figure 48**). L'effet de la lumière (bleue ou verte) est observé en pourcentage de contrôle (par rapport à un virus ne contenant pas d'opsine qui n'est pas stimulé). Ensuite, l'effet de l'augmentation de la libération d'acétylcholine est observé sur le comportement en fonction du pourcentage de contrôle (ChR2 non stimulé). Puis, enfin l'effet de l'inhibition de la libération de l'acétylcholine est observé sur le comportement en fonction du pourcentage de contrôle (Halo non stimulé).

La première étape de l'analyse est de comparer l'effet de la lumière. Si nous n'avons pas d'effet de la lumière, je peux analyser l'effet de la modulation de l'acétylcholine. Au contraire, si la lumière a un effet sur le comportement et que le même effet est observé pour la modulation de la libération de l'Ach, deux possibilités existent. Si l'effet est dans la même direction, l'interprétation serait très difficile. Si l'effet est dans la direction opposée, la modulation de l'Ach serait plus importante que l'effet de la lumière et les résultats pourraient être interprétés. La **Figure 48** explique la stratégie utilisée pour analyser le jeu de données.

Dans le test d'interaction sociale, tous les résultats statistiques ont été décrits dans les **Tableaux 6-11**. Toutes les analyses non paramétriques sont réalisées en utilisant le logiciel R (version 3.5.0 la fondation R pour le calcul statistique avec Rcmdr-package) dans le cadre des données comportementales qui ne suivaient pas une distribution normale. Le test du Chi-squared de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer tous les groupes (noté « H » dans la section des Résultats) et le test de la somme des rangs de Wilcoxon (noté « W » dans la session des Résultats) pour comparer deux groupes indépendants. Le seuil de significativité statistique a été fixé à $p < 0,05$.

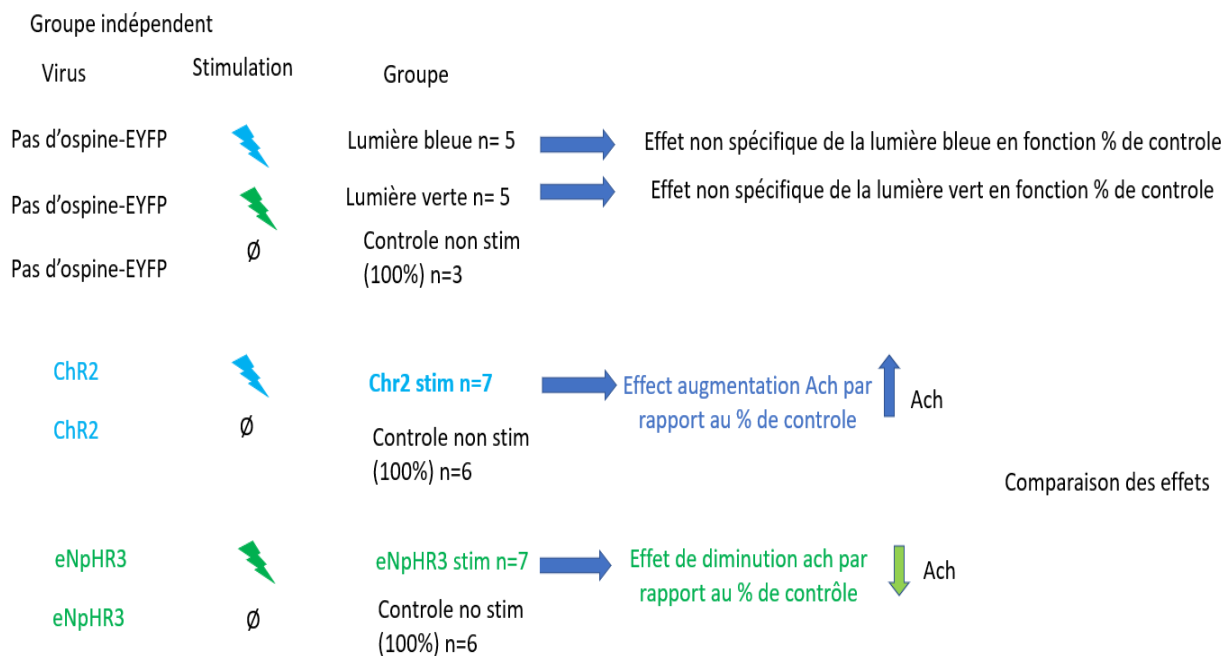


Figure 48. Stratégie utilisée pour analyser nos données. Chaque groupe de souris est indépendant. Nous avons trois virus différents (un virus qui ne contient pas d'opsine, un autre virus qui contient la ChR2 et le dernier virus qui contient l'Halorhodopsine). Les souris ayant les virus peuvent être stimulées par la lumière bleue, la lumière verte ou sans lumière. 7 groupes différents existent. Je veux voir si la lumière a un effet sur le comportement. Pour réaliser ceci, nous normalisons le groupe lumière bleue ou lumière verte en fonction du pourcentage de contrôle, c'est-à-dire, par rapport au virus ne contenant pas d'opsine qui n'est pas stimulé. Nous normalisons ensuite l'effet de la ChR2 stimulée par rapport à la ChR2 non stimulée, puis celui du eNpHR3 stimulé par rapport aux groupes non stimulés.

2.2. Résultat

2.2.1. Validation de la méthodologie optogénétique

2.2.1.1. Vérification de l'expression et diffusion du virus et localisation des emplacements des fibres optiques

Le virus exprimant la ChR2 est couplé à la mCherry, à l'Halo est à l'EYFP alors que le virus contrôle ne contenant pas d'opsine contient de l'EYFP. Le mCherry est une protéine fluorescente qui, une fois excité, émet une fluorescence dans le rouge. L'EYFP est un dérivé de la GFP et émet une fluorescente dans le vert. Normalement, grâce au système Cre-Lox, la Cre recombinase est exprimés au sein des neurones cholinergiques et ceci jusqu'aux terminaisons cholinergiques. Le but de cette expérience est de vérifier que nos virus soient bien exprimés au sein des neurones cholinergiques. Je veux d'abord vérifier l'expression du virus au niveau du site d'injection. Pour cela, une immunohistochimie avec un anticorps est réalisée, dirigée contre la ChAT (anti-ChAT). La ChAT est une protéine que l'on peut détecter au niveau du soma des neurones cholinergiques. Pour le ChR2, le mCherry émet de la fluorescente dans le rouge et l'anticorps secondaire permet de voir la ChAT en vert. En revanche, pour l'halorhodopsine ou le virus contrôle, l'EYFP émet de la fluorescente dans le vert et l'anticorps secondaire est fluorescente en rouge permettant ainsi de visualiser la ChAT. La **Figure 49 C** montre un exemple de co-localisation des neurones exprimant la ChAT et du virus ChR2 dans le NBM. Le **Tableau 5** résume les principales caractéristiques des virus et anticorps utilisés pour visualiser l'expression du virus.

Tableau 5. Résumé des principales caractéristiques permettant de visualiser le virus

Type virus	Type opsine	Stimulation	Protéine fluorescente	Visualisation ChAT dans NBM	Visualisation ChAT dans terminaison cholinergique
Virus adéno-associé	ChR2	Bleu ou pas de stimulation	M-Cherry s'exprime en rouge	Vert	Rouge
Virus adéno-associé	Halo	Vert ou pas de stimulation	EYFP s'exprime en vert	Rouge	Rouge
Virus adéno-associé	No opsine	Bleu ou vert ou pas de stimulation	EYFP s'exprime en vert	Rouge	Rouge

Dans le but de vérifier si le virus s'exprimait bien au niveau des terminaisons cholinergiques du PrL. J'ai décidé de visualiser la co-expression de la ChAT et du virus (comme pour le NBM). Mais je n'ai pas réussi à visualiser l'expression de la ChAT et ni même l'expression de mCherry et d'EYFP. Cela peut probablement s'expliquer par le fait qu'au niveau des terminaisons cholinergiques, il y ait trop peu de ChAT. Par conséquent, je n'arrive pas à la détecter dans mes expériences. J'ai alors décidé d'amplifier les protéines fluorescentes. Je peux proposer que la présence des protéines mCherry et EYFP indiquerait la présence de ces molécules au sein des terminaisons cholinergiques. Tout d'abord, grâce au système Cre-Lox, seuls les neurones exprimant la Cre recombinase devraient avoir intégré le virus et exprimer l'EYFP et le mCherry. De plus, si la diffusion du virus est observée au niveau de notre site d'injection (NBM), je peux voir que le virus reste globalement localisé au niveau du NBM (voir **Figure 50**). Donc pour la ChR2 j'utilise un anti mCherry, alors que pour l'Halorhodopsine et le contrôle j'ai utilisé un anti-GFP. La **Figure 49 B** montre un exemple de l'expression du virus dans le cortex prélimbique. Par conséquent, la ChR2 est bien exprimé dans les neurones cholinergiques et et jusqu'au niveau de leur terminaisons. 2 souris ChR2 et 1 souris Halo ont

été exclues des futures analyses car je n'étais pas parvenu, pour elles, à voir l'expression de la fluorescence ou la colocalisation de la protéine ChAT et de la protéine fluorescente.

La **Figure 50 A** montre la répartition de l'expression des protéines fluorescentes au sein du NBM et le cortex préfrontal. Nous pouvons voir si l'expression du virus dans la région d'intérêt. La **Figure 50 B** présente la localisation des canules et nous pouvons ainsi voir que chaque canule est située dans le cortex prélimbique, donc ici la modulation de l'Ach est spécifique au cortex prélimbique.

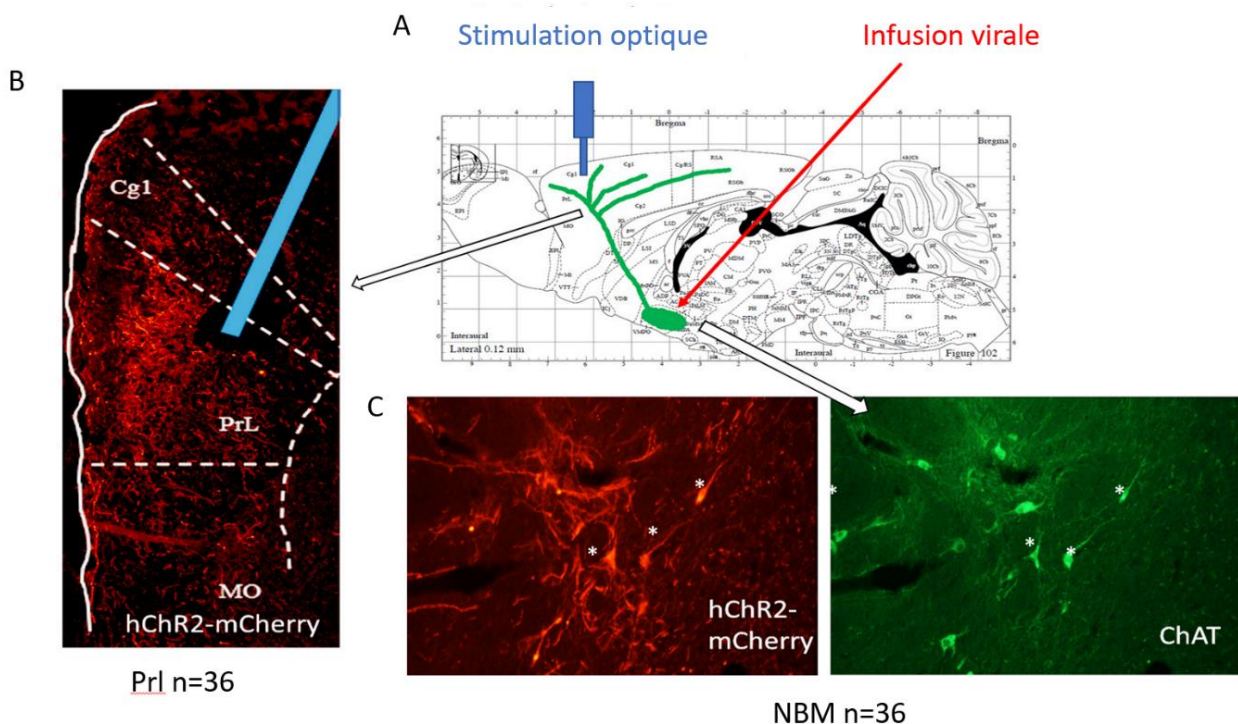


Figure 49. Validation de la méthode optogénétique Validation de la méthode optogénétique A) Représentation schématique de la localisation de l'infusion du virus (NBM) et l'aire de stimulation (prélimbique cortex). B) Exemple d'expression du m-cherry dans le cortex prélimbique. C) Exemple de co-expression de ChAT et m-cherry dans le noyau basal de meynert (NBM).

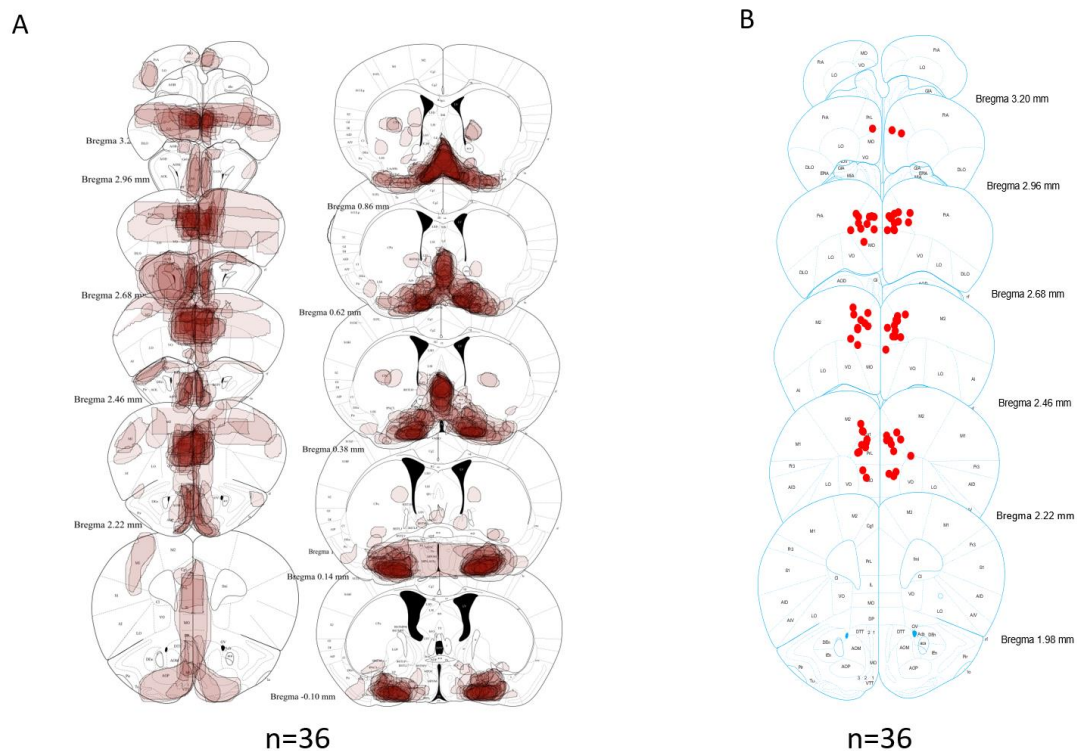


Figure 50. Validation de la méthode optogénétique (localisation du virus et de la fibre optique) A) Diffusion du virus dans le NBM et dans le cortex prélimbique. B) Localisation d'une fibre optique.

2.2.1.2. Vérification de l'effet de la stimulation optogénétique.

2.2.1.2.1. Le c-Fos

Après avoir vérifié que l'opsine s'exprimait bien au niveau du noyau basal de Meynert et des terminaisons cholinergiques du cortex préfrontal, l'injection du virus est également vérifiée en regardant la diffusion du virus ainsi que la position des fibres optiques. Dans cette partie, nous allons tester l'activité des neurones suite à la modulation de l'Ach. J'ai émis l'hypothèse que l'activité neuronale sera visible via l'expression de la protéine c-Fos. Le c-Fos est une protéine que l'on mesure pour montrer que la transcription a été déclenchée par une activité de la cellule environ 1h30 auparavant. De ce fait, la présence de la protéine c-Fos indique une activité cellulaire d'une heure et demie avant. J'ai émis l'hypothèse que la libération ou l'inhibition de l'Ach entraînerait une modification du niveau d'expression de c-Fos.

Nous allons regarder si ceci cause une différence ou non de c-Fos entre le cortex prélimbique droit stimulé par rapport au côté gauche non stimulé (voir **Figure 51 A**). De plus,

dans le but de vérifier que la modification éventuelle de l'expression de la protéine c-Fos n'est pas due à la lumière seule, des animaux, auxquels j'ai injecté le virus n'exprimant pas d'opsine, ont eux aussi été comparés aux animaux contenant une opsine stimulée. Dans le but de déterminer la spécificité de la stimulation et l'expression de la protéine c-Fos, le bulbe olfactif droit et gauche vont être également mesurés. S'il existe une différence de c-Fos dans la partie droite par rapport à la gauche, cela voudrait dire que la stimulation n'est pas du tout spécifique ou que l'activation cellulaire observée est due à autre chose. La **Figure 51 B** présente un exemple d'activation du c-Fos dans le cortex prélimbique. Les résultats du c-Fos sont montrés dans la **Figure 51 C à H**.

Pour le bulbe olfactif, aucune différence significative n'a été trouvée entre le bulbe olfactif gauche par rapport au bulbe olfactif droit (BL G vs. BL D : ChR2 : V=20, NS; Halo : V=25, NS; V=8, NS)(**Figure 51 C, E et G**). Aucune différence n'est non plus trouvée entre le Prl droit et le Prl gauche (ChR2 : V=52, NS; Halo : V=15, NS; Ctrl : V=33, NS)(**Figure 51 D, F et H**). Ces résultats montrent que le test c-Fos ne permet pas de voir d'effet de la stimulation optogénétique.

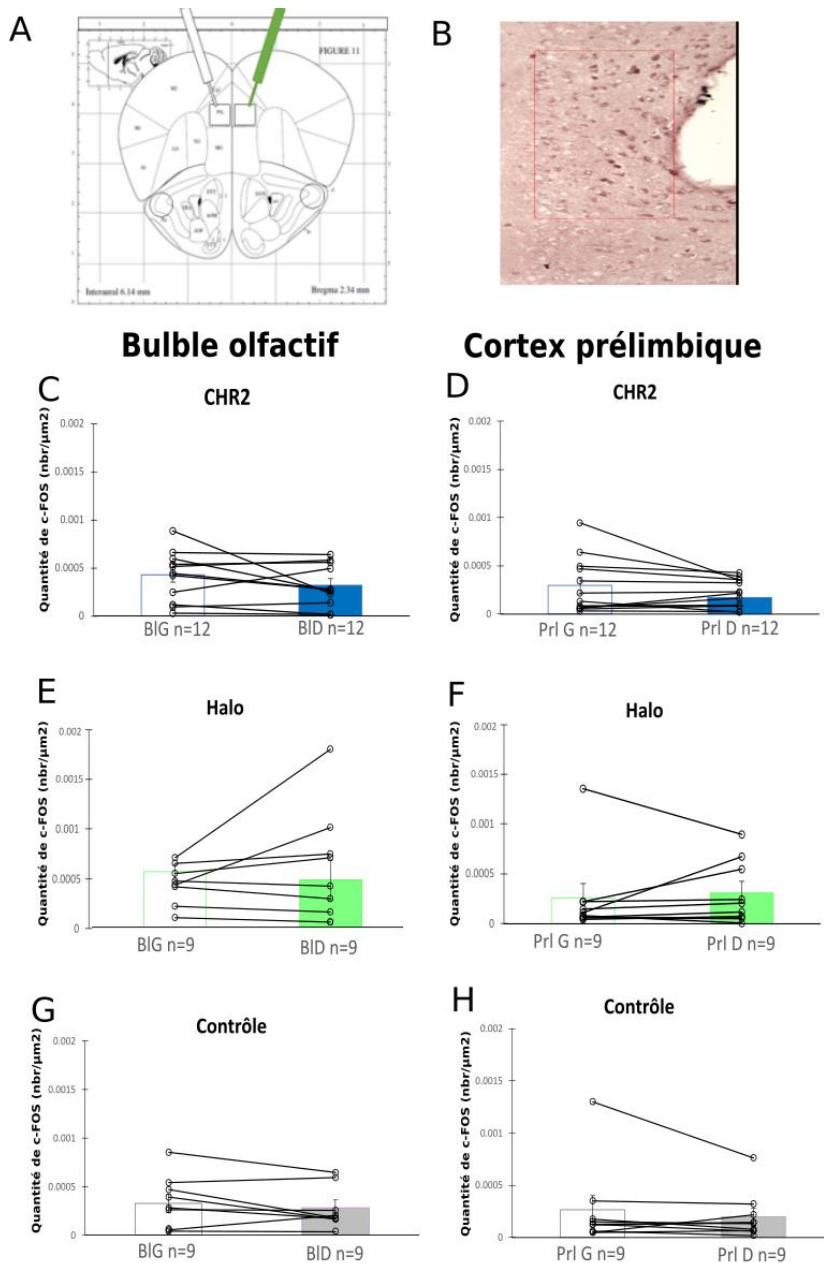


Figure 51. Les résultats du c-Fos. A) Image montrant l'emplacement des fibres optiques. En vert, est représenté la fibre optique est stimulée et en blanc, le côté non stimulé. Les carrés représentent la zone d'intérêt au niveau du cortex prélimbique. Les ronds représentent aussi la zone d'intérêt au niveau des bulbes olfactifs. B) Image représentant un résultat de c-Fos au niveau du prélimbique. C) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du bulbe olfactif pour la Chr2. D) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du prélimbique pour la Chr2. E) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du bulbe olfactif pour l'Halo. F) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du prélimbique pour l'Halo. G) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du bulbe olfactif pour le contrôle. H) Résultats de la quantité de c-Fos (nombre/ μm^2) au niveau du prélimbique pour l'Halo. Abréviations : BIG : bulbe olfactif gauche, BID : bulbe olfactif droit, Prl G : cortex prélimbique gauche, Prl D : cortex prélimbique droit.

2.2.1.2.2. La microdialyse comme mesure de la libération d'Ach

Comme le c-Fos ne m'a pas permis de voir l'impact de la libération ou une diminution de l'Ach sur le circuit, j'ai utilisé la microdialyse. C'est une technique qui permet, *in vivo*, l'échantillonnage continu de substances de faibles poids moléculaires (comme les neurotransmetteurs, leurs métabolites et les neuropeptides) dans l'espace extracellulaire de différents tissus ou organes, par exemple le cerveau, les muscles ou la peau (König et al., 2018). Cette technique permet, grâce au principe de diffusion, de collecter l'Ach. Les étapes de chirurgie et de protocole sont plus détaillées dans la partie matériel et méthode décrite un peu plus haut. Le côté gauche sera implanté uniquement de la sonde de microdialyse, ce qui constituera le côté contrôle, alors que le côté droit sera implanté de la sonde de microdialyse et de la fibre optique, permettant de stimuler les terminaisons cholinergiques. Chaque échantillon est collecté pendant 1h. Ce temps est bien supérieur aux 8 min de stimulation effectuées pendant les expériences comportementales. Cependant, il est nécessaire d'avoir une quantité d'acétylcholine suffisante pour être quantifiée car un temps inférieur à celui-là rendrait la mesure d'acétylcholine difficile car je me trouverais en-dessous du seuil de détection de l'Ach. Le professeur Jean-Marie Launay (Hôpital Lariboisière, Inserm U942) a effectué les quantifications d'Ach.

Pour les animaux Chr2, les résultats montrent que lors de la baseline, la quantité récoltée d'acétylcholine dans la partie gauche et dans la partie droite sont identiques. En revanche, après 1h de stimulation, une augmentation de l'Ach est observée uniquement au niveau du côté droit mais non au côté gauche. Cette augmentation n'est pas significative (CPF gauche baseline vs. CPF gauche stim : $V=0$; NA et CPF droite baseline vs. CPF droit stim : $V=0$, NS)(**Figure 52 A**). Pour l'Halorhodopsine, nous observons une augmentation d'Ach au niveau du CPF droit lors de la stimulation par rapport à la baseline (CPF droit baseline vs. CPF droit stim : $V=0$, $p<0.01$)(**Figure 52 B**). En revanche, au niveau du CPF gauche, aucune différence significative n'existe (CPF gauche baseline vs. CPF gauche stim : $V=1$, NS). Pour les contrôles, nous n'observons aucune différence entre la baseline et les côtés stimulés par la lumière bleue ou la lumière verte dans le CPF gauche (respectivement $V=1$, NS; $V=15$, NS)(**Figure 52 C**), ainsi que pour la lumière bleue et la lumière verte CPF droit (respectivement $V=10$, NS; $V=10$, NS)(**Figure 52 C**).

En ce qui concerne le CPF gauche, les résultats ne montrent pas de différence significative entre la baseline et le côté stimulé pour la ChR2 et l'Halo, avec lumière bleue ou verte (respectivement $W=3.5$, NS; $W=4$, NS; $W=2.5$, NS; $W=4$, NS)(**Figure 52 A-C**). En revanche, pour le CPF droit, les résultats montrent une différence significative entre le côté non stimulé et le côté stimulé pour la ChR2 et l'Halo avec lumière bleue et verte (respectivement $W=0$, $p<0.01$; $W=0$, $p<0.001$; $W=0$, $p<0.001$; $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 52 A-C**). Pris ensemble, ces résultats montrent qu'au niveau du CPF gauche, pour nos quatre groupes (ChR2, Halo, lumière bleue et lumière verte), il n'y a pas d'augmentation de la quantité d'acétylcholine après stimulation. Ce résultat indique que les stimulations sont localisées. Cependant, au niveau du CPF droit, les animaux ChR2 montrent une augmentation d'Ach. Pour les animaux Halo, une augmentation est également observée alors que je m'attendais à l'inverse à une diminution. Cependant, dans les groupes stimulés seulement par la lumière bleue et la lumière verte, on observe aussi cette augmentation de la libération d'Ach. Nous pouvons donc observer qu'il existe un effet dû à la lumière, puisque cette augmentation est visible sans opsine. Afin de contrôler cet effet non spécifique, je vais exprimer mes résultats en pourcentage d'augmentation et non en valeur absolue, afin de quantifier l'augmentation ou la diminution d'Ach par rapport à la lumière.

Ainsi, l'effet de la lumière seule sera comparé à l'effet de la lumière associé à celui de l'opsine. La quantité d'Ach mesurée dans le côté stimulé sera normalisée par rapport à la baseline du CPF droit. Si l'augmentation de la ChR2 est supérieure à son contrôle lumière bleue, cela signifie que l'effet de la ChR2 au niveau des terminaisons entraîne une libération d'Ach supérieure à la libération non spécifique liée à la lumière. De même, si l'opsine Halo exprimée dans les terminaisons permet de diminuer la libération d'Ach par hyperpolarisation par rapport à la libération non-spécifique de la lumière verte, cela signifie que l'effet de l'opsine est supérieur à l'effet de la lumière seule. Les résultats ne montrent aucune différence significative pour la ChR2 ($W=14.5$, NS)(**Figure 52 D**). En revanche, nous pouvons remarquer une différence significative pour l'Halorhodospine ($W=40$, $p<0.01$)(**Figure 52 D**). Ces résultats considérés ensemble montrent que pour l'Halo on observe bien une diminution de la libération d'Ach. En revanche, cet effet n'est pas présent pour la ChR2.

Par conséquent, la microdialyse démontre que la lumière seule permet de libérer de façon non spécifique l'Ach dans le CPF. Ceci démontre l'importance d'avoir des contrôles lumineux afin d'éviter les mauvaises interprétations des résultats comportementaux. De plus, pour les expériences de microdialyse nous avons dû stimuler 1 heure afin d'avoir une bonne quantité d'Ach. Durant nos expériences comportementales la stimulation durait 8 minutes. Nous pouvons donc supposer que l'effet non spécifique de la lumière sera moins important.

Mes résultats confirment que la stimulation de l'halorhodopsine par la lumière verte au niveau des terminaisons cholinergiques permet de diminuer la libération d'Ach, mais il reste un doute concernant l'illumination des terminaisons exprimant la Chr2 sur l'augmentation de la libération d'Ach.

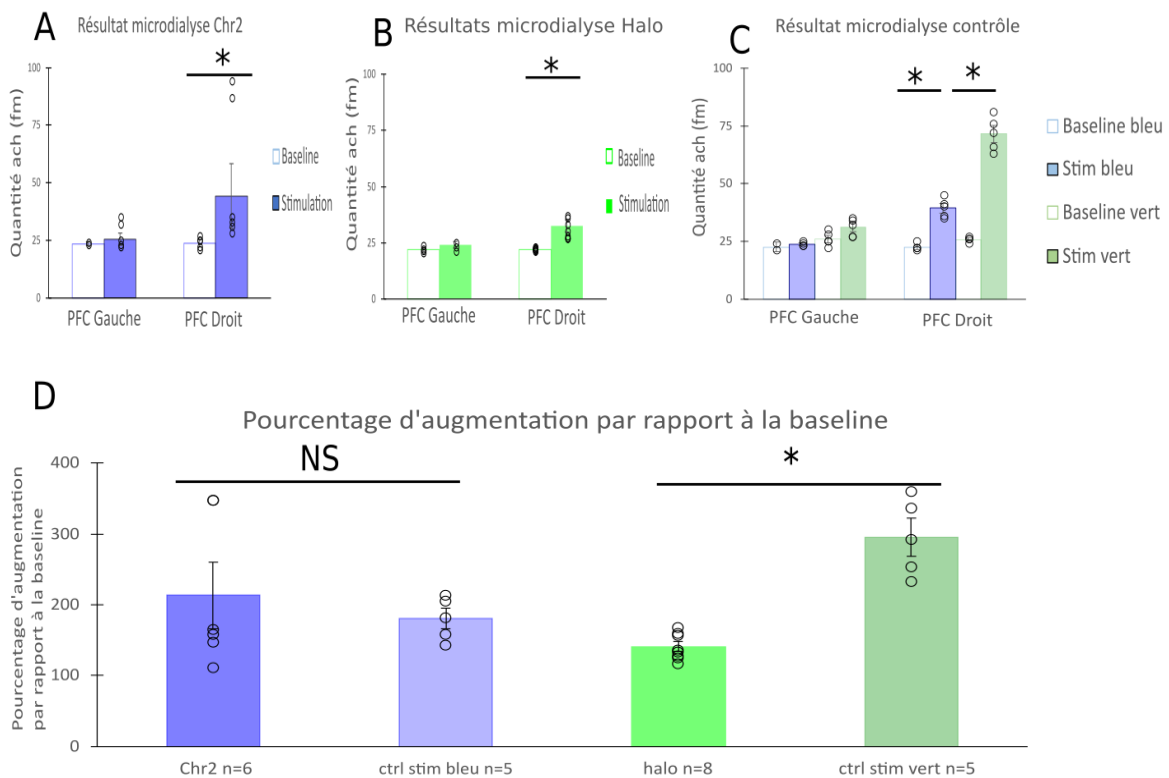


Figure 52. Résultats des dosages de microdialyse. CPF gauche est notre contrôle et le CPF droit est le côté stimulé. La baseline correspond au taux de base d'Ach avant la stimulation. Résultat du dosage de microdialyse sont montré pour la Chr2 (A), l'halorhodopsine (B) ainsi que la lumière bleue et la lumière verte (C). La figure D représente le % par rapport à la Baseline. Le nombre d'animaux utilisés pour cette expérience est le suivant chr2 n=6, halo n=8, lumière bleue n=5, lumière verte n=5. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Analyse par test des rangs et test de Wilcoxon.

2.2.2. Résultats comportementaux de la modulation d'Ach

2.2.2.1. Test de trois chambres

Le test des trois chambres est un test qui permet d'évaluer la motivation sociale de l'animal. Le but de ce test est d'étudier si la libération ou l'inhibition d'Ach influence la motivation. Durant le test des trois chambres, nous mesurerons la distance parcourue ainsi que le temps passé dans la zone sociale comparé aux zones sociales et non sociales. La **Figure 53 A** récapitule par un schéma le dispositif.

Nous n'avons observé aucun effet de la lumière (lumière bleue vs. 100 % théorique : $W=6$, NS; lumière verte : $W=4$, NS) et nous n'obtenons aucune différence significative entre le temps passé dans l'aire sociale comparée à l'aire non sociale (lumière bleue vs. 100 % théorique : $W=2$, NS; lumière verte vs. 100% théorique : $W=2$, NS)(**Figure 53 B et C**). Également, il n'y avait pas de différence significative entre la modulation de l'Ach (ChR2 ou Halo) et les groupes contrôles ramenés à 100% pour la distance totale parcourue (ChR2 : $W=15$, NS; Halo : $W=18$, NS)(**Figure 53 D**) et le temps passé dans l'arène sociale par rapport à l'arène non sociale (ChR2 : $W=25$, NS; Halo : $W=18$, NS) comparé au 100% théorique (**Figure 53 E**).

Ces résultats montrent que dans le test des trois chambres, les souris stimulées par optogénétique n'ont pas de problème de motivation sociale ni de locomotion. De plus, il n'y a pas d'effet de la lumière dans mes expériences

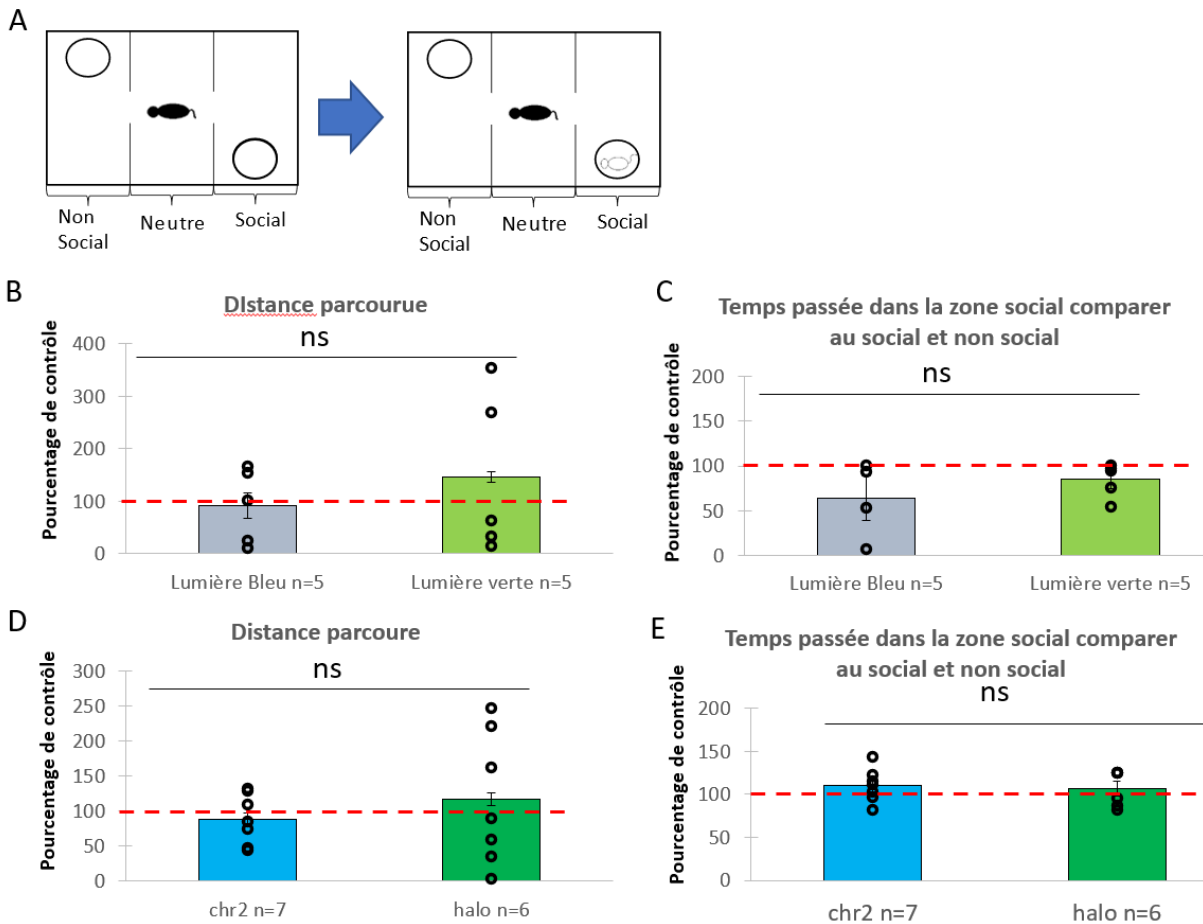


Figure 53. Résultat du test des trois chambres A) Représentation schématique du test des trois chambres B) distance parcourue dans le test du trois chambres pour les contrôles lumières C) temps passé dans l'arène sociale comparé à l'arène sociale et non sociale pour les contrôles lumières. D) Distance parcourue dans le test du trois chambres pour les Chr2 et Halo E) Temps passé dans l'arène sociale comparé à l'arène sociale non sociale pour les Chr2 et Halo. La ligne rouge représente le contrôle. J'analyse si l'effet de la modulation de l'Ach est différente du contrôle. Le nombre d'animaux utilisés pour cette expérience est Chr2 n=7 et Halo n= 6. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Analyse par test des rangs et test de Wilcoxon.

2.2.2.2. Effet lumière dans le test d'interaction sociale.

Avant d'analyser mes résultats sur l'effet de la modulation optogénétique, j'ai évalué le potentiel effet non spécifique de la lumière sur le comportement. Pour l'ensemble des résultats montrés, seules les données significatives sont retranscrites dans ce manuscrit. Les données non significatives, quant à elles, sont présentées dans les **Tableaux 7 et 8**.

Au cours des quatre premières minutes, nous pouvons voir que la lumière bleue provoque une diminution significative du nombre de contacts (contact global : $W=0$, $p<0.05$; contact oral(visiteur) - génital(hôte) : $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**) et de la position relative (le visiteur peut voir l'hôte $W=0$, $p<0.05$; le visiteur se trouve derrière l'hôte : $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**). Concernant les événements initiés par la souris hôte, la lumière bleue provoque une diminution du nombre d'échappements de l'hôte ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**). Cependant, pour les comportements initiés par la souris visiteuse, nous pouvons observer une diminution des approches du visiteur suivi d'un contact suivi d'un échappement de la souris hôte ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**). En revanche, nous n'avons pas d'effet sur les comportements de stop, ni même sur la dominance (respectivement $W=3$, NS; $W=3$, NS)(**Figure 54 A**).

Sur les quatre dernières minutes, la lumière bleue diminue le nombre de contacts proches et de contacts lointains ($W=0$, $p<0.05$; $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**). De même, nous pouvons voir une diminution de la position relative (l'hôte derrière le visiteur : $W=0$, $p<0.05$; le visiteur peut voir l'hôte : $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**). La lumière bleue montre une différence significative sur le nombre d'événements initiés par la souris visiteuse et montre notamment une diminution des échappements du visiteur comparé aux groupes contrôles non stimulés ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**). En revanche, la lumière bleue n'a pas d'effet sur la dominance ($W=12$, NS)(**Figure 54 B**) ni sur les comportements initiés par la souris hôte (voir **Table 1**).

Sur les quatre premières minutes, la lumière verte a un effet sur le nombre de comportements. En effet, nous pouvons voir une diminution du nombre de contacts (contact oral hôte génital visiteur : $W=0$, NS; contact de sens opposé : $W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**), ainsi que du nombre de stops ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 A**). Nous ne trouvons pas d'effet significatif sur la dominance, la position relative ou les événements initiés par l'hôte ou la souris visiteuse (**Tableau 7**).

Pour les quatre dernières minutes, la lumière verte provoque une diminution du nombre de contacts ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**) ainsi qu'une diminution du nombre de stops ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**). Nous pouvons aussi voir que la lumière verte provoque une diminution de la position relative où la souris hôte se trouve derrière la souris visiteuse ($W=0$, $p<0.05$)(**Figure 54 B**). En revanche, il n'y a pas de différence significative sur la dominance

($W=9$, NS), ni sur les comportements initiés par la souris hôte et la souris visiteuse comparée aux groupes contrôles non stimulés (**Tableau 7**).

Nous avons regardé dans cette partie l'effet de la lumière bleue ou verte sur le nombre et la durée des comportements. Désormais, nous allons nous intéresser à l'effet de la lumière sur la durée des comportements. Dès les quatre premières minutes, la lumière bleue a un effet sur la durée de certains comportements (**Figure 55 A**). En effet, la lumière bleue déclenche une diminution du temps de contact oral(visiteur) - génital(hôte) ($W=0$, $p<0,05$)(**Figure 55 A**), des temps de fuite de l'hôte après contact ($W=0$, $p<0,05$)(**Figure 54 C**), du visiteur sans contact ($W=15$, $p<0,05$)(**Figure 55 A**) et de l'approche avec contact du visiteur suivi de la fuite de l'hôte ($W=15$, $p<0,05$)(**Figure 55 A**). Il n'y a pas d'effet de la lumière sur la durée des stops, ni sur la dominance ou sur la position relative (voir **Tableau 8**).

Sur les quarts dernières minutes, la lumière bleue diminue la position relative (souris hôte derrière la souris visiteuse : $W=15$, $p<0,05$)(**Figure 55 B**) ainsi que les événements initiés par la souris visiteuse (fuite du visiteur après contact : $W=0$, $p<0,05$)(**Figure 55 B**). En revanche, il n'y a pas d'effet sur la durée des contacts, les stops, la dominance ou bien même sur les comportements initiés par la souris hôte (**Tableau 8**).

Sur les quarts premières minutes, la lumière verte diminue la durée des contacts (contact visiteur(oral) - génital(hôte) : $W=0$, $p<0,05$; contact de sens opposé : $W=0$, $p<0,05$)(**Figure 55 A**) ainsi que la position relative (visiteur derrière l'hôte : $W=15$, $p<0,05$)(**Figure 55 A**). En revanche, il n'y a pas d'effet de la lumière sur la durée des stops ni sur les comportements initiés par la souris hôte ou la souris visiteuse (**Tableau 8**). En ce qui concerne les quatre dernières minutes, la lumière verte n'influence pas le répertoire comportemental de la souris (**Figure 55 B**). Tous les résultats statistiques sont résumés dans le **Tableau 8**.

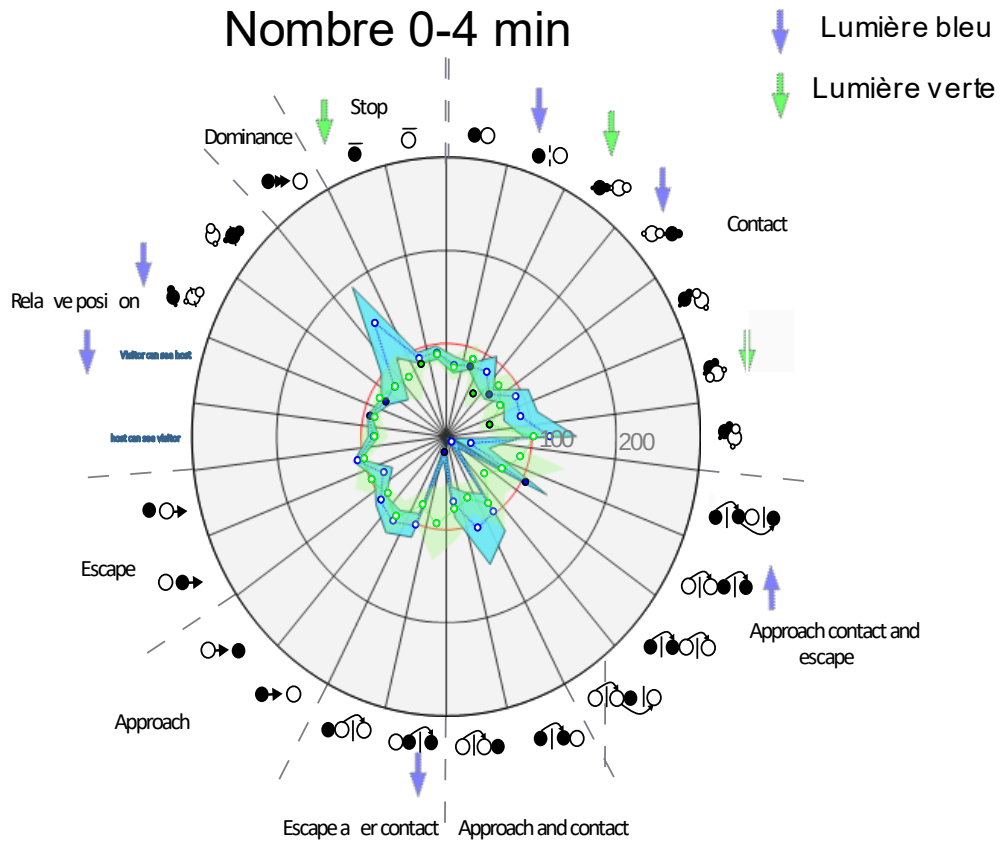
Nous pouvons en déduire que la lumière peut influencer les comportements sur le nombre d'événements ainsi que sur leur durée. Ces résultats confirment donc que la lumière peut provoquer, dans certains cas, un effet sur le comportement social. En effet, la lumière influence le contact, les stops, la position relative et l'approche d'un événement de fuite. Cet effet était particulièrement important sur le nombre d'événements mais moins sur la durée de ces événements. L'effet de la lumière est particulièrement important sur la souris visiteuse. Ces

données montrent que la souris visiteuse peut être capable d'adapter son comportement à son congénère.

De plus, nous pouvons remarquer que la lumière bleue et verte ont le même effet comportemental comme la diminution du contact social et de la position relative. Nos résultats montrent que la lumière affecte davantage les souris visiteuses, qui voient la lumière, que les souris hôtes. Les souris visiteuses vont ainsi modifier leur comportement afin de répondre à ce nouveau stimulus. Ce résultat de l'effet de la lumière peut être rapproché à celui de la lumière non spécifique observé en microdialyse, où l'on remarque une augmentation de l'Ach. Nous ne pouvons donc pas exclure un effet non spécifique sur la libération d'Ach provoqué par la lumière. Cependant, cet effet observé en microdialyse, nécessite une stimulation bien plus longue que celle utilisée en comportement. Ainsi, il reste à étudier dans le futur, l'efficacité de cet effet de la lumière, tant sur le plan des mécanismes impliqués que sur sa dynamique temporelle.

Pour suivre l'analyse de la modulation de l'Ach sur le comportement social, je dois considérer l'effet de lumière. Ainsi, si nous observons un effet de la lumière et de l'opsine sur le même comportement, deux possibilités se présentent. Si l'effet de la lumière seule et celui de la lumière + opsine vont dans la même direction, nous ne pouvons pas discriminer si l'effet est dû à la lumière ou bien à la modulation d'Ach. Je ne peux donc pas conclure sur mes résultats. En revanche, si les effets de la lumière seule et de la lumière + opsine vont dans des sens opposés, l'effet de l'opsine sera supérieur à celui de la lumière et je pourrais alors conclure sur cet effet.

A



B

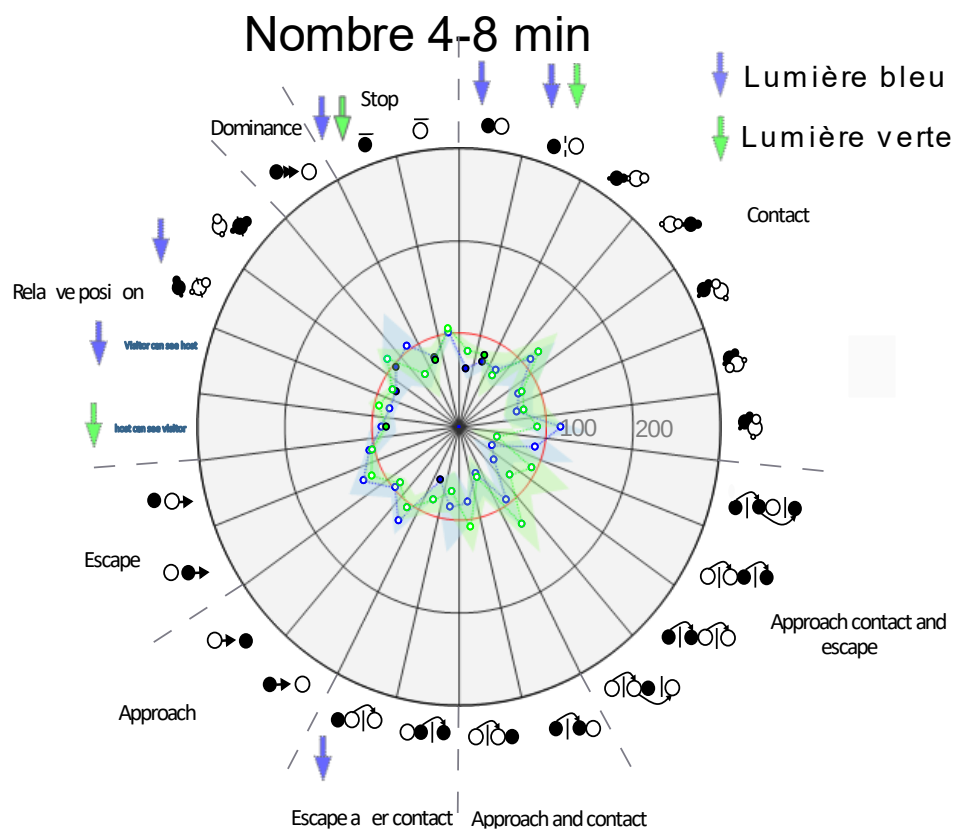
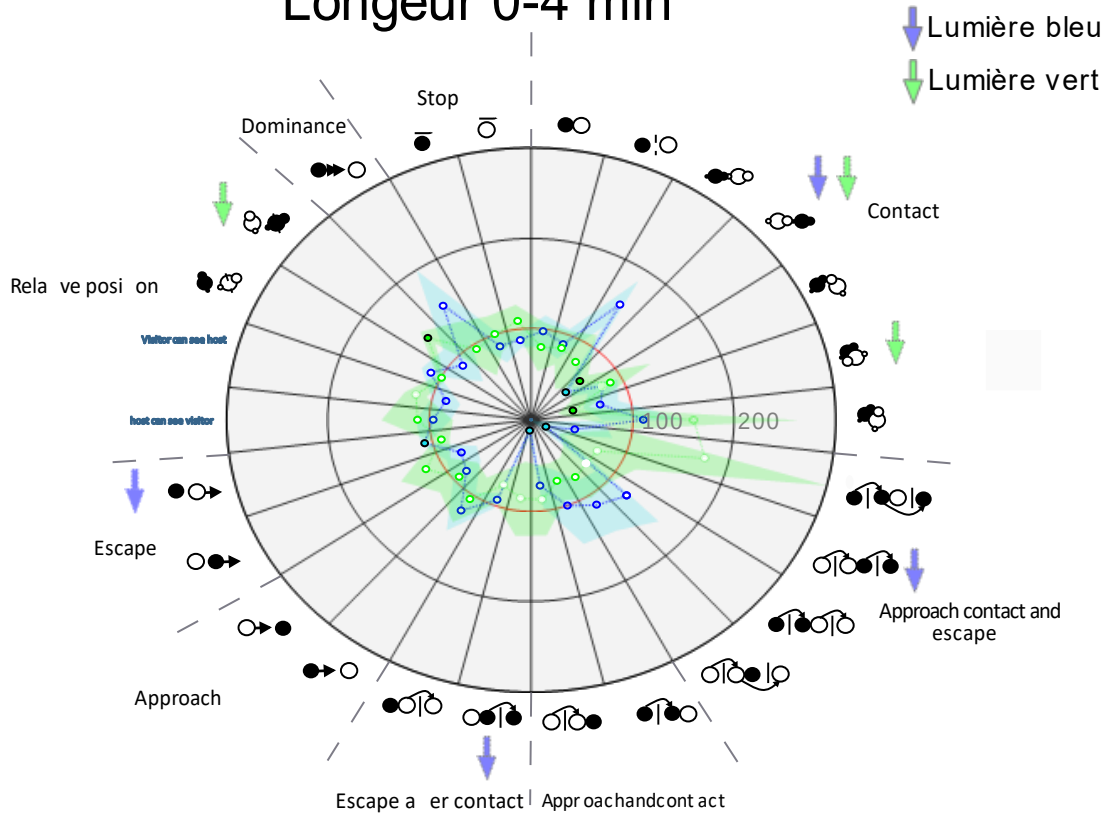


Figure 54. Effet de la lumière sur le nombre d'interactions sociales. A) Effet de la lumière sur le nombre d'évènements durant les 4 premières minutes de l'interaction sociale. B) Effet de la lumière sur le nombre d'évènements durant les quatre dernières minutes de l'interaction sociale. Chaque partie du cercle représente le comportement enregistré lors de l'interaction sociale. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle que l'on met à 100%. Cela permet de comparer les Halo et les ChR2. Les gros points bleus représentent la différence significative entre le 100% et la ChR2. Les gros points verts représentent la différence significative entre le 100% et l'Halorhodopsine. Les flèches bleues représentent les résultats significatifs du groupe lumière bleue et les flèches vertes représentent les résultats significatifs de l'effet lumière verte.

A

Longeur 0-4 min



B

Longeur 4-8 min

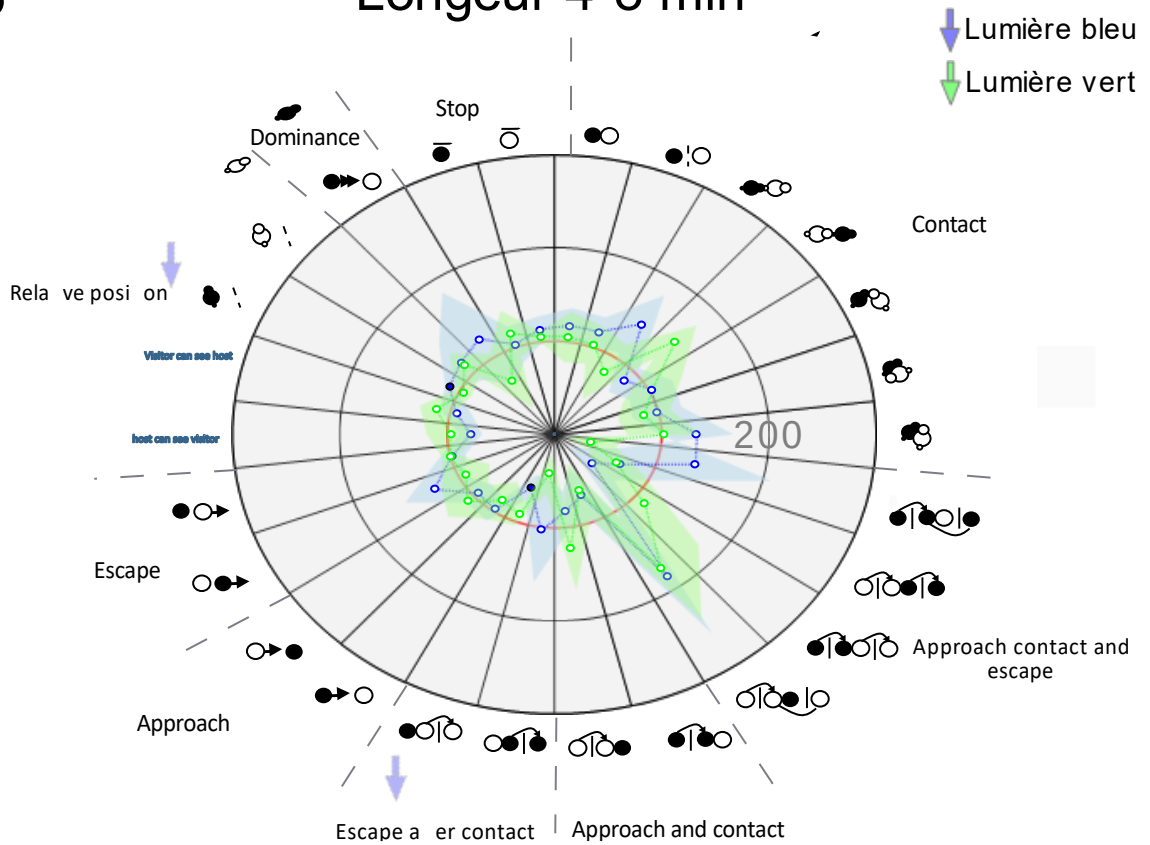


Figure 55. Effet de la lumière sur la durée de l'interaction sociale. A) Effet de la lumière sur la durée des événements pour les quatre premières minutes de l'interaction sociale. B) Effet de la lumière sur la durée des événements pour les quatre dernières minutes de l'interaction sociale. Chaque partie du cercle représente le comportement enregistré lors de l'interaction sociale. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle que l'on met à 100% ce qui permet de comparer les Halo aux ChR2. La couleur bleue représente la ChR2 et la couleur verte représente l'Halorhodopsine. Les gros points bleus représentent la différence significative entre le 100% et la ChR2. Les gros points verts représentent la différence significative entre le 100% et l'Halorhodopsine. Les flèches bleues représentent les résultats significatifs du groupe lumière bleue et les flèches vertes représentent le résultat significatif de l'effet lumière verte.

2.2.2.3. Effet de la modulation d'Ach sur le comportement social

Pour l'ensemble des résultats présentés, seules les données significatives sont retranscrites dans mon manuscrit. Les données non significatives sont présentées dans le **Tableau 9 et 10**.

En ce qui concerne les quatre premières minutes, pour le nombre d'événements, nous pouvons observer que la libération d'Ach diminue les contacts sociaux (contact oral-oral : $W=6$, $p<0.05$; contacts opposés : $W=0$, $p<0.01$), les stops de l'hôte ($W=6$, $p<0.05$) mais augmente les stops du visiteur ($W=30$, $p<0.05$). Nous pouvons également voir une diminution des événements initiés par la souris hôte (approche suivie d'un contact : $W=6$, $p<0.05$), l'approche de l'hôte suivie d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte ($W=6$, $p<0.05$), l'échappement de l'hôte après un contact ($W=6$, $p<0.05$)(**Figure 56 A**). En revanche, il n'y a pas d'effet sur la dominance, sur la position relative ni sur les événements initiés par l'hôte (**Figure 56 A, Tableau 9**).

Pour les quatre dernières minutes, la libération d'Ach a un effet sur le nombre d'événements. En effet, nous pouvons observer une diminution des contacts (oral(hôte) - génital(visiteur) : $W=6$, $p<0.05$; oral(visiteur) - génital(hôte) : $W=6$, $p<0.05$), des stops de l'hôte ($W=6$, $p<0.05$), de la dominance ($W=6$, $p<0.05$) et de la position relative (visiteur derrière hôte : $W=6$, $p<0.05$). Également, nous observons une diminution des comportements initiés pas la souris hôte (approche de l'hôte suivie d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte : $W=6$, $p<0.05$; approche sans contact : $W=6$, $p<0.05$; échappement sans contact : $W=6$, $p<0.05$). Pour les comportements initiés par la souris visiteuse nous avons une diminution (approche avec

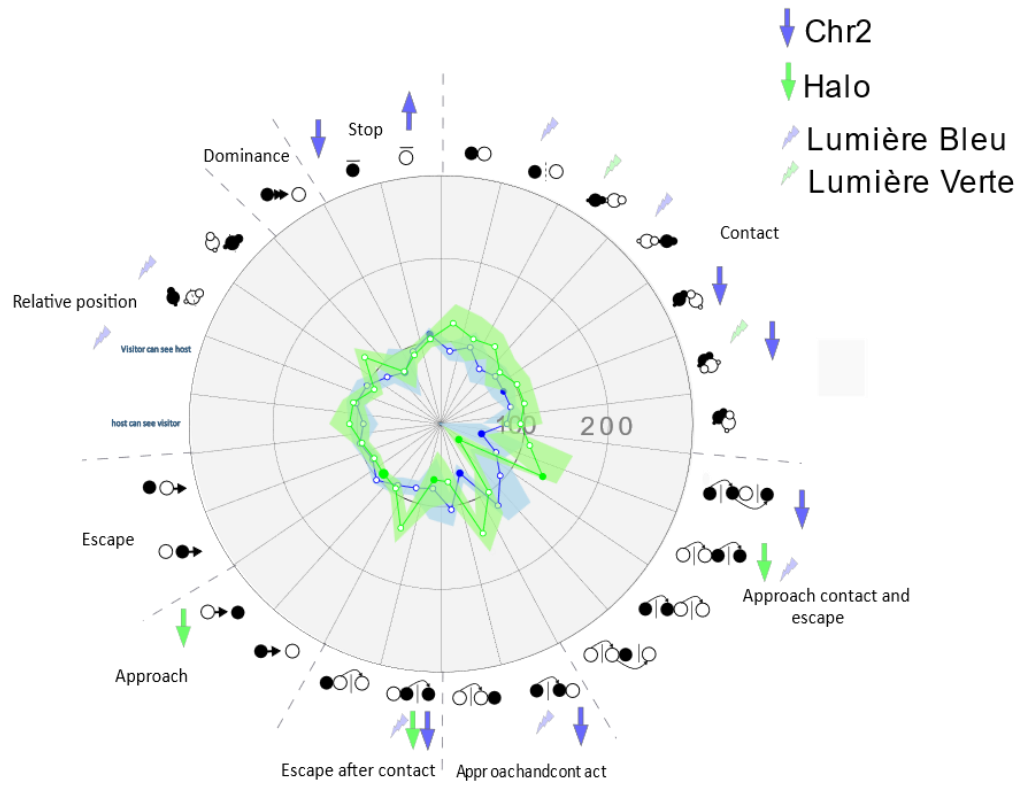
contact : $W=0$, $p<0.05$) notamment des approches de la souris visiteuse sans contact ($W=0$, $p<0.01$)(**Figure 56 B**). En revanche, il n'y a pas d'effet sur les stops du visiteur (**Figure 56 B, Tableau 9**).

En ce qui concerne le blocage de la libération d'Ach, elle a un effet sur le nombre d'événements pour les quatre premières minutes. Nous pouvons voir une diminution des événements initiés par la souris hôte (échappement après un contact : $W=6$, $p<0.05$) ainsi qu'une diminution pour les événements initiés par la souris visiteuse (approche sans contact : $W=6$, $p<0.05$), des approches du visiteur suivies d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte ($W=6$, $p<0.05$)(**Figure 56 A**). En revanche, nous n'avons pas d'effet sur les contacts, les stops, la dominance ni sur la position relative (**Figure 56 A, Tableau 9**).

Pour les quatre dernières minutes concernant le nombre d'événements, nous pouvons voir que le blocage de la libération d'Ach entraîne une augmentation des contacts (oral(hôte) - génital(visiteur) : $W=36$, $p<0.05$; oral(visiteur) - génital(hôte) : $W=36$, $p<0.05$; contact de sens opposé : $W=36$, $p<0.05$). Nous avons une augmentation des événements initiés par la souris hôte (approche avec contact : $W=36$, $p<0.05$; approche sans contact : $W=36$, $p<0.05$; approche de la souris hôte suivie d'un contact suivi de l'échappement du visiteur : $W=36$, $p<0.05$) ainsi qu'une augmentation des échappements du visiteur après un contact ($W=36$, $p<0.05$)(**Figure 56 B**). En revanche, il n'y avait pas d'effet sur les stops, la dominance ni sur la position relative (**Figure 56 B, voir Tableau 9**).

A

Nombre 0-4 min



B

Nombre 4-8 min

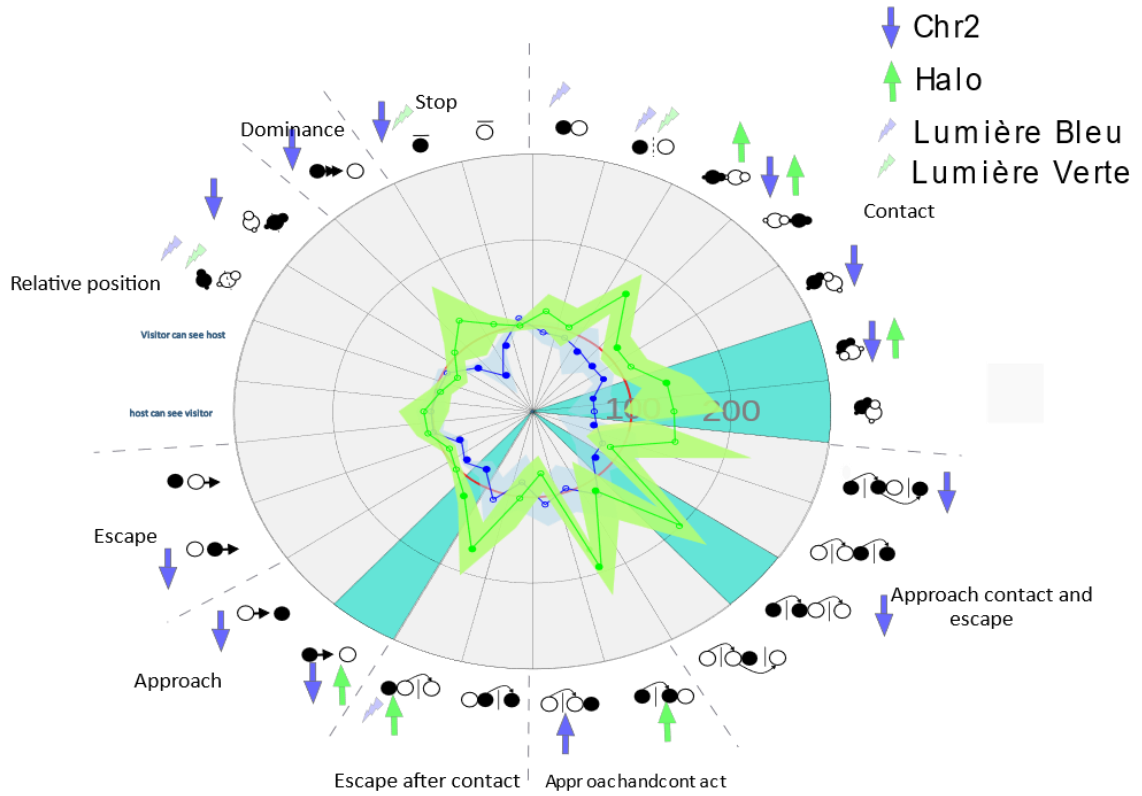
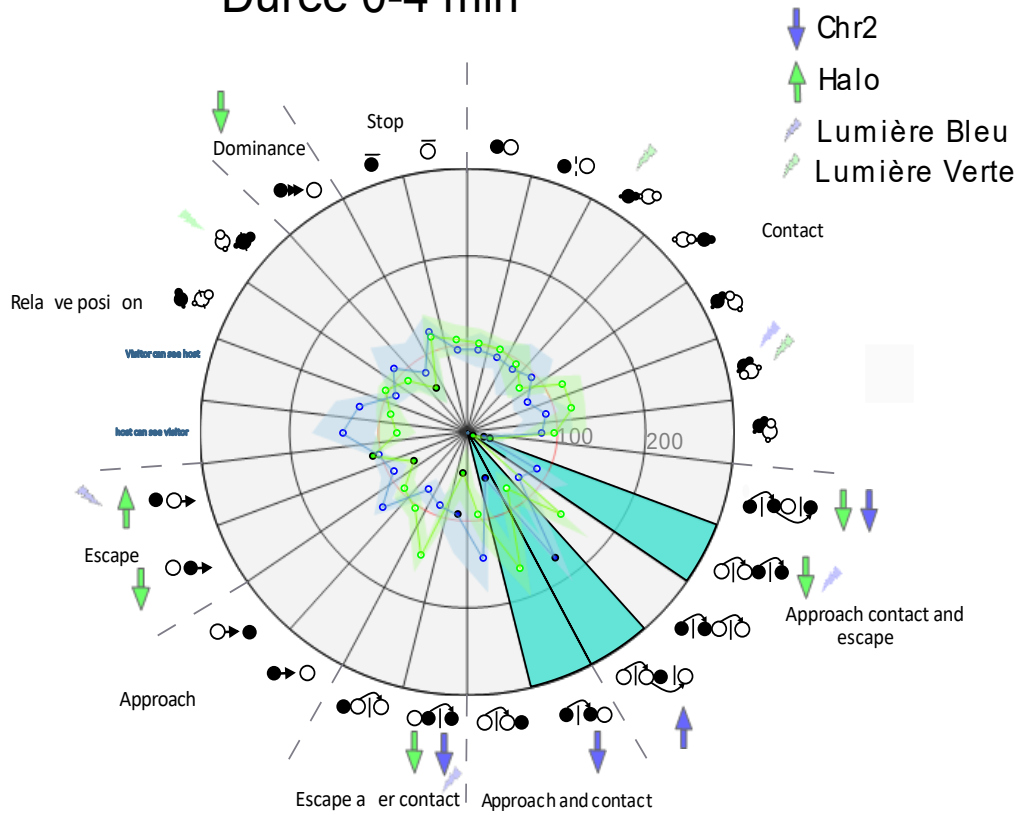


Figure 56. Modulation de l'Ach sur le nombre de comportement durant l'interaction

sociale. A) Modulation de l'Ach sur le nombre d'événements pour les quatre premières minutes de l'interaction sociale. B) Modulation de l'Ach sur le nombre d'événements pour les quatre dernières minutes de l'interaction sociale. Chaque partie du cercle représente le comportement enregistré lors de l'interaction sociale. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle que l'on met à 100%, ce qui permet de comparer les Halo et les Chr2. Le gros point bleu représente la différence significative entre le 100% et la Chr2 et le gros point vert représente la différence significative entre le 100% et l'Halo, la couleur cyan représentant une différence significative entre la libération d'Ach et l'inhibition d'Ach. L'éclair bleu résume les résultats significatifs de la lumière bleue et la flèche verte résume les résultats significatifs de la lumière verte.

A

Durée 0-4 min



B

Durée 4-8 min

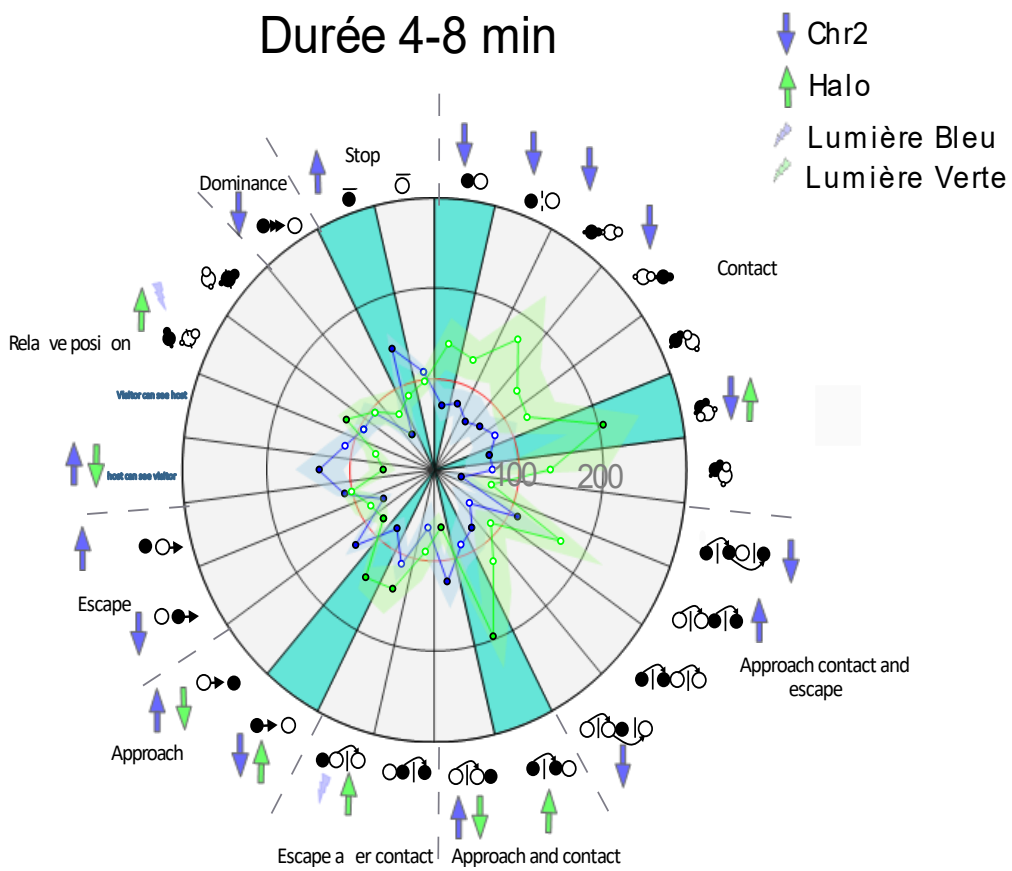


Figure 57. Modulation de l'Ach sur la durée des comportement durant l'interaction

sociale. A) Modulation de l'Ach sur la durée de l'événement sur les quatre premières minutes de l'interaction sociale B) Modulation de l'Ach sur la durée de l'événement sur les quatre dernières minutes de l'interaction sociale. Chaque partie du cercle représente le comportement enregistré lors de l'interaction sociale.. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle (groupe non stim) que l'on met à 100% . Cela permet de comparer les Halo et les channels. Le gros point bleu représente la différence significative entre le 100% et la ChR2 et le gros point vert représente la différence significative entre le 100% et l'Halo, la couleur cyan représente une différence significative entre la libération d'Ach et l'inhibition d'Ach. L'éclair bleu résume les résultats significatifs de la lumière bleue et la flèche verte résume les résultats significatifs de la lumière verte.

En ce qui concerne les quatre premières minutes, la libération de l'Ach provoque une diminution de la position relative (comportement dos à dos : $W=6, p<0,05$)(**Tableau 10**). Nous pouvons aussi observer une diminution des comportements initiés par la souris hôte : les approches se finissant par un contact sont diminuées ($W=0, p<0,01$), ainsi que la fuite après un contact ($W=6, p<0,05$) et l'approche de l'hôte suivie d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte ($W=6, p<0,05$). Nous observons également une augmentation des comportements initiés par la souris visiteuse (approche de la souris visiteuse suivie d'un contact suivi de l'échappement du visiteur : ($W=30, p<0,05$)(**Figure 57 A**). En revanche, nous n'observons pas de différence pour la durée des contacts, les stops ni sur la dominance (**Figure 57 A, Tableau 10**).

Pour les quatre dernières minutes, la libération d'Ach provoque une diminution des contacts proches, loins, du contact oral(visiteur) - génital(hôte), du contact génital(visiteur) - oral(hôte) et du contact de sens opposé (respectivement $W=6, p<0,05$; $W=6, p<0,05$; $W=6, p<0,05$; $W=6, p<0,05$; $W=6, p<0,05$)(**Figure 57 B**). Nous observons également une augmentation des stops ($W=30, p<0,05$)(**Figure 57 B**) ainsi qu'une diminution de la dominance (hôte poursuit le visiteur : $W=6, p<0,05$)(**Figure 57 B**), des « paw control » ($W=6, p<0,05$)(**Tableau 10**), des comportements dos à dos et lorsque l'hôte peut voir l'autre (respectivement $W=0, p<0,01$; $W=30, p<0,05$)(**Tableau 10**). une diminution des comportements initiés par l'hôte est observée (approche de l'hôte : $W=6, p<0,05$; fuite de l'autre : $W=6, p<0,05$; approche de l'hôte puis contact suivi de la fuite de l'hôte : $W=0, p<0,01$)(**Figure 57 B**). Pour les comportements initiés par la souris visiteuse nous remarquons une augmentation des approches avec ou sans contact (respectivement $W=30, p<0,05$; $W=30,$

$p < 0.05$) ainsi qu'une augmentation de l'approche avec contact suivie de la fuite de la souris hôte ($W=6$, $p < 0.05$). Également, nous obtenons une diminution de l'approche contact du visiteur et de la fuite du visiteur ($W=6$, $p < 0.05$) ainsi qu'une diminution de la fuite du visiteur sans contact au préalable ($W=30$, $p < 0.05$)(**Figure 57 B**). Tous les résultats sont résumés dans les **Tableaux 9** et **10**. Pour conclure, l'effet de la libération d'Ach sur le comportement social déclenche moins d'approche et de fuite de l'hôte, mais plus d'approche et de fuite du visiteur, ce qui s'accompagne d'une diminution de la dominance de l'hôte et la présence davantage de stops de l'hôte.

Lorsque l'on observe les quatre premières minutes, l'inhibition de l'Ach provoque une diminution de la dominance (hôte suit visiteur : $W=6$, $p < 0.05$). Pour les comportements initiés par la souris hôte on obtient une diminution des approches de l'hôte suivie d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte ($W=0$, $p < 0.01$) ainsi qu'une diminution de l'échappement de l'hôte après le contact ($W=6$, $p < 0.05$) ou sans contact ($W=0$, $p < 0.01$). Concernant les comportements initiés par le visiteur, nous observons moins d'approche contact suivie de la fuite du visiteur suivi de la fuite de l'hôte ($W=0$, $p < 0.01$) et davantage de fuite du visiteur après contact ($W=36$, $p < 0.05$)(**Figure 57 A**). En revanche, il n'y a aucun effet sur la durée des contacts, des stops ni sur la position relative (**Figure 57 A, Tableau 10**).

Sur les quatre dernières minutes, l'inhibition de l'Ach déclenche un effet spécifique sur la durée du comportement. En effet, nous avons une augmentation du contact (contact de sens opposé : $W=36$, $p < 0.05$)(**Figure 57 B**). Pour la position relative, nous obtenons une augmentation de la souris hôte derrière le visiteur ($W=36$, $p < 0.05$) ainsi qu'une diminution de l'hôte peut voir le visiteur ($W=6$, $p < 0.05$). Concernant l'événement initié par l'hôte, l'inhibition de la libération de l'Ach déclenche plus d'approche de l'hôte avec contact ($W=36$, $p < 0.05$) ou sans contact ($W=42$, $p < 0.01$)(**Figure 57 B**). Pour l'événement initié par le visiteur, nous observons moins d'approche du visiteur avec contact ($W=6$, $p < 0.05$) et sans contact ($W=6$, $p < 0.05$) ainsi qu'une augmentation de la fuite du visiteur après contact ($W=42$, $p < 0.05$)(**Figure 57 B**). En revanche, il n'y a aucune différence significative sur la durée des stops ni sur la dominance (**Figure 57 B, Tableau 10**).

Ainsi, l'inhibition de la libération d'Ach déclenche davantage d'approches et moins de fuite de l'hôte, mais moins d'approches et plus de fuites du visiteur.

Le logiciel MiceProfiler utilisé pour analyser le comportement social permet aussi de calculer la vitesse et la distance pour chaque animal.

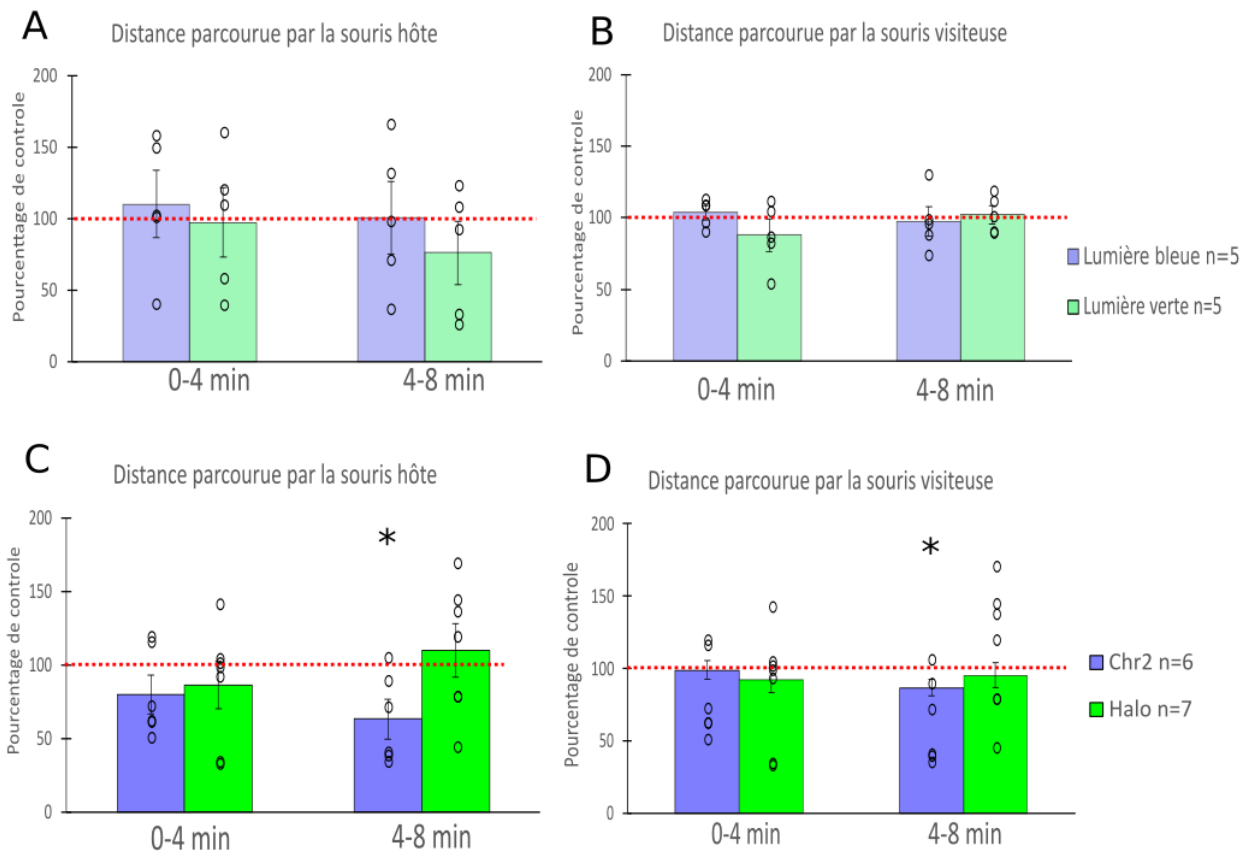


Figure 58. Distance parcourue par la souris hôte et la souris visiteuse dans le SIT. A) Distance parcourue par la souris hôte pour les groupes lumière bleue et lumière verte. B) Distance parcourue par la souris visiteuse pour les groupes lumière bleue et lumière verte. C) Distance parcourue par la souris hôte pour les groupes Chr2 et Halo. D) Distance parcourue par la souris visiteuse pour les groupes Chr2 et Halo. Le nombre d'animaux utilisés pour cette expérience est de : lumière bleue (n=5), lumière verte (n=5), Chr2 (n=6) et Halo (n=7). La ligne rouge représente le 100% théorique. Les données sont présentées sous forme de moyennes \pm SE. Indications : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Analyse par test des rangs et test de Wilcoxon.

Lorsque l'on observe les quatre premières minutes, la distance parcourue par la souris hôte ou la souris visiteuse ne sont pas significativement différentes pour la lumière bleue comparée au pourcentage de contrôle (souris hôte : $W=12$, NS; souris visiteuse : $W=9$, NS) ni pour la lumière verte comparée au pourcentage de contrôle (souris hôte : $W=9$, NS; souris visiteuse : $W=6$, NS)(Figure 57 A et B). En ce qui concerne les quatre dernière minutes, la distance parcourue par la souris hôte ou la souris visiteuse ne sont pas significativement différentes pour la lumière bleue comparée au pourcentage de contrôle (souris hôte : $W=6$,

NS; souris visiteuse : $W=3$, NS) ni pour la lumière verte comparée au pourcentage de contrôle (souris hôte : $W=6$, NS; souris visiteuse : $W=9$, NS)(**Figure 57 A et B**). Ensemble, ces données démontrent que la lumière bleue ou verte ne provoque pas de problème locomoteur.

Les souris ChR2 n'ont pas de trouble locomoteur sur les quatre premières minutes (souris hôte : $W=12$, NS; souris visiteuse : $W=18$, NS), cependant, sur les quatre dernières minutes, on observe une diminution de la distance parcourue pour la souris hôte ($W=6$, $p<0,05$) ainsi que pour la souris visiteuse ($W=6$, $p<0,05$)(**Figure 58 C et D**).

Les souris Halorhodopsines n'ont pas de trouble locomoteur sur les quatre premières minutes (souris hôte : $W=12$, NS; souris visiteuse : $W=14$, NS)(**Figure 58 C et D**). Nous obtenons le même effet pour les quatre dernières minutes (souris hôte : $W=28$, NS; souris visiteuse : $W=21$, NS)(**Figure 58 C et D**).

L'ensemble des résultats comportementaux montre que la libération d'Ach provoque, pour la souris hôte, une diminution du temps de contact, des approches, des fuites, de la dominance et de la vitesse de déplacement ainsi qu'une augmentation des stops. Pour la souris visiteuse, nous observons une augmentation des approches et des comportements de fuite. Le blocage de la libération d'Ach provoque une augmentation des contacts ainsi qu'une augmentation des approches ainsi qu'une diminution de la dominance et de l'échappement de la souris hôte. Pour la souris visiteuse, on peut voir une diminution des approches ainsi qu'une augmentation des fuites. Le **Tableau 6** résume les principaux résultats comportementaux présentés jusqu'ici. Dans ces résultats, nous pouvons remarquer que la modulation d'Ach, réalisée uniquement chez la souris hôte, perturbe aussi le comportement du visiteur. Ceci renforce les résultats obtenus précédemment au laboratoire et confirme que le comportement de la souris visiteuse s'adapte à l'hôte (Nosjean et al., 2015).

Tableau 6. Résumé des principales données comportementales. A) Tableau résumant les effet sur les nombres pour les Chr2, B) Tableau résumant les effet sur les nombres pour Halo, C) Tableau résumant les effet sur les durées pour les Chr2, D) Tableau résumant les effet sur les durées pour Halo

		Nombre				Nombre	
A	Chr2	Hôte	Visiteur	B	Halo	Hôte	Visiteur
	Contact	Diminution			Contact	Augmentation	
	Approche	↓	↓		Approche	↑	↓
	Fuite	↓	NS		Fuite	NS	↑
	Stop	↓	↑		Stop	NS	NS
	Dominance	NS	NA		Dominance	NS	NS
	Motivation	NS	NA		Motivation	NS	NS
		Durée				Durée	
C	Chr2	Hôte	Visiteur	D	Halo	Hôte	Visiteur
	Contact	Diminution			Contact	Augmentation	
	Approche	↓	↑		Approche	↑	↓
	Fuite	↓	↑		Fuite	↓	↑
	Stop	↑	NS		Stop	NS	NS
	Dominance	↓	NA		Dominance	↓	NA
	Motivation	NS	NA		Motivation	NS	NA

2.2.2.4. Vocalisation ultrasonique

Nous avons vu jusqu'à présent les principaux effets de la libération d'Ach sur le comportement. Désormais, nous allons nous intéresser à l'effet de la modulation d'Ach sur les USVs. Les USVs sont émises lors de l'interaction sociale et constituent un marqueur de l'état émotionnel de l'animal qui les émet (Chabout et al., 2012, 2013). Des études précédentes au laboratoire ont montré une corrélation entre le nombre d'USVs et le temps de contact (Chabout et al., 2012). Les résultats obtenus ici montrent cette même corrélation entre le temps de contact et le nombre d'USVs ($t=2.13$, $df=34$, $p<0.05$)(**Figure 59**). Ainsi, plus le temps passé en contact social est long, plus la souris émet un nombre d'USVs important. En ce sens, des données chez la souris ont montré que l'émission d'un plus grand nombre d'USVs ainsi que l'augmentation des fréquences représentent un état émotionnel plus positif (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020). Sur tous les paramètres mesurés de fréquence maximale et minimale, de durée moyenne et de bande de fréquence, nous n'obtenons pas d'effet de lumière par la lumière bleue (nombre d'USVs : $W=8$, NS; fréquence maximale : $W=8$, NS; fréquence minimale : $W=6$, NS; bande de fréquence : $W=8$, NS; durée moyenne d'une USV :

W=6, NS)(**Figure 60**) ni par la lumière verte (nombre d'USVs : W=8, NS; fréquence maximale : W=8, NS; fréquence minimale : W=8, NS; bande de fréquence : W=8, NS; durée moyenne d'une USV : W=4, NS)(**Figure 60**). Les résultats montrent que pour la libération d'Ach, les USVs sont émises à une fréquence plus importante par rapport aux contrôles (W=25, $p < 0.01$)(**Figure 61 B**) même s'il n'y a pas de différence sur le nombre, la fréquence minimale, la largeur de bande de fréquence ni sur la durée moyenne suite à la libération d'Ach (respectivement W=25.5, NS; W=20, NS; W=20, NS; W=20, NS)(**Figure 61 A et C-E**). Pour l'inhibition de la libération de l'Ach, il n'y a pas de différence significative sur le nombre d'USVs, sur leurs fréquences maximale et minimale ni sur leur durée moyenne et leur bande de fréquence (W=15, NS; W=15, NS; W=15, NS; W=10, NS; W=15, NS)(**Figure 61**). Pour conclure, ces données démontrent que la libération d'Ach déclenche une fréquence d'appel plus élevée.

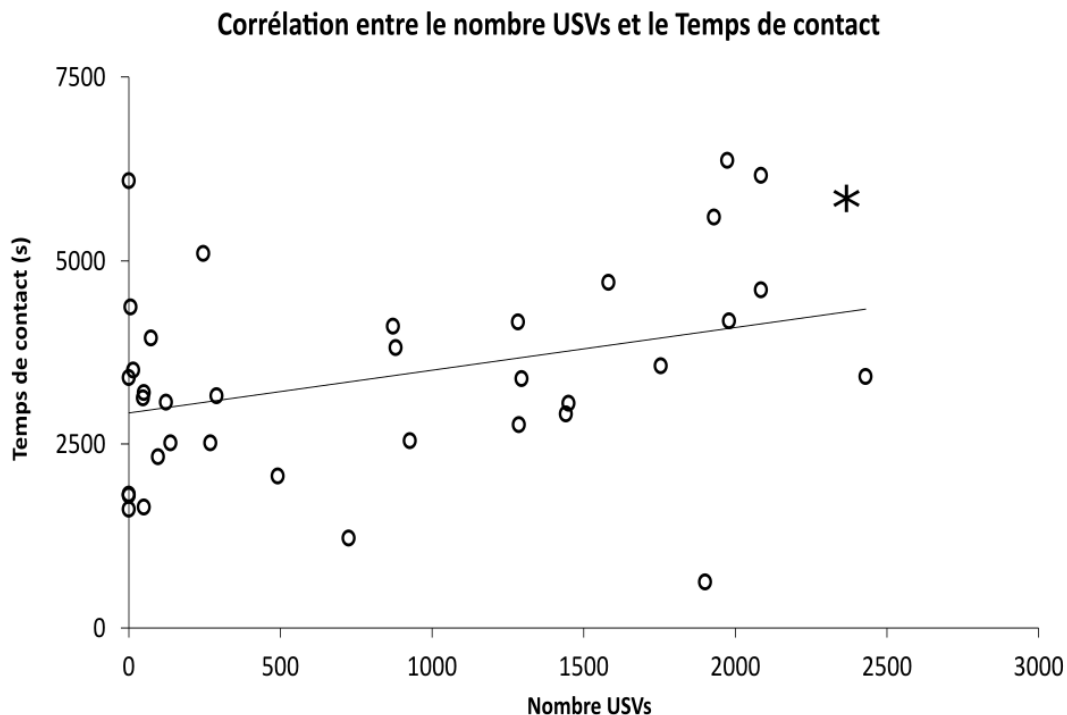


Figure 59. Corrélation entre le nombre d'USV et le temps de contact. $p < 0.05$, test de spearman réalisé.

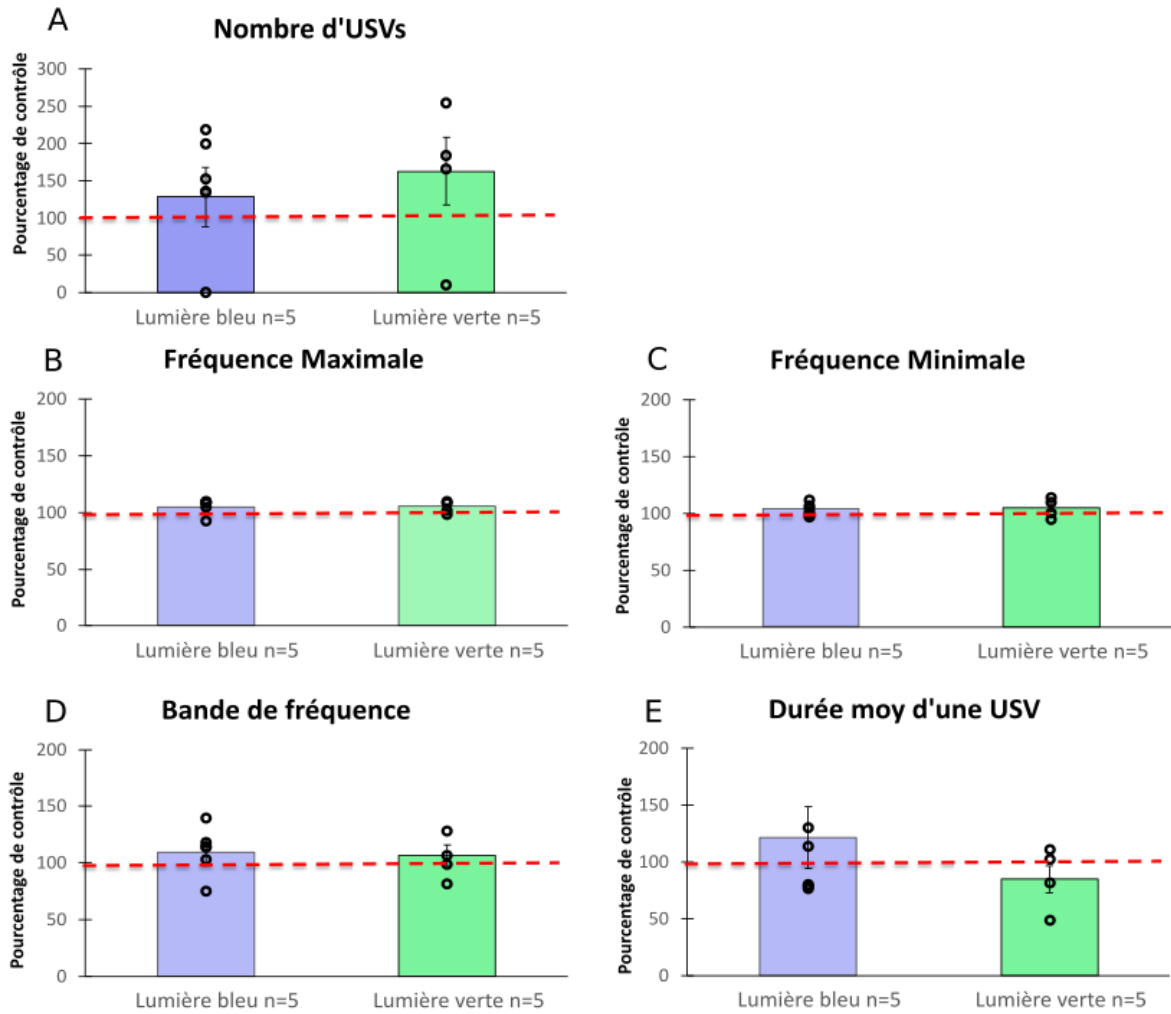


Figure 60. Vocalisation ultrasonique des lumières bleues et des lumières vertes. A) Nombre de vocalisations. B) Fréquence maximale des USVs. C) Fréquence minimale. D) Bande de fréquence des vocalisations. E) Durée moyenne d'une vocalisation. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle (groupe non stim) que l'on met à 100%. L'indication « * » représente une différence significative entre la libération de l'Ach et la moyenne du groupe contrôle (groupe non stim) que l'on met à 100%.

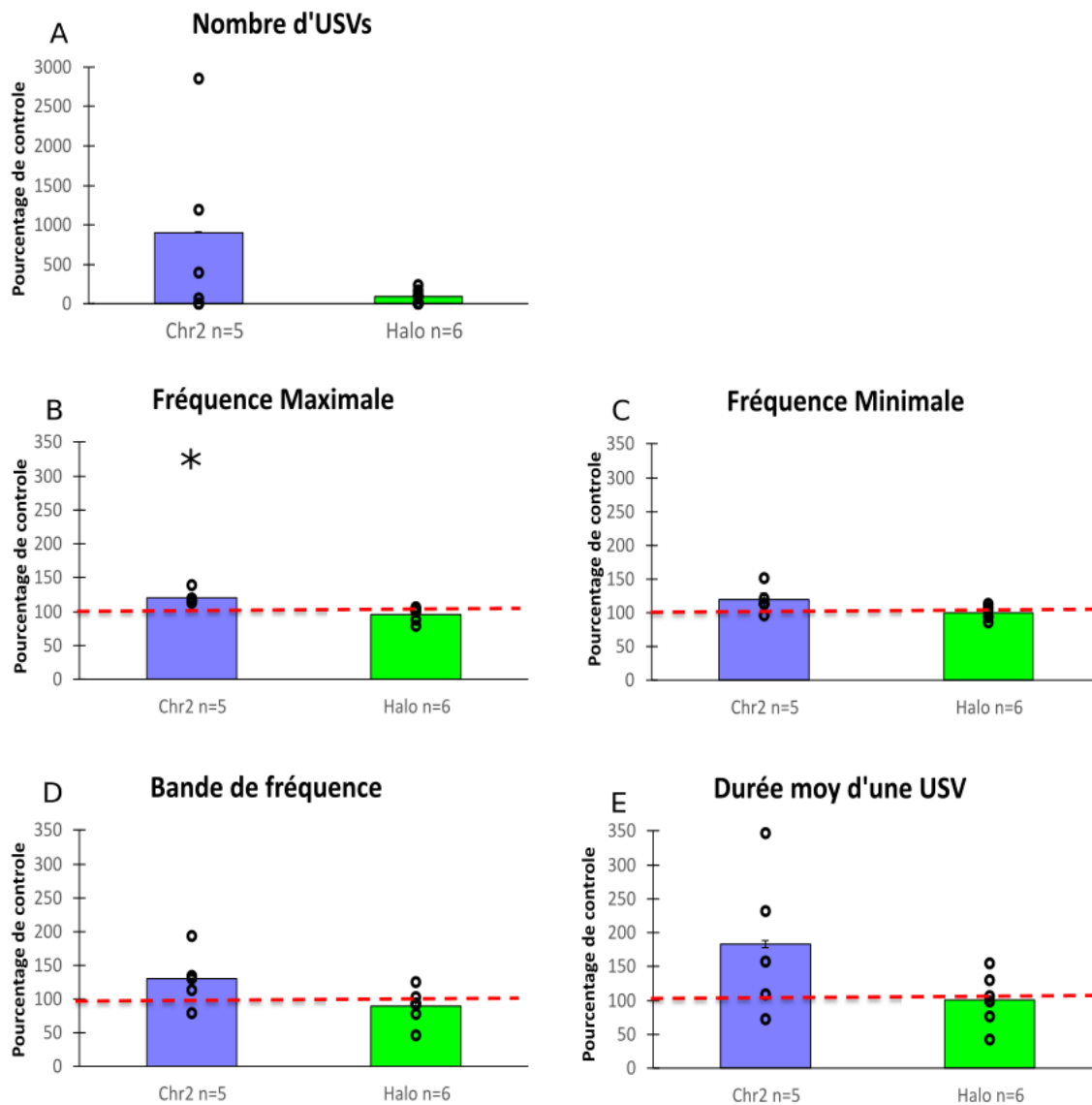


Figure 61. Vocalisation ultrasonique des Chr2 et des Halo. A) Nombre de vocalisations. B) Fréquence maximale des USVs. C) Fréquence minimale. D) Bande de fréquence des USVs. E) Durée moyenne d'une vocalisation. La ligne rouge représente la moyenne du groupe contrôle (groupe non stim) que l'on met à 100%. Nous analysons si la libération ou l'inhibition de la libération est différente du contrôle. L'indication « * » représente une différence significative entre la libération de l'Ach et la moyenne du groupe contrôle (groupe non stim) que l'on met à 100%.

J'ai montré que les USVs sont corrélées au nombre de contacts sociaux. En ce sens, des études ont montré que l'émission d'USVs à haute fréquence entraîne une augmentation des approches (Kummer et al., 2011; Wang et al., 2008). De plus, l'émission des hautes fréquences chez la souris entraîne des USVs plus positives (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020). Mes données montrent que la modulation de la libération d'Ach perturbe les fréquences maximales

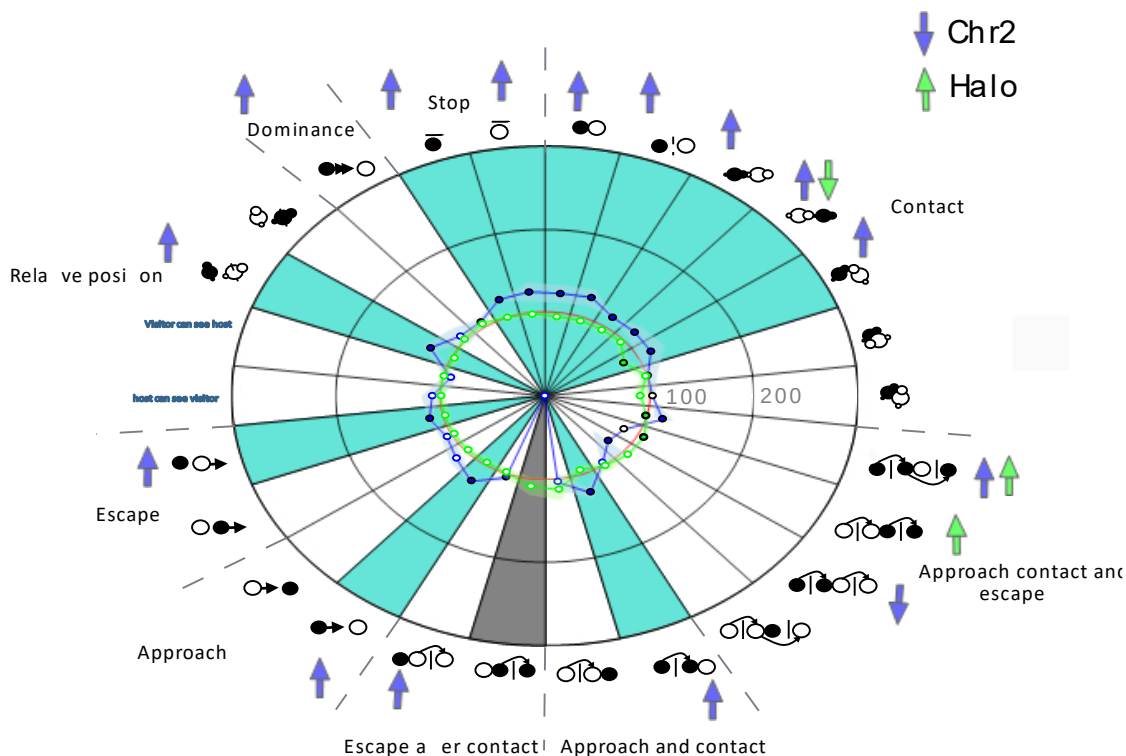
des USVs. De plus, les résultats comportementaux (pendant le SIT) témoignent d'une perturbation des approches, des contacts et des échappements sociaux. Ces résultats peuvent s'expliquer par une perturbation des USVs.

Nous avons donc décidé de synchroniser les USV avec le comportement de telle sorte à avoir l'émission des USV spécifiques lors des différents comportements de l'interaction sociale. Cette manipulation nous permet de savoir si il y a des différences au niveau des paramètres des USV (nombres, fréquences, etc ..) lors de comportements spécifiques ou plus globalement quelque soit le comportement. J'ai donc choisi de vous montrer la synchronisation du comportement avec la fréquence maximale car c'est uniquement sur ce paramètre, qui est sensible à la modulation d'Ach, (**Figure 62**). Durant certains comportements, aucunes USVs ne sont émises (comportements représentés par une ligne grise dans la **Figure 62**). L'augmentation de la libération d'Ach dans le PrI entraîne une augmentation significative de la fréquence maximale des vocalisations sur presque tous les comportements analysés. De plus, nous pouvons voir que pour la libération de l'Ach, un grand nombre de comportements étaient significatifs pour 0-4 et 4-8 min entre le groupe ChR2 et le groupe ChR2 non stimulé que l'on a mis à 100% (**Figure 62 A et B**, voir **Tableau 11 et 12**).

Cependant, même si nous n'obtenons pas de différence significative entre l'Halorhodopsine stimulée et l'Halorhodopsine non stimulée que l'on met à 100%, au niveau global, nous pouvons voir un effet spécifique au niveau des USVs. En effet, pour les quatre premières minutes, nous observons une diminution de la fréquence maximale des USVs émises lors de l'approche de l'hôte suivi d'un contact suivi d'un échappement de l'hôte ($W=15$, $p<0.05$)(**Figure 62 A**) ainsi qu'une augmentation de la fréquence maximale d'USVs émises lors d'approche du visiteur suivi d'un contact suivi d'échappement de l'hôte ($W=20$, $p<0.05$)(**Figure 62 B**).

Concernant les quatre dernières minutes, nous avons une augmentation de la fréquence maximale pour les contacts de sens opposé ($W=20$, $p<0,05$), une diminution de la fréquence maximum d'USV pour l'approche de l'hôte sans contact ($W=0$, $p<0,01$)(**Figure 62 B**), et de la fréquence maximale des USVs émises durant l'approche de l'hôte suivi d'un contact suivi de l'échappement de l'hôte ($W=10$, $p<0,05$)(**Figure 62 B**).

A Synchronisation fréquence maximal USV et comportement 0-4 min



B Synchronisation fréquence maximal USV et comportement 4-8 min

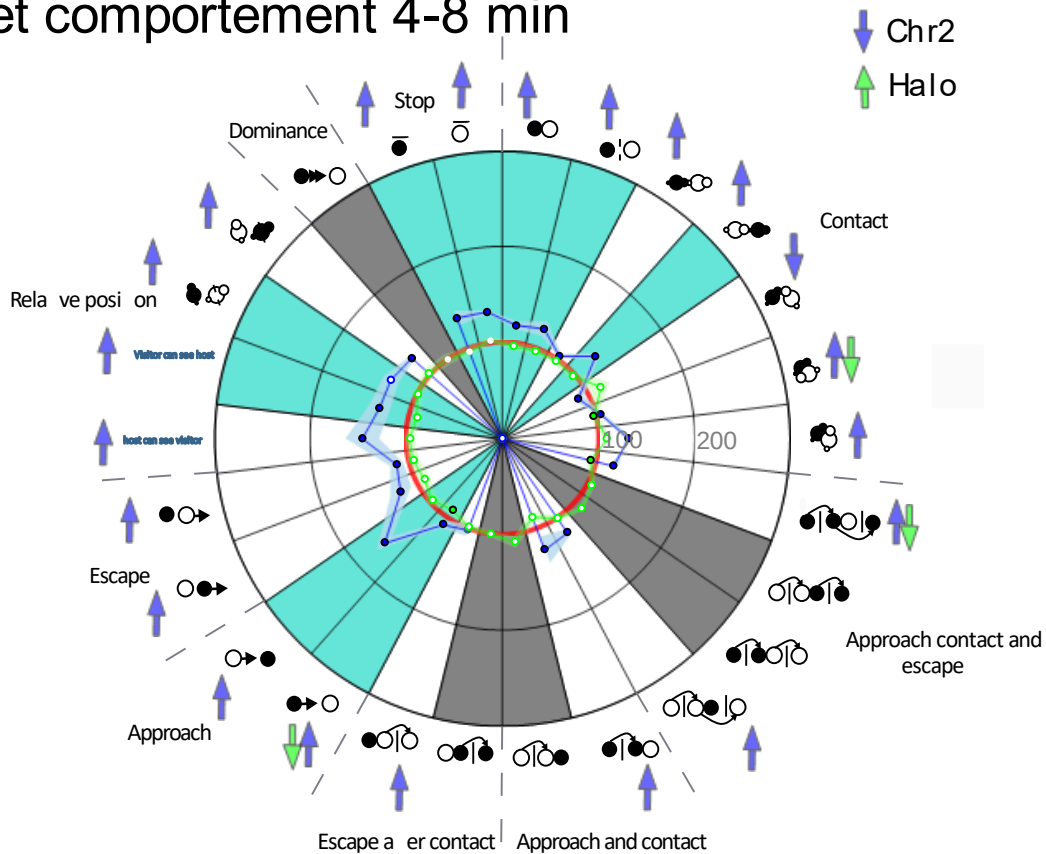


Figure 62. Fréquence maximale des USVs émises en pourcentage selon le groupe contrôle et en fonction du type de comportement. A) Synchronisation de la fréquence maximale des USVs et du comportement lors des quatre premières minutes de l'interaction sociale. B) Synchronisation de la fréquence maximale des USVs et du comportement lors des quatre dernière minute de l'interaction sociale. Chaque partie du cercle représente le comportement enregistré lors de l'interaction sociale. La première ligne rouge représente 100%, le gros point bleu représente la différence significative entre le 100% et la libération d'Ach et le gros point vert représente la différence significative entre le 100% et l'inhibition de la libération d'Ach. La couleur cyan représente une différence significative entre la libération d'Ach et l'inhibition de l'Ach. Les USVs qui ne sont pas émises durant un comportement sont représentées avec la couleur grise. Cette absence de données explique que ce comportement ne soit pas associé avec l'USV.

Je peux donc conclure que la différence de fréquence maximale observée pendant la libération de l'Ach comparée aux groupes non stimulés n'est pas due à un comportement spécifique. En revanche, l'inhibition de la libération de l'Ach (groupe Halo) a montré une diminution de la fréquence maximale de l'USV sur certains comportements séquentiels spécifiques, comme l'approche-contact-fuite (comportements affectés significativement par la diminution de libération de l'Ach). Suite à cela, j'ai essayé de voir si la perturbation des USVs pouvait expliquer la perturbation des comportements. Pour cela, j'ai réalisé des matrices de corrélation en me concentrant sur les événements d'approche, de contact et d'échappement (principaux comportements significatifs en IS). Aucune corrélation n'a été trouvée entre la fréquence maximale des USVs et les comportements d'approche, de contact et d'échappement.

Les résultats montrent que la libération d'Ach entraînait une augmentation de la fréquence maximale durant les approches. Le blocage de la libération de l'Ach entraîne une diminution de la fréquence maximale d'USV durant l'approche de l'hôte. Suite à ce résultat, je me suis demandé si la perturbation des USVs émises durant l'approche sociale pouvait déclencher un effet comportemental. Pour répondre à cette question, j'ai calculé la probabilité que la souris fasse un comportement B après un événement A ainsi que la probabilité que la souris fasse un comportement A avant l'évènement B. La multiplication de la probabilité de A vers B et de B vers A donne une probabilité de transition (**Figure 63 A**). La probabilité de transition a été calculée sur la transition entre les approches, les contacts et les échappements. Les probabilités de transition ne montrent pas de différence entre les groupes expérimentaux, démontrant que chez les animaux Halo, la perturbation des fréquences de vocalisation lors des

approches n'entraîne pas de changement de la probabilité de transition approche contact et échappement (un changement de la probabilité de transition est illustré en **Figure 63 B**).

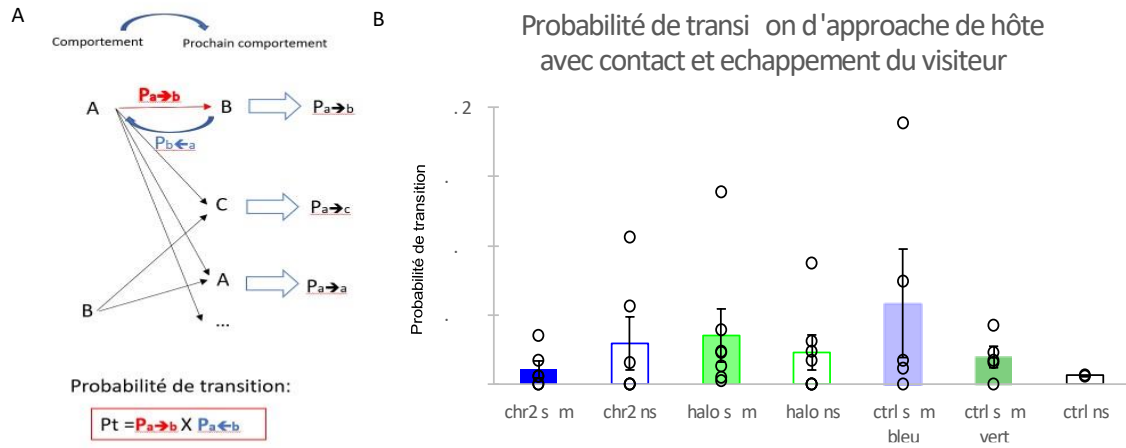


Figure 63. Probabilités de transition. A) Explication de la probabilité de transition. B) Probabilité de transition sur les approches de l'hôte avec l'échappement du visiteur.

Tableau 7. Tous les résultats statistiques de l'effet lumière dans l'IS sur le nombre d'événements 0-4 et 4-8 minutes.

Comportement	Lumière bleue vs 100%	Lumière bleue vs 100%	Lumière verte vs 100%	Lumière verte vs 100%
	Nombre 0-4 min	Nombre 4-8 min	Nombre 0-4 min	Nombre 4-8min
	p = 0.2188	p = 0.03247	p = 0.08063	p = 0.2188
	p = 0.02823	p = 0.0314	p = 0.76	p = 0.0314
	p = 0.2217	p = 0.2217	p = 0.03247	p = 0.76
	p = 0.0314	p = 0.76	p = 0.7585	p = 0.424
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.2217
	p = 0.2188	p = 0.2217	p = 0.03247	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.07245	p = 0.7585	p = 0.7585	p = 0.2159
	p = 0.02224	p = 0.2159	p = 0.757	p = 0.2188
	p = 0.76	p = 0.2188	p = 0.7585	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.7585	p = 0.76	p = 0.7585
	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.07858	p = 0.2188	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.03033	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.424
	p = 0.76	p = 0.03247	p = 0.76	p = 0.2188
	p = 0.2217	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.2188	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.2217
	p = 0.76	p = 0.2188	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.08063	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.7585
A voit B	p = 0.2217	p = 0.2159	p = 0.7585	p = 0.03247
B voit A	p = 0.03247	p = 0.0314	p = 0.2188	p = 0.76
	p = 0.03247	p = 0.03247	p = 0.2188	p = 0.2159
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.2188	p = 0.2159	p = 0.76	p = 0.7585
	p = 0.2217	p = 0.03247	p = 0.03247	p = 0.03247
	p = 0.7585	p = 0.2099	p = 0.2217	p = 0.2159
Agressivité	p = 0.07245	p = 0.2188	p = 0.2099	p = 0.1914
Dos à dos	p = 0.1914	p = 0.7524	p = 0.757	p = 0.2099
"Paw"	p = 0.2188	p = 0.2188	p = 0.76	p = 0.2188
Redressement	p = 0.2099	p = 0.2188	p = 0.2217	p = 0.757

Tableau 8. Tous les résultats statistiques de l'effet lumière dans l'IS sur la durée d'événements 0-4 min and 4-8 min

Comportement	Lumière bleue vs 100%	Lumière bleue vs 100%	Lumière verte vs 100%	Lumière verte vs 100%
	Durée 0-4 min	Durée 4-8 min	Durée 0-4 min	Durée 4-8 min
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.03247	p = 0.7585	p = 0.03247	p = 0.2217
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.03247	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.2099	p = 0.7585	p = 0.7585	p = 0.2188
	p = 0.02224	p = 0.2188	p = 0.7585	p = 0.2217
	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.0314	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.2217
	p = 0.76	p = 0.03247	p = 0.76	p = 0.2217
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.03247	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
A voit B	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76
B voit A	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.2217	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.03247	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.03247	p = 0.2217
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.7585
	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.76
	p = 0.2217	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76
Agressivité	p = 0.07245	p = 0.2188	p = 0.2099	p = 0.1914
Dos à dos	p = 0.1914	p = 0.7585	p = 0.7585	p = 0.7539
"Paw"	p = 0.2217	p = 0.76	p = 0.76	p = 0.7585
Redressement	p = 0.2099	p = 0.2188	p = 0.2217	p = 0.757

Tableau 9. Tous les résultats statistiques de Chr2 stim vs 100% et Halo stim vs 100% sur le nombre de comportement 0-4 min et 4-8 min.

Comportement	Chr2 vs 100%	Chr2 vs 100%	Halo Vs 100 %	Halo Vs 100 %
	Nombre 0-4 min	Nombre 4-8 min	Nombre 0-4 min	Nombre 4-8min
	p = 0.3462	p = 0.3472	p = 0.7072	p = 0.7072
	p = 0.3462	p = 0.3472	p = 0.7067	p = 0.7072
	p = 0.3462	p = 0.6546	p = 0.2015	p = 0.02934
	p = 0.3472	p = 0.04843	p = 0.7072	p = 0.0291
	p = 0.04888	p = 0.04888	p = 0.7072	p = 0.7072
	p = 0.002567	p = 0.3462	p = 0.7063	p = 0.0291
	p = 0.3472	p = 0.04888	p = 0.7072	p = 0.2008
	p = 0.04046	p = 0.04843	p = 0.7055	p = 0.7055
	p = 0.2935	p = 0.3462	p = 0.02456	p = 0.7067
	p = 0.3462	p = 0.04753	p = 0.07363	p = 0.029
	p = 0.3462	p = 0.3462	p = 0.7072	p = 0.7067
	p = 0.04888	p = 0.3472	p = 0.2008	p = 0.02934
	p = 1	p = 0.04888	p = 0.2008	p = 0.2008
	p = 0.04888	p = 0.3462	p = 0.0291	p = 0.7072
	p = 0.3472	p = 1	p = 0.2008	p = 0.0291
	p = 0.3472	p = 0.04934	p = 0.7072	p = 0.02934
	p = 1	p = 0.002778	p = 0.0291	p = 0.7072
	p = 0.3472	p = 0.04888	p = 0.393	p = 0.2001
	p = 0.3472	p = 0.3472	p = 0.7067	p = 0.7072
A voit B	p = 1	p = 1	p = 1	p = 0.7067
B voit A	p = 0.3472	p = 0.3472	p = 0.2008	p = 0.7072
	p = 0.3462	p = 1	p = 0.7063	p = 0.7072
	p = 0.3472	p = 0.002778	p = 0.2008	p = 0.7067
	p = 0.3472	p = 0.04934	p = 0.2015	p = 0.7072
	p = 0.04888	p = 0.04934	p = 0.7072	p = 0.2015
	p = 0.04934	p = 0.3472	p = 0.7072	p = 0.7072
Agressivité	p = 0.04485	p = 0.002221	p = 0.705	p = 0.7028
Dos à dos	p = 0.008113	p = 0.002221	p = 0.7024	p = 0.705
"Paw"	p = 0.3462	p = 0.04843	p = 1	p = 0.7072
Redressement	p = 0.04708	p = 1	p = 0.2008	p = 0.7067

Tableau 11. Tous les résultats statistiques des effets lumière sur la synchronisation des USV et du comportement.

behavior	Lumière bleue vs 100%	Lumière bleue vs 100%	Lumière verte vs 100%	Lumière verte vs 100%
	0-4 min	4-8 min	0-4 min	4-8 min
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.3286	p = 0.7671
	p = 0.4811	p = 0.4811	p = 0.3286	p = 1
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.4811
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.4811
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 1	p = 0.1386
	p = 0.1386	p = 0.1386	p = 0.7671	p = 0.7671
	p = 0.4795	p = 0.4795	p = 0.7671	p = 0.1386
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.4811
	p = 0.7671	p = 0.7671	p = 0.3286	p = 0.1002
	p = 0.4811	p = 0.4811	p = 0.3286	p = 0.4811
	p = 0.1386	p = 0.1386	p = 0.4811	p = 0.1002
	p = 0.2207	p = 0.2207	p = 0.7671	p = 0.7671
	p = 0.1386	p = 0.1386	p = 0.3286	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1386	p = 0.4811	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.4811
	p = 0.1386	p = 0.1386	p = 0.3286	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.3286	p = 0.1002
A voit B	p = 0.1386	0.1386	p = 0.3286	p = 0.1002
B voit A	p = 0.4811	p = 0.4811	p = 0.8451	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.3286	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.4811
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.4811	p = 0.7671
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.1002
	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.8451	p = 0.1002
Agressivité	p = 0.1386	p = 0.2207	p = 1	p = 0.4795
Dos à dos	NA	NA	NA	NA
"Paw"	p = 0.1002	p = 0.1002	p = 0.7671	p = 0.1386
Redressement	NA	NA	NA	NA

Tableau 12. Tous les résultats statistiques sur le résultat de la modulation d'Ach sur la synchronisation des USV et du comportement

Comportement	Chr2 vs 100%	Chr2 vs 100%	Halo Vs 100 %	Halo Vs 100 %
	0-4 min	4-8 min	0-4 min	4-8 min
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 1	p = 0.3889
	p = 0.0108	p = 0.0108	p = 1	p = 0.3889
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 0.3889	p = 0.3889
	p = 0.02973	p = 0.02973	p = 0.007495	p = 0.2272
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 0.3889	p = 0.2272
	p = 0.2272	p = 0.0168	p = 0.6558	p = 0.0108
	p = 0.2272	p = 0.0168	p = 1	p = 0.6558
	p = 0.02973	p = 0.02973	p = 0.0168	p = 0.02973
	p = 0.07364	NA	p = 0.0108	p = 0.2272
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 0.3889	p = 0.6558
	p = 1	p = 0.02973	p = 0.3889	p = 0.6558
	p = 0.0168	p = 0.02973	p = 1	p = 0.1188
	p = 1	NA	p = 1	p = 0.2272
	NA	NA	p = 0.4945	p = 0.4945
	p = 0.0168	p = 0.2272	p = 0.3889	p = 1
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 1	p = 0.005494
	p = 0.2272	p = 0.0108	p = 1	p = 0.6558
	p = 0.2272	p = 0.0168	p = 1	p = 0.1188
	p = 0.0108	p = 0.0108	p = 0.3889	p = 0.3889
A voit B	p = 0.4945	p = 0.0168	p = 0.3889	p = 0.2272
B voit A	p = 0.2272	p = 0.0108	p = 0.3889	p = 0.06889
	p = 0.0108	p = 0.0108	p = 0.3889	p = 0.3889
	p = 0.4945	p = 0.02973	p = 0.3889	p = 0.3889
	p = 0.0168	NA	p = 0.1188	p = 1
	p = 0.0108	p = 0.00729	p = 0.3889	p = 0.3889
	p = 0.0108	p = 0.0168	p = 1	p = 0.3889
Agressivité	p = 0.07364	NA	p = 0.0108	NA
Dos à dos	NA	NA	NA	NA
"Paw"	p = 0.0108	NA	p = 0.6558	p = 0.6558
Redressement	NA	NA	NA	NA

2.3. Synthèse des résultats

L'étude de la microdialyse montre un effet non spécifique de la lumière : elle entraîne une libération d'Ach. Dans le test des trois chambres, il n'y a pas d'effet non spécifique de la lumière. Mais nous pouvons observer un effet spécifique de la lumière dans le test d'interaction sociale. Nous pouvons aussi voir que l'effet de la lumière verte et de la lumière bleue va dans la même direction. Ainsi, nous pouvons supposer un effet de la chaleur sur le comportement. Les effets de la lumière dans l'IS ressemblent à ceux observés lors de la ChR2. Par conséquent, je peux supposer que l'effet lumière entraîne une faible libération d'Ach.

La libération d'acétylcholine n'a pas d'effet sur la motivation sociale, mais nous pouvons observer une différence dans le test d'interaction sociale. Je peux suggérer que l'implication de l'Ach était différente du groupe non stimulé dans les deux tâches. De plus, les résultats dans la tâche d'interaction sociale montrent que la libération d'Ach augmente l'approche et l'échappement du visiteur, alors que l'inhibition de la libération de l'Ach entraîne une augmentation des approches de l'hôte et de la fuite du visiteur.

Ainsi, la modulation de l'Ach dans le cortex préfrontal perturbe l'approche sociale. En effet, la libération d'Ach dans le PrL contrôle l'approche des animaux hôtes avec une diminution des approches lorsqu'on augmente l'Ach et une augmentation des approches lorsqu'on la diminue. Le test des trois chambres nous indique que la motivation sociale n'est pas altérée. Par conséquent, je peux proposer que dans le test d'IS, l'initiation des approches pour faire un contact est perturbée. Mes données ne montrent aucun effet comportemental dans le test des trois chambres, mais par contre, nous observons des altérations comportementales dans l'IS. Je peux supposer alors que l'implication du prélimbique est différente entre ces deux tests. Je montre aussi que la libération ou le blocage d'Ach augmente la fuite de la souris visiteuse après un contact. Je peux donc émettre l'hypothèse que la modulation de l'Ach déclenche un contact de mauvaise qualité, ce qui augmenterait la fuite du visiteur.

La libération d'Ach dans le cortex prélimbique déclenche une émission d'USV à plus haute fréquence. Le blocage de la libération d'Ach ne montre pas de différence entre le groupe Halorhodopsine stimulé et le groupe non stimulé normalisé à 100%. Lorsque nous synchronisons les USVs avec les comportements sociaux, nous observons que l'augmentation

de la fréquence des USVs lors de la libération d'Ach n'était pas spécifique à un comportement particulier. Même si je n'ai pas vu d'effet sur les USVs lors de l'inhibition de l'Ach, la synchronisation des USVs avec les comportements sociaux nous a permis de montrer que les comportements d'approche de l'hôte et de contact sont associés à une diminution de la fréquence maximale des USVs. Malgré ces effets observés lors de la synchronisation des USVs et du comportement, je n'ai pas été en mesure de déterminer si la perturbation des USVs pouvait influencer le comportement.

Discussion

Discussion

1. Validation de la méthodologie

1.1. Les souris ouris ChAT-IRES-Cre présentent une altération de la voie de biosynthèse de l'Ach

1.1.1. Altération de la voie de biosynthèse de l'Ach

J'ai montré que les souris ChAT-IRES-Cre présentent une diminution des gènes CHT, ChAT et VACHT codant pour la voie de biosynthèse de l'acétylcholine dans le striatum dorsal comparé aux WT. L'altération de la voie de biosynthèse de l'Ach a déjà été observée dans l'étude de Chen et collaborateur dans laquelle les auteurs montrent une diminution de la protéine ChAT mais pas d'altération de VACHT (Chen et al., 2018). Cette divergence avec mes résultats sur les ARNm VACHT peut être due au fait que les deux études ont été réalisées sur des structures cérébrales différentes, à savoir l'hippocampe et le striatum.

Une des explications possibles de cette altération peut être due aux manipulations génétiques qui ont été nécessaires pour manipuler les souris ChAT-Cre. En effet, cette manipulation génétique pourrait modifier l'efficacité des gènes ou de la stabilité de l'ARNm. En théorie, il ne devrait pas y avoir de problème de transcription de gènes chez nos souris ChAT-IRES-Cre sauf si la séquence IRES et Cre est insérée sur un élément amplificateur du gène ChAT, qui serait, par conséquent, perturbée. Une telle modification génétique pourrait induire une diminution du niveau de transcription non seulement du gène ChAT, mais aussi du gène VACHT, puisque les deux gènes ChAT et VACHT sont entremêlés et partagent un promoteur et très probablement plusieurs séquences régulatrices (Bejanin et al., 1994; Cervini et al., 1995; De Gois et al., 2000).

La modulation de l'expression de ces trois gènes pourrait également se produire en partie au niveau post-transcriptionnel par un mécanisme de régulation de la stabilité des transcriptions impliquant leur région 3' non traduite (3'UTR). Ceci pourrait être vrai pour les ARNm de la ChAT, puisque la transcription du gène de la ChAT chez les souris ChAT-IRES-Cre conduit à la synthèse d'un ARNm « polycistronique » contenant la séquence Cre en aval de la séquence codante de la ChAT. Le 3'UTR des ARNm de la ChAT est ainsi modifié, ce qui peut

altérer leur stabilité. Cependant, cette hypothèse n'est pas valable pour les ARNm VChT et ChT, dont les 3'UTR restent inchangés chez les souris ChAT-IRES-Cre par rapport aux souris WT.

Une autre hypothèse est l'effet toxique de la Cre recombinase. Des études ont montré qu'une surexpression de la Cre peut induire une toxicité au niveau de la cellule (Harno et al., 2013; Schmidt et al., 2000; Schmidt-Supprian and Rajewsky, 2007). Chez les souris ChAT-IRES-Cre, la Cre peut être détectée directement dans le cerveau adulte (Chen et al., 2018). De plus, des études ont montré que l'on pouvait détecter la ChAT et la VChAT dès le stade embryonnaire chez les animaux WT (Holler et al., 1996; Schambra et al., 1989; Tallini et al., 2006). Ces arguments suggèrent qu'il est tout à fait possible que l'expression de la Cre soit présente depuis le début du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. Cette exposition prolongée pourrait donc provoquer un effet toxique pour l'expression des gènes cholinergiques.

1.1.2. Vieillessement du système cholinergique

Plusieurs données de la littérature ont montré que le vieillissement du système cholinergique provoque des déficiences cognitives (Gage et al., 1988; Nieves-Martinez et al., 2012; Schliebs and Arendt, 2011). Il est donc important de savoir si le vieillissement du système cholinergique affecte nos comportements de manière plus importante que le vieillissement normal.

Durant le premier chapitre, nous avons travaillé chez des souris âgées de 11-12 mois. Cet âge correspond au milieu de la vie de l'animal. Les résultats montrent qu'à cet âge on peut observer une diminution des comportements affiliatifs et de dominances sans altérer la communication vocale. Cependant, cette diminution de la motivation sociale est indépendante du génotype puisqu'il n'y a pas de différence entre les souris ChAT-IRES-Cre et les souris WT de 11-12 mois. Plusieurs travaux antérieurs ont déjà montré que l'âge (20-24 mois) provoque une diminution des contacts sociaux, comparé aux rats (Salchner et al., 2004) ou aux souris (Boyer et al., 2019) jeune (2-3 mois). Seules quelques études ont dressé les conséquences du vieillissement sur l'interaction sociale chez les souris d'âge moyen comparé aux jeunes adultes

(Boyer et al., 2019; Shoji et al., 2016). Dans ces études, les auteurs ont montré que l'âge diminuait le contact social. Cette différence par rapport aux résultats obtenus peut probablement s'expliquer par le fait que dans le test on a une induction de la dominance avec les 30 minutes d'habituation avant l'arrivée de la souris visiteuse. Tandis que dans l'étude de Boyer et collaborateur (2019) et Shoji et collaborateur (2016) les souris sont directement mises dans une nouvelle cage sans habituation.

Dans mes données, la seule différence observée entre les ChAT-IRES-Cre et les WT est une diminution du temps passé dans la zone sociale pour le test de trois chambres. Mais les souris ChAT-IRES-Cre d'âge moyen ne montre aucune différence de temps de contact entre les deux congénères dans le test de trois chambres comparé au WT d'âge moyen.

L'ensemble de ces données montre que le vieillissement du système cholinergique n'est pas différent entre les souris ChAT-IRES-Cre et les souris WT.

1.2. Les altérations comportemental des ChAT-IRES-Cre

1.2.1. Les souris ChAT -IRES-Cre présentent t'elle un augmentation de l'anxiété ?

Les souris ChAT-IRES-Cre sont plus rapides à réagir à un stimulus menaçant. Ces données peuvent suggérer une augmentation des comportements d'anxiété chez les souris ChAT-IRES-Cre. Les données de la littérature n'ont pas montré de différence d'anxiété dans un test open field, où de labyrinthe en croix surélevée (Chen et al., 2018). De plus, mes résultats n'ont pas montré de différences en matière de vocalisations ultrasoniques chez les souris ChAT-IRES-Cre comparés aux souris WT. Chez le rongeur, il a été montré que les USV sont des marqueurs émotionnels (Chabout et al., 2012). En effet, dans un contexte plus anxieux ou de peur, les souris ont tendance à émettre des USV vocalisations de plus basses fréquences (<60 kHz), alors que dans les situations plus positives ou non anxiogènes, les vocalisations de souris sont de plus haute fréquence (>60kHz) (Chabout et al., 2012; Lefebvre et al., 2020).

La neurobiologie de l'anxiété est largement décrite dans la littérature. Les principales structures impliquées dans la peur et l'anxiété sont le CPFm, l'amygdale, le locus coeruleus, l'hippocampe et matière grise périaqueducule (PAG) (Bourin, 2013; Daviu et al., 2019; Raybuck

and Gould, 2010; Wilson and Fadel, 2017). L'Ach joue un rôle important dans l'anxiété. Par exemple, les récepteurs muscariniques de l'hippocampe ventral sont impliqués dans l'induction de l'anxiété et leur activation favorise l'évitement social (Mei et al., 2020). Dans l'amygdale, l'Ach peut réguler l'apprentissage de la peur et l'extinction des comportements anxieux liés à la peur (Wilson and Fadel, 2017). De plus, l'activité des récepteurs nicotiques peut déclencher un effet bimodal sur le comportement : de faibles doses de nicotine peuvent avoir un effet anxiolytique, tandis que des doses élevées peuvent avoir un effet anxiogène (File et al., 1998).

Les données suggèrent que la réaction rapide face au stimulus menaçant ne semble pas être déclenchée par une anxiété accrue.

1.2.2. Les souris ChAT-IRES-Cre ont-elles un déficit olfactif ?

Dans le but de vérifier si les souris ChAT-IRES-Cre ont un problème olfactif, nous avons réalisé un test permettant de mesurer l'olfaction d'une odeur neutre, d'une odeur non sociale, et d'une odeur sociale. Pour ce faire, nous avons mesuré le temps que la souris passait à renifler le coton mis dans sa cage de vie. Dans ces expériences nous présentons 3 odeurs différentes dans cet ordre : odeur neutre, odeur non sociale et odeur sociale (voir **Figures 37**). Chaque odeur est présentée trois fois. Nous mesurerons l'habituation en comparant le résultat des 3 expositions de la même odeur. Si on trouvait une différence significative, nous considérons que la souris s'habitue à cette odeur. La mesure de déshabituaiton consistait en une différence significative entre la troisième présentation d'une odeur et la première présentation d'une nouvelle odeur.

Dans la littérature, il a été montré que l'eau et l'amande sont des odeurs neutres (Yang and Crawley, 2009). De plus, Yang et Crawley (2009) ont montré que l'odeur d'amande provoque une déshabituaiton. Mes résultats montrent une absence de déshabituaiton à l'odeur d'amande pour les WT. Ces différences de résultat peuvent peut-être s'expliquer par la propriété des odeurs. En effet, une odeur est une substance volatile qui peut se diffuser dans toute la cage de vie de l'animal. Si une souris présente une olfaction normale on peut s'attendre à ce qu'elle ne soit pas obligée de s'approcher du coton tige pour sentir l'odeur. A l'inverse un problème olfactif où le fait d'être exposé à une odeur attrayante peut augmenter la durée de

reniflement du coton-tige. Donc, le fait que les souris WT Jeune ne montrent pas d'habituation/déshabituaiton peut simplement s'expliquer par le fait qu'elles n'ont pas besoin de se rapprocher du coton tige pour sentir l'odeur. Si je suis cette hypothèse, les souris ChAT-IRES-Cre jeune ne devraient pas avoir de problème pour détecter les odeurs non sociales. Cependant, à l'âge moyen, nous pouvons observer qu'une plus grande proportion de souris (WT et ChAT-IRES-Cre) réagissent à l'odeur d'amande (Fig 37 D). Cela suggère qu'avec l'âge il peut y avoir une diminution de l'olfaction. Je peux aussi émettre une autre hypothèse qui pourrait être que le temps de reniflage est une mesure qui est assez limitée du fait que la souris doit être proche du coton-tige pour mesurer le temps de reniflage. Je pourrais donc mesurer le temps que la souris passe près du coton-tige afin d'avoir une mesure plus précise de l'olfaction.

De plus, les résultats montrent que les souris WT ont une déshabituaiton entre l'odeur d'amande et l'odeur sociale, cela pourrait suggérer que les odeurs sociales sont plus attrayantes qu'une odeur neutre comme l'amande. En revanche, chez les souris ChAT-Cre, on observe pas de déshabituaiton face à une nouvelle odeur sociale. Ce résultat permet de supposer un trouble olfactif chez les souris ChAT-Cre. dans la littérature il a été montré que chez les rongeurs le système olfactif contient 2 sous-systèmes sensoriels qui sont relativement distincts : le système principal et le système voméronasal (OVN) qui se projette vers le bulbe olfactif accessoires (AOB) (Li and Dulac, 2018; Liu et al., 2014). Le système olfactif principal permet de détecter toutes les odeurs (comme par exemple l'eau et l'amande) et le OVN détecte les phéromones et les Kairomones présents dans les odeurs sociales (Li and Dulac, 2018). Une altération du OVN altère la perception des odeurs sociales comme par exemple la perception des odeurs de femelle ou celle de prédateurs (Liu et al., 2014; Mohrhardt et al., 2018). De plus, il a été montré que les bulbes olfactifs reçoivent des entrées cholinergiques assez denses du prosencéphale basal et l'activation ou l'inhibition de cette innervation cholinergique permettent de moduler la détection des odeurs (Smith et al., 2015), tandis que le tonus cholinergique du OVN est impliquée dans le traitement olfactif (Mandairon et al., 2006; Marking et al., 2017; Smith et al., 2015). Des expériences électrophysiologiques ont démontré que la modulation muscarinique des bulbes olfactifs induit des effets opposés sur les cellules granuleuses de l'AOb et sur la MOB, suggérant une modulation cholinergique complexe entre les odeurs sociales et les odeurs non sociales (Smith et al., 2015). Je peux ainsi suggérer que

les animaux ChAT-IRES-Cre ont une altération du tonus cholinergique qui peut conduire à un impact différentiel sur le système olfactif principal ou l'organe voméronasal qui pourrait en partie expliquer le problème de détection de l'odeur sociale.

Afin de mieux comprendre les effets des troubles olfactifs sociaux que l'on observe chez les souris, il convient de réaliser des études plus approfondies afin de disséquer précisément le rôle de l'acétylcholine dans la détection d'une odeur sociale et celle d'une odeur non sociale.

1.2.3. Les souris ChAT IRES-Cre ont t'elles des troubles locomoteurs ou exploratoires ?

Mon étude montre que les animaux ChAT-Cre parcourent moins de distance et passent plus de temps immobiles que les animaux WT dans le test de 3 chambres, confirmant ainsi des résultats précédents (Chen et al., 2018). L'analyse en composantes principales a permis de remarquer que les paramètres locomoteurs appartiennent dans la même dimension que les paramètres cholinergiques, Cela suggère que l'altération cholinergique est liée aux problèmes de locomotion. Howe et ses collaborateurs (2019) ont montré que l'interaction entre l'Ach et la dopamine dans le striatum dans les processus moteur. En effet, ils ont montré que l'augmentation de la dopamine était impliquée dans l'initiation des mouvements spontanés. Il semblerait que les interneurones cholinergiques du striatum semblent être impliqués dans un changement d'état. En effet, ces interneurones cholinergiques semblent être impliqués dans l'initiation ou l'arrêt du mouvement. Il a aussi été montré que certains mouvements provoquaient une synchronie entre l'Ach et la dopamine. De plus il a été montré que l'Ach, pourrait également influencer les circuits locomoteurs, et exploratoire par l'intermédiaire des noyaux cholinergiques pédonculo pontins tegmental (PPT) et latéro-dorsal (LDTg) qui envoient des afférences cholinergiques à la substance noire pars compacta (SNpc) et à l'aire tegmentale ventral (ATV). L'acétylcholine module donc l'activité dopaminergique du striatum (Avalle et al., 2008). Plusieurs études ont disséqué le rôle de l'acétylcholine sur la locomotion (Avalle et al., 2008; Maskos et al., 2005b). Pour ce faire, plusieurs études ont utilisé des vecteurs lentiviraux afin de restaurer de manière sélective la transmission cholinergique dans la substance noire ou dans l'air tegmentale ventrale. Les souris ChAT-Cre montrent une distance parcourue réduite et une plus grande immobilité. Dans mon étude, les souris ChAT-Cre présentent une motivation sociale et un comportement d'exploration intact. Il a été montré qu'une interaction entre le

système dopaminergique et le système cholinergique dans le noyau accumbens pour la récompense, la motivation et les comportements dirigés vers un but (Báez-Mendoza and Schultz, 2013; Collins et al., 2019; Li et al., 2017; Wu et al., 1993). Je peux donc suggérer que l'influence de la voie mésolimbique est fonctionnelle chez la souris ChAT-IRES-Cre. De plus des études ont montré que seulement 20% des projections de LTDg ou PPTg sur le ATV sont cholinergiques, les 80% qui reste sont des projections neuronales non cholinergique, alors que plus de 90% des projections de LDTg ou PPTg sur le SNpc sont cholinergiques (Xiao et al., 2016). Ceci suggère alors une plus grande sensibilité de la voie nigrostriatale que de la voie ATV accumbens à la perturbation cholinergique. Pour conclure, la locomotion et l'exploration sont très importantes dans les interactions sociales. D'après ces données présentées ci-dessous, les souris ChAT-IRES-Cre présentent un trouble locomoteur mais ne semblent pas avoir de perturbation exploratoire.

1.2.4. Altération de la décision :

Les résultats montrent que les souris ChAT-Cre ont une augmentation de la durée des stops durant la tâche d'interaction sociale. Notre équipe a précédemment démontré que les comportements de stop sont des points de choix particuliers au cours desquels une souris s'arrête et sélectionne le prochain comportement à effectuer. En effet, après les stops, il a été montré que la souris peut choisir entre plusieurs séquences sociales (ou non sociales) qui composent le répertoire comportemental (de Chaumont et al., 2012; Coura et al., 2013; Nosjean et al., 2015). De plus cette décision est sensible aux interactions entre le système monoaminergique et cholinergique au sein du cortex préfrontal (Coura et al., 2013). Nos souris ChAT-IRES-Cre ont une augmentation de la durée des stops. De plus, on peut voir dans le test de trois chambres une augmentation du temps immobilité ainsi qu'une diminution de la distance parcourue. Ensemble ces données peuvent donc suggérer une perturbation du processus de prise de décision chez les souris ChAT-Cre. Cette interprétation est soutenue par le fait que la perturbation du tonus cholinergique dans le striatum altère la sélection des actions (Aoki et al., 2015; Chudasama and Robbins, 2006; Dautan et al., 2014; Karvat and Kimchi, 2014; Martos et al., 2017; Matamales et al., 2016; Ragozzino et al., 2002).

1.2.5.Effet de la stimulation lumineuse sur le comportement

Les résultats de microdialyse obtenus montrent qu'après 1 heure de stimulation, on a un effet de la lumière, c'est-à-dire que la lumière seule peut provoquer une augmentation de libération de l'Ach. On peut voir ce résultat pour tous les groupes de souris (ChR2, Halo , lumière bleue et lumière verte). De plus, mes données montrent que l'effet lumière a aussi une influence sur les comportements mis en œuvre dans le test d'interaction sociale. Cet effet est principalement visible sur l'aspect quantitatif, mais moins sur la durée des comportements. De plus, l'effet lumière bleue ou verte va dans la même direction (**Fig 54**). L'effet lumière influence les comportements de l'hôte mais aussi les comportements du visiteur. Cette constatation montre donc l'intérêt d'utiliser des contrôles permettant d'évaluer l'effet de la lumière et, si possible, de normaliser les données par rapport à ces effets.

La normalisation que j'ai réalisée par rapport aux groupes non stimulés permet de s'affranchir de l'effet du vecteur viral. De plus, cette normalisation permet aussi de pouvoir comparer l'effet de la libération d'acétylcholine à l'effet lié à son inhibition.

Même en considérant l'effet de la lumière, les résultats de microdialyse permettent de montrer que l'effet de la lumière verte sur l'halorhodopsine diminue l'efflux d'acétylcholine de manière significative par rapport à la lumière verte seule. Cela permet de valider l'effet de l'illumination en lumière verte de l'halorhodopsine exprimée dans les terminaisons sur la diminution de la quantité d'acétylcholine au sein du cortex prélimbique. Je n'ai pas réussi à démontrer que la stimulation lumineuse de la channelrhodopsine exprimée au niveau des terminaisons entraînait une augmentation d'Ach supérieure à celle de la seule lumière durant une heure de stimulation. Cela peut s'expliquer par le fait du faible nombre d'animaux testés en microdialyse et de la forte variabilité de nos données. De plus, la durée de stimulation d'une heure entraîne une grande quantité d'Ach libérée uniquement par la lumière et il est possible que dans ces conditions la libération spécifique soit difficilement détectable.

L'effet lumière non spécifique observé en microdialyse permet également de montrer un effet d'augmentation de la quantité d'Ach uniquement dans le CPF droit (côté stimulé) et pas dans le CPF Gauche. Cela montre la spécificité de l'effet optogénétique. En effet, nous pouvons observer que la Stimulation optogénétique est spécifique de la région d'intérêt et que, en dépit

des projections qui existent entre les côtés droit et gauche du CPF, l'activation cholinergique d'un côté n'active pas le côté contra-latéral.

Concernant l'effet lumière observé en microdialyse et en optogénétique, différents articles ont montré que la lumière utilisée en optogénétique peut produire de la chaleur que ce soit pour un laser ou pour une LED (Allen et al., 2015; Deng et al., 2014). Je peux émettre l'hypothèse que l'effet non spécifique observé lors de notre expérience peut être dû à la chaleur. Différents articles montrent que la lumière sera absorbée par l'échantillon de tissu et que cela produira de la chaleur (Allen et al., 2015; Deng et al., 2014). Je peux donc émettre l'hypothèse que l'effet non spécifique peut être expliqué par la chaleur.

Les résultats comportementaux montrent qu'il y a plus de comportements affectés par la lumière bleue que par la lumière verte. Malgré le fait que l'augmentation d'Ach est supérieur en lumière verte par rapport à la lumière bleue. Cela peut être dû au protocole de stimulation (voir **Figure 47 C**). En effet, dans le protocole de stimulation de la ChR2 on a une grande variation de l'intensité lumineuse (succession de lumière on et de lumière off), alors que les Halo on a une intensité lumineuse plus constante. Des études ont suggéré que la variation de l'intensité lumineuse (succession d'allumée éteinte) peut avoir des effets plus importants qu'une lumière allumée mais constante (Allen et al., 2015; Deng et al., 2014).

La lumière bleue et la lumière verte provoquent des effets comportementaux allant dans le même sens. De plus, l'effet lumière va dans le même sens que la libération d'Ach. Donc je peux émettre l'hypothèse que l'effet lumière provoque une petite libération d'Ach.

Ensemble, ces résultats montrent l'intérêt de vérifier l'effet de la lumière. L'effet de la lumière obtenue en microdialyse est obtenu après 1 H de stimulation. Dans les comportements nous stimulons que 8 minutes. Donc même si on a un effet de la lumière durant l'IS, je peux émettre l'hypothèse que cet effet lumière semble moins important. De plus, l'ensemble des contrôles sont réalisés pour mesurer l'effet de cette libération non spécifique de la lumière.

1.3. Conclusion

J'ai voulu savoir si les souris ChAT-IRES-Cre pouvaient être utilisés pour étudier le comportement social. Pour cela, j'ai caractérisé le phénotype social des souris ChAT-IRES-Cre

et d'évaluer l'évolution de leur comportement social avec l'âge en se focalisant sur le milieu de la vie. Les résultats confirment tout d'abord une altération du système cholinergique chez les souris ChAT-IRES-Cre. Cependant, je montre que cette altération ne perturbe pas les interactions sociales, à l'exception d'une augmentation du temps de décision. L'analyse en composantes principales nous montre que l'augmentation de la durée des stops n'est pas corrélée aux paramètres sociaux mais plutôt corrélée à la dimension non sociale. Il a été montré que les stops sont des points de choix (de Chaumont et al., 2012; Coura et al., 2013; Nosjean et al., 2015). L'augmentation du temps des stops est liée à l'immobilité et la distance parcourue. Je peux aussi émettre l'hypothèse que lorsque la souris réalise un stop, elle s'arrête pour analyser son environnement. L'analyse de l'environnement repose sur différents paramètres qui ne dépendent pas uniquement des paramètres sociaux comme l'attention, les différents sens de l'animal, l'anxiété. Une fois l'environnement analysé, la souris va décider du comportement social à adopter. L'étude de Chaumont et collaborateur (2012) et de Avale et collaborateur (2011) montre que les interactions sociales sont très fréquentes au début de la tâche puis elle diminue en termes de fréquence alors que l'exploration est faible au début et augmente au fil du temps. Cela peut suggérer que l'introduction d'un congénère durant l'IS est motivant suite à la nouveauté puis après avoir identifié l'individu la souris se remet à explorer son environnement. De plus, j'ai aussi identifié un déficit sensoriel subtil, spécifique de l'intérêt pour une odeur sociale, qui pourrait affecter les interactions. Nous pouvons aussi voir une tendance à une augmentation des comportements anxieux. Les souris ChAT-IRES-Cre présentent un certain nombre de différences légères par rapport aux WT mais pas de différences majeures sur le plan comportemental, ce qui permet de les utiliser pour étudier les interactions sociales en optogénétique

2. Implication du CPF dans les comportements

Les données de la littérature ont montré que, chez le rongeur, le cortex prélimbique est très impliqué dans les fonctions cognitives telles que la flexibilité comportementale (pour revue voir (Dalley et al., 2004; Granon and Floresco, 2009), la planification de l'action (Gisquet-Verrier and Delatour, 2006; Granon and Changeux, 2012; Granon and Poucet, 1995; Oualian and Gisquet-Verrier, 2010), le maintien d'une stratégie comportementale (Granon et al., 1994), les décisions sociales (Avale et al., 2011; Bicks et al., 2020) et non sociales (van Holstein and

Floresco, 2020; Jenni et al., 2017; Pittaras et al., 2016a, 2016b) ou encore dans les processus attentionnels (Granon et al., 2000; Gritton et al., 2016). Plusieurs études ont montré l'implication du PrL dans les comportements sociaux, que ce soit la motivation ou la préférence sociale, principalement en utilisant un test de trois chambres. Elles ont permis de montrer que la stimulation des neurones du PrL, projetant vers le noyau accumbens, diminuait la préférence sociale (Murugan et al., 2017) alors que l'imagerie par endoscopie a montré son activité importante pendant ce test (Liang et al., 2018). Bien que cette dernière étude ne cible pas spécifiquement le PrL mais plutôt le mur médian du PFC, nous ne pouvons pas ignorer la possibilité de l'activation des neurones du prL dans la motivation sociale mise en jeu ici. De même, l'inhibition de la voie PrL-BLA abolit la préférence sociale, alors que celle de la voie IL-BLA la favorise (Huang et al., 2020). Ces données montrent l'implication du PrL dans les comportements sociaux, au sens large.

Les données montrent que la modulation de l'Ach dans le PrL perturbe les souris dans la tâche d'interaction sociale (IS) mais pas dans le test des trois chambres (3Ch). Ces différences entre les deux tâches ont déjà été obtenues dans notre laboratoire (Chabout et al., 2013; Faure et al., 2019). Ainsi, je peux émettre l'hypothèse que les différences observées entre les deux tâches sociales sont dues aux processus distincts mis en œuvre : dans le test de trois chambres, on mesure la motivation sociale de l'animal puisqu'une des souris est confinée sous un pot et ne peut alors interagir librement. La décision de l'animal "hôte" (qui est le seul à pouvoir se déplacer) sera donc soit d'explorer son environnement, soit choisir d'aller au contact de son congénère, sans aucun risque ni besoin de faire preuve de dominance. La dominance sociale dépend d'ailleurs de la mobilisation du cortex préfrontal (Wang et al., 2011). En outre, dans cette tâche, les décisions dépendent uniquement de la propre motivation de l'animal hôte et n'implique que très peu ou pas du tout d'incertitude et de prise de risques, deux éléments majeurs qui reposent sur l'implication du cortex préfrontal (pour revue voir Doya, 2008).

En revanche, dans le test d'interaction sociale, les deux animaux peuvent se déplacer librement, les animaux doivent s'adapter l'un à l'autre et peuvent montrer de la dominance. La décision de l'animal hôte sera, comme pour le test du 3 chambres, soit d'interagir avec le congénère, soit d'explorer son environnement. En revanche, dans cette tâche, les choix de l'animal hôte sont plus risqués et adaptatifs car ils dépendent, à chaque instant, du

comportement de la souris visiteuse. L'animal hôte doit donc faire preuve d'une plus grande flexibilité comportementale ainsi que de la possibilité d'inclure des comportements de dominance, qui constituent une part importante du répertoire social (Boukersi et al., 2021; Faure et al., 2017, 2019; Nosjean et al., 2015). Ces données permettent d'émettre l'hypothèse que le test d'interaction sociale nécessite un plus haut niveau attentionnel et plus de flexibilité comportementale que dans le test des 3 chambres. Pour conclure, nous pouvons émettre l'hypothèse que le cortex prélimbique est plus impliqué dans le test d'interaction sociale que dans le test de 3 chambres.

Certaines données de la littérature suggèrent que la libération d'Ach provoque une inhibition des neurones pyramidaux. Par conséquent, il semblerait que la libération d'Ach perturbe cette balance excitation/inhibition en faveur de l'inhibition (Kuchibhotla et al., 2017). Cela implique donc que la diminution de la quantité d'Ach, durant une interaction sociale, augmente la balance E/I en faveur de l'excitation. Mes résultats montrent que la libération d'acétylcholine diminue le nombre de contacts. En outre, nous observons que les comportements de l'hôte (souris stimulée) provoquent une diminution des approches, des échappements et de la dominance, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des stops. Prises ensemble, ces données suggèrent que la libération d'acétylcholine dans le cortex préfrontal diminue l'intérêt de la souris pour son congénère, sans pour autant générer d'agressivité ou de comportements négatifs. Cependant, la diminution des comportements "dos à dos", qui reflètent une acceptation de la présence du congénère (de Chaumont et al., 2012), permet de nuancer ce résultat, suggérant un maintien d'un certain niveau de "veille" vis-à-vis du congénère. En revanche, l'inhibition de la libération d'acétylcholine provoque une augmentation des contacts sociaux. Notamment, la souris hôte (stimulée) montre une augmentation des approches sociales, suggérant que l'inhibition de la libération d'Ach au cortex préfrontal augmente l'intérêt pour le congénère. Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris $\beta 2$ KO. En effet, ces souris ont une perturbation de la balance E/I (Pittaras et al., 2016b) et présentent également une augmentation des temps de contact, des poursuites et de la dominance (Nosjean et al., 2015; Pittaras et al., 2016b). En ce sens, ces souris présentent une altération de plusieurs neurotransmetteurs dont l'acétylcholine (Coura et al., 2013), rendant difficile l'interprétation en termes de libération d'Ach.

L'Ach régule les processus attentionnels (par exemple, une augmentation de l'Ach provoque une augmentation de l'éveil cortical ainsi qu'une augmentation de la vigilance). Grâce à ces deux processus, l'Ach participe au filtrage des informations (Picciotto et al., 2012; Runfeldt et al., 2014). Ce filtrage peut aboutir à une diminution du rapport signal/bruit. Des études montrent que la libération d'Ach au sein du PFC augmente la vigilance (Graef et al., 2011; Gritton et al., 2016). Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de la vigilance entraîne la prise en compte de plus d'information ce qui au final, peut perturber la décision de l'animal. Cette intégration plus longue peut potentiellement aboutir à une prise de décision également plus longue ainsi qu'à une diminution de la dominance, ce qui aboutirait à une réalisation diminuée de comportements d'approche et de contacts sociaux.

Différentes études ont montré qu'au sein des différentes structures cérébrales, à l'état de repos, une synchronisation de différentes ondes cérébrales est réalisée. A noter que la libération d'Ach provoque une désynchronisation de ces ondes cérébrales (Eggermann et al., 2014; Kalmbach and Waters, 2014) ce qui refléterait l'état actif du cerveau. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition de la libération d'acétylcholine pourrait augmenter la synchronisation des ondes cérébrales, maintenant ainsi les réseaux cérébraux dans un état "de repos", soit non engagé dans une tâche cognitive. Cela rendrait le cortex préfrontal moins actif. On peut donc émettre l'hypothèse que l'inhibition de la libération d'Ach diminue la vigilance et, ainsi, la prise en compte de différentes informations. La vigilance sociale peut être perçue comme le fait de s'orienter vers un individu non familier sans pour autant s'en approcher (Duque-Wilckens et al., 2020). Il a été montré que l'utilisation d'un agoniste des récepteurs Gq de l'ocytocine dans le noyau accumbens de femelles stressées augmente l'approche sociale et diminue simultanément la vigilance sociale (Williams et al., 2020). Un résultat similaire a été trouvé au niveau du BNST médio-ventral où un KO des récepteurs à l'ocytocine prévient l'augmentation de la vigilance sociale et diminue les approches sociales chez les souris stressées (Duque-Wilckens et al., 2020). La même étude, administrant de l'ocytocine dans le BNST antéro-médian, a permis de montrer une augmentation de la vigilance sociale ainsi qu'une réduction des approches sociales chez des souris naïves au stress (Duque-Wilckens et al., 2020). Suite à ce résultat, nous pouvons proposer que l'augmentation de l'approche sociale entraîne une diminution de la vigilance sociale

Ensemble ces hypothèses laissent suggérer que dans la tâche des 3 chambres, le cortex préfrontal n'est pas impliqué de façon déterminante. De plus, il semblerait que l'augmentation d'Ach perturbe la prise d'informations, aboutissant à moins d'interaction avec le congénère. En revanche, l'inhibition de l'Ach diminuerait l'activation du préfrontal, aboutissant à un comportement orienté vers une motivation naturelle (le contact social) qui nécessite peu d'organisation ou d'adaptation (contrairement au SIT) et qui se met en place spontanément.

3. Effet du microcircuit local sur la libération d'Ach

Plusieurs études ont montré que l'activité cholinergique, médiée par les récepteurs nicotiques au sein du cortex préfrontal et de l'hippocampe, module la libération de dopamine, de sérotonine, de noradrénaline, de GABA et de glutamate (Besson and Forget, 2016; Rollema et al., 2011; pour revue voir dos Santos Coura and Granon, 2012)

La dopamine est impliquée dans la flexibilité comportementale, les processus de récompense, la prise de décision et les processus attentionnels (Granon and Floresco, 2009; Jenni et al., 2017). L'étude de Jenni et collaborateur (2017) a permis de montrer que les récepteurs D1 et D2 de la dopamine dans le cortex préfrontal avaient une action différente dans une prise de décision risquée et incertaine. Ces auteurs ont réalisé une tâche comportementale où la souris est dans une chambre séparée avec deux leviers à pression. Sur l'un des leviers il y aura une petite récompense (pellet sucrée) que l'on obtiendra pour tous les essais. D'un autre côté, il y aura un levier qui comprend une récompense plus importante (4 pellets sucrées) mais au fil du temps, la probabilité d'obtenir la plus grosse récompense diminuait de 100% à 12.5%. A la place, la souris n'obtenait pas de récompense. La **Figure 63** résume le protocole expérimental utilisé. Les auteurs se sont intéressés à l'implication des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 du PFC. Pour cela, ils ont utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des récepteurs D1 et D2. Ils ont également observé l'effet de la perturbation de ces récepteurs sur les projections vers le Nac et le BLA en inactivant ces structures en parallèle.

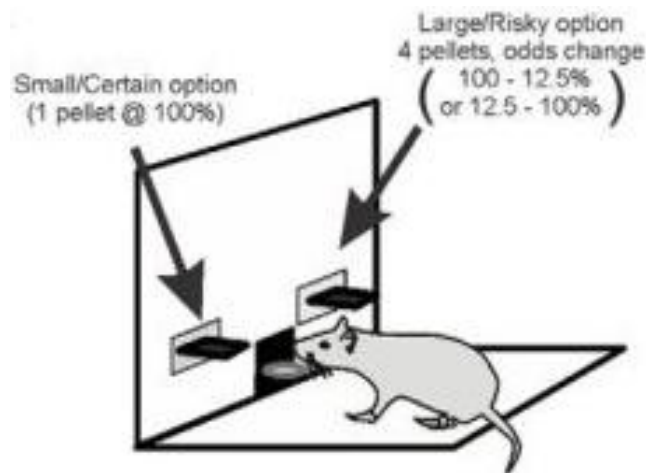


Figure 64. Protocole expérimental permettant de mesurer le choix de l'animal dans une tâche de choix ou la récompense est incertaine. Schéma issu de Jenni et collaborateurs (2017).

Les résultats de cette étude montrent que les neurones qui contiennent les récepteurs de type D1 dans le CPF, interagissent principalement avec le noyau accumbens et sont impliqués dans le renforcement des gains ainsi que dans l'atténuation des pertes. En revanche, les neurones qui contiennent les récepteurs de type D2 dans le CPF interagissent avec le BLA et sont impliqués dans le changement de jugement des choix récompensant et non récompensant. Cette étude montre donc l'implication des récepteurs dopaminergiques dans les choix risqués. Ces quelques exemples confirment que le cortex préfrontal est impliqué dans les comportements sociaux et les décisions risquées. La libération d'Ach du préfrontal peut perturber les régulations dopaminergiques et sérotoninergiques du préfrontal, aboutissant à une mauvaise décision et ainsi une mauvaise interaction.

La sérotonine peut jouer un rôle dans les comportements sociaux, peut-être en lien avec le degré d'incertitude et de risque (au sens, imprévisibilité de l'issue des actions sociales) de ces contextes. En effet, les souris qui prennent le plus de risque dans une tâche de décision présentent des niveaux de sérotonine plus faibles de façon constitutive, notamment au niveau préfrontal (Pittaras et al., 2016a). Par ailleurs, la prise de risque a été associée à l'activité sérotoninergique chez plusieurs espèces (Beaudet et al., 2017; Macoveanu et al., 2013). Ainsi, il a été montré que, suite à une rencontre sociale, l'activité des neurones sérotoninergiques du raphé sont activés (Yugita et al., 2013) et que des souris isolées à l'adolescence ont des taux de

sérotonine et de dopamine plus importants dans le CPF médian et le Nac que des souris non privées de contacts sociaux. Cette augmentation entraîne par ailleurs plus de jeu, de combat, de contact social ainsi que de la dominance. En revanche, l'administration d'un agoniste 5-HT_{1A} réduit ces comportements à un niveau normal (Han et al., 2011). Ces études montrent ainsi l'influence de la sérotonine sur un ensemble de comportements sociaux, surtout ceux liés à la dominance et au contrôle de l'agressivité, comme cela a été décrit il y a plusieurs décennies (Kiser et al., 2012; Saudou et al., 1994).

Dans le cortex préfrontal, il existe des récepteurs à la sérotonine appartenant à deux grandes familles sur les interneurons et les neurones pyramidaux (Puig and Gullledge, 2011). les récepteurs 5-HT_{1A}, qui sont inhibiteurs, et les récepteurs 5-HT_{2A}, qui sont activateurs (Pham and Gardier, 2019; Puig and Gullledge, 2011)). Les récepteurs 5-HT_{3A} sont également exprimés mais en plus faible quantité (voir **Figure 64 A**). La libération d'Ach permet d'augmenter la libération de sérotonine via les nAChRs, présents sur les terminaisons sérotoninergiques (dos Santos Coura and Granon, 2012). De plus, la revue de Puig et collaborateurs (2011) discute qu'en fonction de la population cellulaire du PFC, l'action de la 5-HT peut être excitatrice, inhibitrice, ou même avoir un effet bimodal. Une étude montre que l'inhibition des récepteurs 5-HT_{1A} augmente la balance E/I au profit de l'excitation, ce qui entraîne une activation des cellules pyramidales du PFC (Meunier et al., 2018; Wang et al., 2019). A l'inverse, il semble que l'activation de récepteurs 5-HT_{2A} diminue cette balance (Puig and Gullledge, 2011). Ainsi, au niveau préfrontal la sérotonine peut jouer comme un activateur ou un inhibiteur de la balance E/I. Le DRN, qui comporte les neurones 5-HT projetant au PFC, est une structure très importante pour certains comportements sociaux, comme la dominance par exemple. Des études ont montré que les neurones pyramidaux glutamatergiques du PFC projettent au DRN, principalement sur des neurones GABAergiques. Une proportion plus modeste va jouer directement sur la sérotonine (voir **figure 64 B**). Sur un plan mécanistique, la libération d'Ach, dont je montre qu'elle diminue les approches et dominance sociale sans altérer la motivation sociale, pourrait, indirectement, promouvoir la libération de 5-HT (**Figure 64**). Ceci ne semble pas, à première vue, cohérent avec les effets de la 5-HT sur la dominance sociale (Han et al., 2011). Cependant, dans cet article, les souris sont isolées depuis l'adolescence jusqu'à l'âge adulte, ce qui modifie considérablement l'équilibre des neurotransmetteurs et la connectivité fonctionnelle du PFC (Yamamuro et al., 2018). L'inhibition

de la libération d'Ach provoque à la fois une augmentation des approches sociales et une diminution de la dominance. Cette inhibition augmenterait l'activité des neurones pyramidaux du CPF, ce qui, selon le modèle décrit par Puig & Guillem (2011), conduirait à la diminution de l'activité 5-HT. On voit que les relations Ach-5-HT seules ne permettent pas d'expliquer ces effets sociaux. Cependant, si on intègre à cette réflexion les effets de l'inhibition de la libération d'Ach sur les USV (qui diminuent en fréquence pendant les approches sociales et, ainsi, peuvent considérablement modifier les réactions du visiteur), on peut imaginer que cette combinaison d'informations sociales (comportementales et de communication) ne permet pas à la souris hôte de recueillir des informations sociales cohérentes. Là encore, cependant, il faut noter que l'inhibition de la libération d'Ach ne modifie pas l'attrait pour le congénère (résultats de la tâche de 3-chambre).

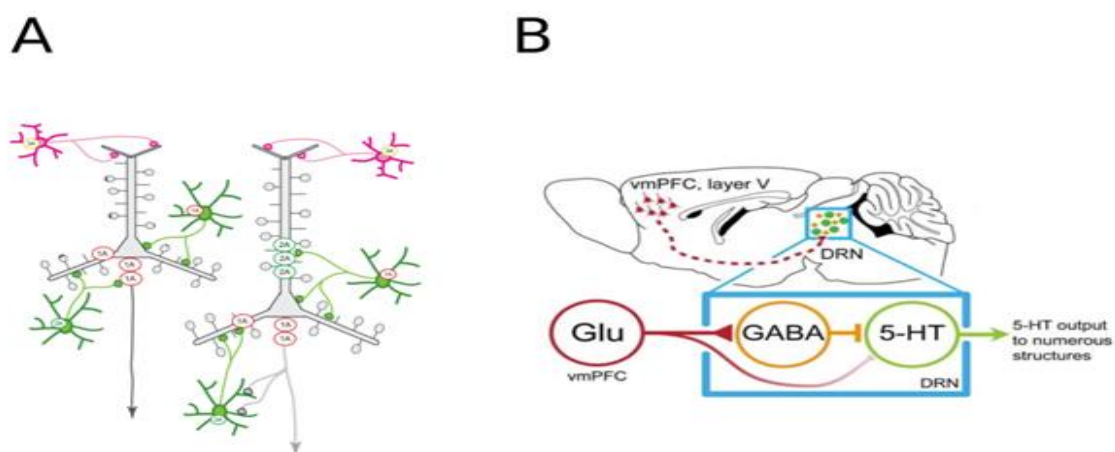


Figure 65. Hypothèse du rôle de la sérotonine dans les comportements sociaux. A) Répartition des récepteurs 5-HT au niveau des interneurones et des neurones pyramidaux (issu de Puig et Guillem, 2011). B) La projection des neurones glutamatergiques du cortex préfrontal se réalise en grande majorité sur les neurones GABAergiques et, dans une plus petite portion, sur les neurones sérotoninergiques du DRN. L'augmentation de l'activité des neurones GABAergiques entraîne une diminution de la quantité de sérotonine (D'après Cholin et al., 2015).

4. La modulation de l'Ach entraîne une mauvaise communication vocale au cours des interactions sociales

La modulation de l'Ach perturbe les approches et les échappements de l'hôte. Mais cette modulation influence aussi les comportements du visiteur. En effet, la libération de

l'acétylcholine provoque une augmentation des approches du visiteur, alors que l'inhibition de la libération de l'Ach provoque une diminution des approches du visiteur. Dans ces deux cas, la souris visiteuse réalise plus d'échappements. Ceci permet de montrer que, même si la souris visiteuse n'est pas stimulée par l'optogénétique, elle s'adapte au comportement de son congénère.

Nous pouvons observer que la libération ou l'inhibition de l'acétylcholine provoquent une augmentation de l'échappement de la souris visiteuse. Ce résultat permet de supposer que lors d'une approche ou d'un contact social, une transmission d'informations sociales altérées ou incongrues peut, en retour, conduire la souris visiteuse à réduire les temps de contact. Ce résultat semble en faveur du rôle que l'acétylcholine joue dans le codage et/ou le décodage de l'information sociale. Les vocalisations ultrasoniques participent aux interactions sociales, d'une façon qui reste encore largement à déterminer. Il a été montré que les USVs sont un marqueur émotionnel de l'état de l'animal qui les émet (Chabout et al., 2012) et qu'elles sont modulées à la fois par l'environnement dans lequel le comportement social se déroule et par l'environnement de vie des animaux (Chabout et al., 2012, 2013; Lefebvre et al., 2020). En particulier, la fréquence d'émission est un indicateur de l'état émotionnel, avec une fréquence d'autant plus élevée que la souris est dans une situation agréable (pour revue (Simola and Granon, 2019)). Nos résultats montrent que la libération de l'Ach augmente la fréquence maximale des USVs émises. Même si je n'ai pas établi de corrélation significative entre les USVs lors de l'approche sociale, du contact ni lors de la fuite du visiteur, la synchronisation des USVs et du comportement a permis de montrer que la fréquence des USV augmentait pour presque tous les comportements sociaux. Cette augmentation de la fréquence pourrait être un indice du changement d'émotion plus positive de la souris hôte (mais il faut rappeler qu'à l'heure actuelle, nous n'avons que des indices indirects de qui vocalise). Nous proposons donc, qu'en raison de cet état émotionnel plus positif, la souris visiteuse augmente les approches (Kummer et al., 2011; Wang et al., 2008). Les résultats montrent également que la souris visiteuse augmente les échappements après un contact. Il est donc possible que l'émission des USVs entraîne un état émotionnel de la souris hôte plus positif, même elle effectue significativement moins d'approche (et d'actions dominantes) que ce qui est classiquement attendu dans ce contexte.

Il est intéressant de se questionner sur la définition d'une interaction sociale « de qualité » et sur la manière dont la souris doit se comporter lorsqu'un congénère vocalise à une fréquence plus haute qu'habituellement dans cette situation. De même, on peut se demander ce que perçoit une souris et ce qu'elle utilise comme information pour sélectionner une action. Il est par conséquent délicat de comprendre ce mismatch entre les USVs et le comportement : bien que les émissions d'USVs soient de fréquence plus élevée, ce qui est traditionnellement associé à un état émotionnel plus positif, la souris hôte effectue moins d'approches et moins de contacts sociaux. Donc, je peux émettre l'hypothèse que la souris visiteuse n'arrive pas à comprendre le comportement de la souris hôte et que, par conséquent, elle choisit d'échapper au contact social. En ce qui concerne l'inhibition de la libération d'acétylcholine, mes résultats montrent que, suite à la synchronisation du comportement avec les USVs, nous observons une diminution de la fréquence maximale des vocalisations pour certains comportements spécifiques comprenant le contact et l'approche. Par conséquent, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition de la libération d'Ach perturbe l'émission des vocalisations, non pas de façon générale, mais de façon spécifique aux séquences sociales. La souris visiteuse répond à ces contacts de mauvaise qualité (ou trop nombreux), par une augmentation des échappements.

Ainsi, l'activation comme l'inhibition de la libération d'Ach préfrontale perturbe la transmission d'informations sociales, parfois de façon subtile, mais seulement dans les situations sociales nécessitant de la flexibilité comportementale.

Comprendre de quelle manière l'information sociale ou les émotions sont transmises chez l'animal pourrait permettre de mieux interpréter et de mieux comprendre comment s'élaborent les interactions sociales. Plusieurs études ont montré que l'expression faciale des souris pouvait refléter leur état émotionnel (Barat et al., 2018; Dolensek et al., 2020; Girard and Bellone, 2020; Langford et al., 2010; Parr et al., 2005) Chez la souris, une échelle évalue l'expression faciale suite à la douleur (« mouse grimace scale » en anglais) en laboratoire (Langford et al., 2010). De plus, d'autres études ont tenté de détecter différents états (Dolensek et al., 2020; Girard and Bellone, 2020). Ces auteurs ont mesuré le plaisir, le dégoût, la douleur, l'inconfort, l'immobilité (« freezing ») et la fuite. Ils ont corrélé ces différents états à des expressions faciales spécifiques grâce à des méthodes de machine learning. Une autre

méthode non invasive, la thermographie, a été utilisée pour mesurer l'anxiété (Gjendal et al., 2018) dans laquelle la température du corps, des yeux et de la queue est mesurée. Les auteurs concluent qu'une modification de la température des différentes parties du corps peut refléter un changement d'état émotionnel. Ces méthodes ne sont cependant pas assez sensibles et restent très chronophages. Des développements futurs permettront probablement leur utilisation dans les interactions sociales.

Comme introduit au début de ce manuscrit, la modulation de fréquence des USVs reflète l'état émotionnel des rongeurs (Brudzynski, 2007, 2015; Burgdorf et al., 2007, 2011; Lefebvre et al., 2020), les hautes fréquences étant associées aux comportements de jeu et aux contacts sociaux. Les vocalisations de basse fréquence sont aussi associées à des états émotionnels négatifs comme des comportements anxieux. Les USVs de basse fréquence seraient associées au système cholinergique mésolimbique ascendant (Brudzynski, 2014). Ce système prend sa source dans le noyau tegmental latéro-dorsal (LDT). Le LDT innerve les structures mésencéphaliques telles que l'ATV, les noyaux du raphé, le locus coeruleus et le noyau gris périaqueductal (PAG). Mais le LDT innerve aussi la région limbique du diencephale et du cerveau antérieur en innervant l'hypothalamus, le thalamus, l'habenula latéral, le septum latéral, l'hippocampe et le cortex cingulaire (Brudzynski, 2014) Les USVs de hautes fréquences sont liées à la dopamine et provoquent la libération de dopamine (Brudzynski, 2007; Willuhn et al., 2014). Le système dopaminergique mésolimbique ascendant provient de l'ATV et projette au noyau accumbens, à l'amygdale, au septum latéral, au gyrus cingulaire et au cortex préfrontal (Brudzynski, 2007, 2015). Plusieurs travaux antérieurs ont étudié l'implication du CPFm dans la production d'USVs, principalement par lésion (Antoniadis and McDonald, 2006; Fryszak and Neafsey, 1991). Ces études menées chez le rat suggèrent que le CPFm est impliqué dans la production d'USV à 50 kHz et 22 kHz, mais sans réussir à distinguer l'aire prélimbique de l'aire infralimbique. Ainsi, le CPFm, et en particulier, le cortex prélimbique, pourrait jouer un rôle dans la production des USVs et la modulation de l'Ach pourrait perturber ce circuit. Ainsi, ces données anatomiques ont montré que le Prl projette au noyau accumbens et vers l'ATV (Ko, 2017; Vertes, 2006).

Ainsi, nos expériences consistant à moduler la libération d'Ach préfrontale, affecte directement ou indirectement l'activité des cellules pyramidales. En outre, au sein du cortex

préfrontal, des récepteurs cholinergiques nicotiniques situés sur les terminaisons dopaminergiques, sérotoninergiques, GABAergiques et glutamatergiques (pour revue voir dos Santos Coura & Granon, 2012) peuvent moduler la libération de tous ces neurotransmetteurs, suite à la libération d'Ach. Les systèmes cholinergique et dopaminergique sont très impliqués dans la modulation des USVs (Brudzynski, 2014; Brudzynski et al., 2018; Furtak and Brown, 2018), agissant comme balance (Avena et al., 2008; Hoebel et al., 2007; Ohmura et al., 2012). Ainsi, au sein du cortex préfrontal, la libération d'Ach peut augmenter la libération de dopamine au niveau local. Cette augmentation de la dopamine pourrait expliquer l'augmentation de la fréquence des USVs.

Plusieurs études ont montré que les cellules pyramidales du CPF envoient des projections glutamatergiques à l'ATV ou au noyau accumbens (Bloem et al., 2014a; Gao et al., 2007). Ces structures ont été impliquées dans les productions d'USV (Brudzynski, 2014). Comme illustré dans la **Figure 65**, l'activation du CPF diminue la libération de dopamine (DA) dans l'ATV. D'autres études montrent que l'inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV peut être due à l'activation d'interneurones GABAergiques locaux (Gao et al., 2007).

L'ensemble de ces données permet de proposer deux hypothèses (résumées **Figure 65**) : la première est que la libération d'Ach dans le Prl provoque la libération de dopamine locale, ce qui entraîne une émission d'USVs plus positives. La deuxième hypothèse suggère que la libération d'Ach dans le cortex prélimbique active les interneurones, ce qui conduit à l'inhibition des cellules pyramidales préfrontales. La libération glutamatergique serait donc moins importante au niveau de l'ATV. Nous avons par conséquent moins d'activation des interneurones GABA de l'ATV et, ainsi, plus de libération de dopamine, ce qui provoque des USVs à plus haute fréquence. Ces deux hypothèses ne sont pas incompatibles et nous pouvons très bien imaginer qu'elles concourent toutes les deux à augmenter la fréquence d'émission des USVs. D'autres études seront nécessaires afin de tester ces hypothèses.

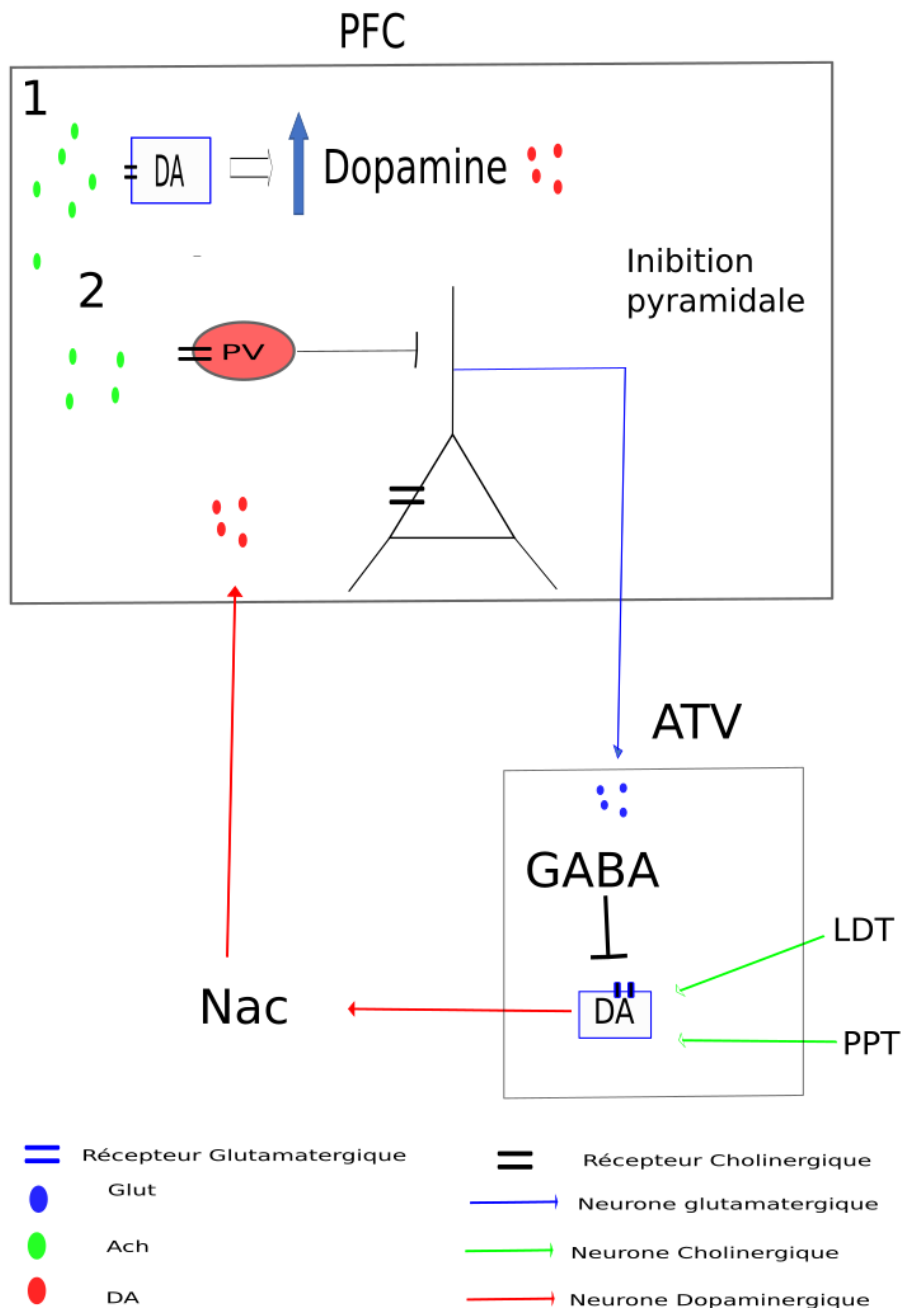


Figure 66. Hypothèse mécanistique permettant d'expliquer l'augmentation de la production des USV. 1) La libération d'Ach dans le PFC peut se fixer sur les terminaisons dopaminergiques du PFC ce qui va créer une augmentation locale de Dopamine. Les USV vont donc être de plus haute fréquence. 2) Une autre hypothèse mécanistique c'est que la libération d'Ach va inhiber les neurones pyramidaux. Ces neurones pyramidaux vont moins libérer de glutamate au niveau des neurones GABAergiques de l'ATV. Cela va donc empêcher l'inhibition des neurones dopaminergiques de l'ATV. Ce qui va donc entraîner une augmentation de la libération de dopamine de l'ATV aux noyaux accumbens qui lui aussi va augmenter sa libération de Dopamine dans le PFC. Cette augmentation de dopamine peut entraîner une augmentation des USV plus positive. Abréviations : ATV : Aire Tegmentale ventrale, DA : Dopamine, LDT : Noyau Tegmental Latéro Dorsal, NAC : Noyaux accumbens, PPT : Noyau PédonculoPontin Tegmental (PPT).

Conclusion et perspective

Ce travail de thèse avait pour but de mieux comprendre le rôle de l'Ach dans les comportements sociaux. Pour ce faire, j'ai utilisé des souris ChAT-IRES-Cre exprimant la Cre recombinase au sein des neurones cholinergiques. Ayant caractérisé ces souris, j'ai pu montrer qu'elles n'ont pas de troubles sensoriels ni sociaux majeurs et qu'elles peuvent donc être utilisées pour étudier les effets de la modulation de la libération locale d'acétylcholine dans les comportements sociaux. Ce travail de thèse m'a permis de montrer que la libération d'Ach libérée au sein du cortex préfrontal perturbe l'organisation des interactions sociales et la communication vocale ultrasonique. Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de mieux comprendre le microcircuit local du cortex préfrontal. De plus, la meilleure compréhension des informations sociales transmises pourra permettre d'approfondir ce résultat. Ces différents points seront discutés et mis en perspective dans les parties suivantes.

1. Modulation spécifique de l'Ach pendant un comportement spécifique.

Les résultats montrent que la modulation de l'acétylcholine perturbe les approches, les contacts et les échappements sociaux. Afin de mieux comprendre ces résultats, nous pourrions proposer de moduler l'activité cholinergique pendant un comportement spécifique en utilisant une approche optogénétique en « close loop ». Par exemple, je choiserais de moduler la libération d'Ach au moment où la souris commence à s'approcher de son congénère, ou bien pendant le contact social, et de quantifier les éventuels effets comportementaux, ou encore de moduler la libération d'Ach pendant les séquences de stop, puisqu'il a été montré que les stops sont des points de choix après lesquels l'animal peut déclencher des séquences sociales très variées (de Chaumont et al., 2012). Si la modulation d'Ach durant les stops modifie significativement le répertoire social, nous aurons alors une indication que l'Ach joue un rôle important sur les décisions sociales.

2. Compréhension et Dissection du microcircuit du cortex préfrontal

Les données que j'ai obtenues pendant ma thèse montrent que, outre les séquences comportementales, la libération d'Ach perturbe la communication vocale. Afin de poursuivre cette hypothèse j'envisagerai, par exemple, de mieux comprendre le fonctionnement du microcircuit préfrontal pendant les interactions sociales. Afin d'adresser cette question, je m'intéresserai tout d'abord aux neurones pyramidaux qui sont les voies de sortie du CPF, comme décrit précédemment. Mesurer l'activité des neurones pyramidaux durant la tâche d'interaction sociale, tout en bloquant ou activant pharmacologiquement la libération d'Ach, donnera des indications quant aux rôles des neurones préfrontaux. Pour cela, j'utiliserai la technique d'endoscopie, avec laquelle je me suis familiarisé pendant ma thèse. Cette technique permet, grâce à une protéine qui devient fluorescente en fonction de la quantité de calcium, de visualiser *in vivo* l'activité calcique des neurones (Aharoni and Hoogland, 2019; Cai et al., 2016; Jennings et al., 2019; Jung et al., 2015; Liberti et al., 2017; Ouzounov et al., 2017; Resendez et al., 2016; Silva, 2017). Dans nos expériences pilotes réalisées pendant ma thèse, nous avons utilisé l'expression de la protéine fluorescente GCamp6 (Chen et al., 2013) qui, couplée à un promoteur spécifique, le CamKII, permet de cibler les neurones pyramidaux. La technique d'endoscopie présente plusieurs avantages. Tout d'abord, cette technique est utilisable chez des animaux libres de leurs mouvements et, donc, permet de l'associer à des comportements. De plus, elle permet de visualiser la localisation des neurones pyramidaux grâce au logiciel d'analyse, et de voir l'activation de chaque neurone pyramidal (Jennings et al., 2019; Lee et al., 2016). Le fait que l'on puisse enregistrer l'activité calcique de ces neurones chez un animal se comportant permet de synchroniser l'activité calcique des neurones avec le comportement social et éventuellement, avec les vocalisations.

Au cours de ma thèse, j'ai injecté un virus permettant d'exprimer la protéine GCamp6f dans les neurones pyramidaux (par un vecteur AAV avec promoteur CAMK2 spécifique des neurones pyramidaux) réagissant au calcium de manière à avoir une expression spécifique au niveau des neurones pyramidaux. J'ai également implanté un prisme dans le cortex préfrontal qui permet de les visualiser (**Figure 66 A-D**). Enfin, j'ai implanté une base plate ainsi qu'une protection qui permettent, le jour du test, de connecter le mini-endoscope (Miniscope, UCLA; Aharoni and Hoogland, 2019). J'ai ainsi pu enregistrer l'activité de neurones pyramidaux pendant le test

d'interaction sociale et le test des 3 chambres, tout comme j'ai pu synchroniser l'activation des activités calciques avec les données comportementales.

Une routine d'analyse (Min1pipe) permettant d'extraire et d'analyser les données a été développée (Lu et al., 2018; **Figure 66 E**). Les analyses sont encore en cours actuellement.

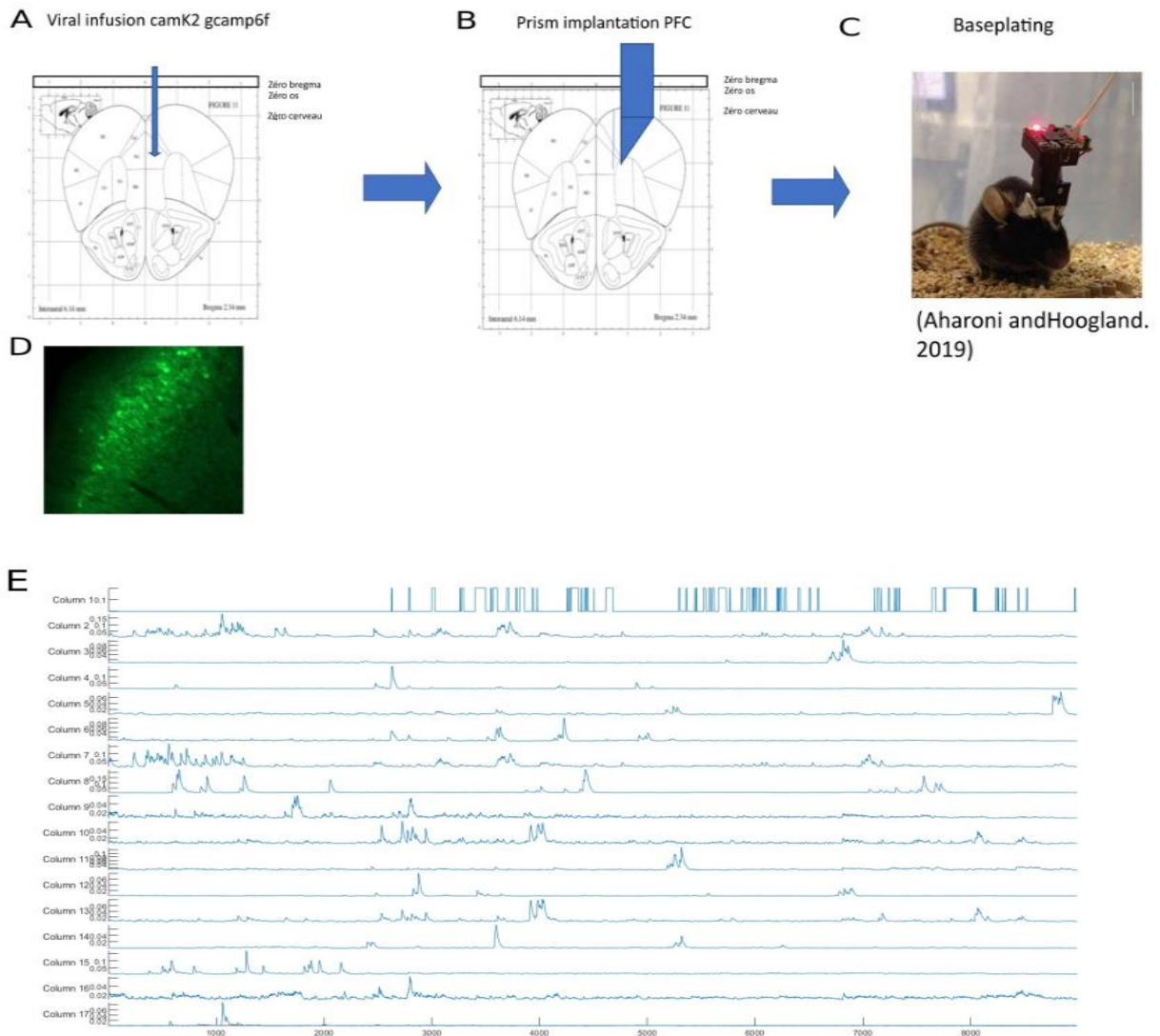


Figure 67. Implantation permettant de visualiser l'activité des neurones pyramidaux au sein du cortex préfrontal. A) Infusion du virus CamK2-GCamp6f marqueur spécifique des neurones pyramidaux. B) Schéma d'implantation du prisme. C) Baseplate et endoscope sur la tête de l'animal qui permet d'imager et d'enregistrer l'activation des neurones pyramidaux. D) Fluorescence des neurones pyramidaux. E) Exemple de tracé calcique obtenu. Chaque ligne correspond à un neurone spécifique.

Je pourrais aussi mesurer l'activité des terminaisons cholinergiques de l'Ach durant l'interaction sociale, de façon à mieux comprendre mes résultats d'optogénétique. L'activité des terminaisons cholinergiques et des neurones pyramidaux, mesurées durant le test d'interaction sociale, pourront ensuite être comparées. Cette comparaison permettra de comprendre de quelle manière l'acétylcholine module l'activité préfrontale et, notamment, sur quels types cellulaires elle agit. Nous pouvons atteindre cet objectif grâce à la photométrie fibrée (Akam and Walton, 2019; Gunaydin et al., 2014). Cette technique est globalement similaire à l'endoscopie, puisqu'elle permet de mesurer l'intensité de fluorescence de toutes structures ou neurones ayant intégrés la protéine fluorescente. Cependant, une des différences majeures avec l'endoscopie est qu'elle permet de quantifier l'activité calcique de chaque neurone du champ de vue, et ainsi d'avoir une organisation spatiale des neurones communiquant entre eux. L'endoscopie permet de mesurer l'activité de chaque neurones individuellement alors que la photométrie fibrée mesure la fluorescence globale. De plus, cette technique nécessite uniquement l'implantation d'une fibre optique grâce à laquelle on peut émettre et recevoir la fluorescence. Cela limite donc les lésions cérébrales créées par l'introduction d'un prisme sur la tête de l'animal. De plus, les terminaisons cholinergiques sont en quantité assez faible dans le cortex préfrontal et leur forme (varicosités) n'est pas reconnaissable de façon automatique par le logiciel d'analyse, contrairement aux cellules pyramidales. L'utilisation de la technique endoscopie peut donc s'avérer difficile.

Durant ma thèse, j'ai déjà réalisé des expériences préliminaires. La première étape consistait à trouver un virus qui arrivait à s'exprimer au sein des neurones cholinergiques. J'ai essayé de faire exprimer plusieurs virus GCamp6f au niveau des terminaisons cholinergiques préfrontales. Après plusieurs tentatives infructueuses, nous avons décidé de changer de stratégie. Au lieu de visualiser les terminaisons cholinergiques, je faisais exprimer aux neurones du PFC un récepteur à l'Ach modifié (GRAB) couplé à la GFP qui émettait de la fluorescence lorsque l'Ach s'y fixait (**Figure 67**, Jing et al., 2018). Pour l'instant, j'ai réussi à visualiser l'expression du senseur cholinergique au niveau des terminaisons cholinergiques du cortex préfrontal par immunohistochimie. Le mécanisme qui permet d'émettre et de recevoir la lumière est en cours de développement (collaboration Darine Abi Haidar, INMC, Orsay).

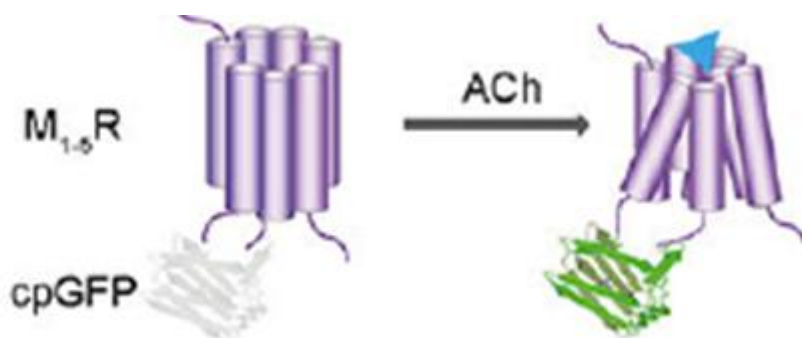


Figure 68. Senseur cholinergique utilisé Ce récepteur est un récepteur muscarinique modifié auquel on a couplé une GFP. Lorsque l'ACh se fixe sur ce récepteur, cela déclenche l'émission de la GFP que l'on peut alors quantifier.

En complément de ces manipulations nous pouvons mesurer l'activation des neurones pyramidaux suite à la modulation d'acétylcholine en agissant conjointement sur les interneurons. Pour cela, je combinerai les souris ChAT-IRES-Cre avec des souris Gad2-IRES-Cre qui expriment la Cre recombinase au sein des neurones GABAergiques. Après développement et caractérisation du phénotype social de ces souris, je pourrai moduler les neurones GABAergiques en même temps que les terminaisons cholinergiques préfrontales en utilisant les opsines appropriées.

3. Une meilleure compréhension des émotions permettrait une meilleure compréhension de l'analyse du comportement social.

3.1. Voir les états émotionnels de l'autre animal

Comme vu précédemment dans la partie Résultats et Discussion, les souris présentent une altération émotionnelle mesurée par leurs vocalisations ultrasoniques. Cette altération pourrait être à l'origine de la mauvaise communication évoquée par mes résultats dans notre test d'interaction sociale. La meilleure compréhension des informations échangées lors de l'interaction sociale pourrait améliorer notre compréhension de l'effet de la modulation cholinergique dans les comportements sociaux. Une première étape pour comprendre les informations sociales est d'essayer de comprendre les informations qui sont transmises lors de la tâche d'interaction sociale. Des études ont montré que la souris était capable de discriminer l'émotion ou l'état émotionnel d'un congénère (Scheggia et al., 2020). Dans cette étude, les auteurs comparent la condition « bien être » (un état émotionnel plus positif généré par le fait

d'abreuver un animal après l'avoir privé d'eau pendant 24h), à un état neutre ou bien d'un état négatif à un état neutre. L'état neutre est caractérisé par la présence d'eau fournie ad libitum durant toute la durée de l'expérience. Chaque souris est placée dans un compartiment différent, séparée par une plaque en plexiglass opaque (**Figure 68**). On introduit ensuite une souris naïve devant chaque compartiment et on mesure le temps passé dans chacun d'entre eux. Pour générer un état émotionnel négatif, les auteurs ont réalisé un stress de contention pendant 15 minutes. Les résultats montrent que la souris passe plus de temps dans le compartiment associé à l'état positif ou à l'état négatif, que dans le compartiment émotionnellement neutre (Ferretti et al., 2019; Scheggia et al., 2020), montrant ainsi que les souris sont capables de discriminer les états émotionnels de leurs congénères.

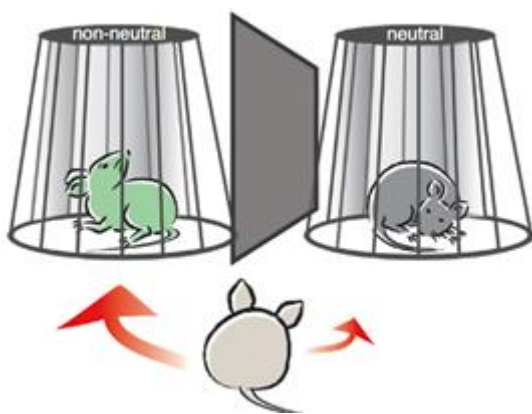


Figure 69. Expérience permettant de discriminer l'état émotionnel d'un congénère chez la souris. Une des deux souris stimuli (la verte par exemple) a subi soit un stress de contention, ou après restriction hydrique de 23h, a consommé de l'eau ad libitum, et donc se trouve dans un état émotionnel positif. La souris neutre a été élevée dans les conditions normales sans aucun stress ni de privation hydrique (Sterley and Bains, 2021).

Les auteurs ont également déterminé quels circuits neuronaux étaient impliqués dans cette discrimination émotionnelle. Leurs résultats montrent que les projections ocytocinergiques du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus au noyau central de l'amygdale (CeA) sont responsables de la discrimination des émotions (Ferretti et al., 2019). Une autre étude réalisée par la même équipe a montré que les interneurons à la somatostatine (SOM) du cortex préfrontal (CPF) sont impliqués dans la discrimination des états affectifs (Scheggia et al., 2020). Ces deux études permettent de montrer que l'amygdale et le CPF sont impliqués dans la

discrimination des états affectifs. Cette interprétation est en lien avec l'hypothèse que la modulation d'Ach intervient dans la balance E/I par l'intermédiaire des interneurones. Ces données étayent l'hypothèse que j'ai développée plus haut selon laquelle, la modulation d'Ach agit au niveau des interneurones, perturbant ainsi la discrimination des états affectifs pendant les comportements sociaux qui nécessitent des adaptations et actions flexibles et adaptées, comme ceci est le cas dans le SIT.

Il serait intéressant de reproduire les expériences de discrimination des états affectifs en modulant la libération d'Ach par optogénétique. Ce qui serait particulièrement intéressant serait de réaliser ces manipulations alternativement sur la souris qui effectue le choix et sur les souris qui sont sous le pot, afin qu'elles expriment des états positifs, neutres ou négatifs. Cela permettrait d'évaluer le rôle de l'Ach à la fois dans l'émission et dans la perception des états émotionnels. Nous pouvons également enregistrer les vocalisations ultrasoniques des souris dans chaque pot et de la souris réalisant le choix.

3.2. Ressentir les émotions de l'autre

L'étude de Church (1959) est la toute première à interroger la réponse émotionnelle de l'autre chez les rongeurs (Church, 1959). Dans cette étude, Church entraîne un rat à obtenir de la nourriture en appuyant sur un levier. Lors de l'obtention de la nourriture un deuxième rat recevait un choc électrique. Suite aux chocs électriques, le premier rat va arrêter de presser et ainsi renonce à la récompense. Cette étude montre que le rat est sensible à la détresse d'un congénère. Les rats sont aussi capables d'effectuer des comportements d'aide. En effet, l'étude de Rice and Gainer, 1962 est l'une des premières à montrer un comportement pro-social chez le rongeur. Les auteurs ont entraîné les rats à soulager la détresse d'un partenaire social en appuyant sur un levier pour faire descendre un congénère suspendu en l'air. En revanche, il n'appuyait pas sur ce levier quand il s'agissait de faire descendre un bloc de polystyrène. Cependant, une autre expérience vient nuancer cette interprétation. En effet, Lavery and Foley, 1963 ont émis l'hypothèse que les émissions de signaux de détresse peuvent être gênantes et, par conséquent, l'appui sur le levier permettait simplement de les faire cesser. Les études de Church (1959) et de Rice & Gainer (1962) suggèrent que les rongeurs peuvent faire preuve d'empathie.

La notion d'empathie a beaucoup été débattue. En effet, de Waal définit l'empathie comme « tout processus qui émerge du fait que les observateurs comprennent les états d'autrui en activant des représentations personnelles, neurales et mentales de cet état, y compris la capacité d'être affecté par l'état émotionnel d'autrui et de le partager, d'évaluer les raisons de l'état d'autrui et de s'identifier à l'autre, en adoptant son point de vue. » (de Waal and Preston, 2017). En plus de cette définition, de Wall et Preston (2017) suggèrent plusieurs niveaux d'empathie, incluant, au niveau le plus simple, la contagion émotionnelle qui est la capacité à ressentir les sentiments ou états d'une autre personne sans en avoir conscience (Sivaselvachandran et al., 2018). S'ajoutent ensuite des couches plus complexes impliquant la préoccupation de l'état d'autrui et les tentatives pour les améliorer, appelées préoccupations sympathiques. Le niveau plus élaboré d'empathie serait l'attribution de l'état émotionnel d'autrui plutôt que de soi-même. Cette dernière étape, appelée « prise de perspective empathique » est la « capacité à adopter la perspective affective d'autrui : par exemple, comprendre sa situation et ses besoins spécifiques, indépendamment des siens, ce qui nécessite toujours l'accès à des représentations personnelles de l'état de l'autre » (voir **Figure 69 A**).

Un autre modèle théorique de l'empathie a aussi été décrit par Panksepp and Panksepp, 2013 qui décomposent l'empathie en trois niveaux (**Figure 69 B**) : le niveau primaire, sous cortical, qui implique la contagion émotionnelle, le niveau secondaire des ganglions de la base et des structures limbiques qui permet l'apprentissage et la mémorisation, et le processus tertiaire qui implique les structures corticales et limbiques et qui sont nécessaires à l'empathie cognitive. Chaque niveau peut influencer les autres par contrôle ascendant ou descendant (**Figure 69**).

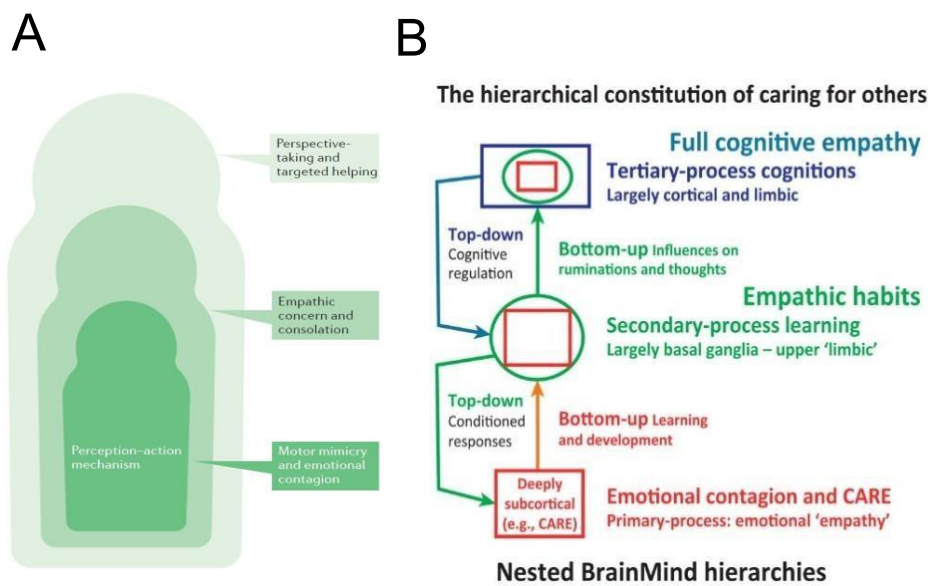


Figure 70. Les différents modèles théoriques de l'empathie. A) Modèle des poupées gigognes. La plus petite poupée représente le plus petit niveau d'empathie et chaque poupée ajoute un niveau plus complexe d'empathie (d'après de Waal & Preston, 2017). B) Modèle de Panksepp et Panksepp (2013) qui décompose l'empathie en trois niveaux.

Les plus hauts niveaux d'empathie ont déjà été montrés chez les humains. Par exemple, la théorie de l'esprit peut être définie comme « la capacité d'attribuer des états mentaux à autrui, tels que des connaissances, des intentions et des croyances » (de Waal and Preston, 2017). Chez le rongeur, aucune méthode indiscutable n'a permis de mettre en évidence de hauts niveaux d'empathie. On ne peut donc actuellement pas répondre à la question de savoir si les rongeurs sont capables d'empathie de haut niveau. Cependant, il a été montré que les rongeurs sont capables de contagion émotionnelle et de transférer la peur ou la douleur à un autre rongeur. En effet, dans une tâche d'observateur/démonstrateur deux rat sont misent dans une cage séparée par une plaque transparente en plexiglass. Le démonstrateur va être soumis à un conditionnement de peur alors que l'observateur n'est soumis à aucun conditionnement. L'observateur va néanmoins réagir au stimulus en exprimant des comportements de peur ou de douleur (Carrillo et al., 2019; Karwicka et al., 2021; Meyza et al., 2017). Les auteurs ont conclu que le rat observateur était capable de percevoir la douleur de l'autre. D'autres expériences montrent également que la peur peut être transmise socialement. Par exemple, après avoir reçu plusieurs chocs électriques, un rat est placé en présence d'un congénère naïf (qui n'a pas reçu de choc électrique) et on les laisse interagir librement. On remarque alors lorsqu'on

présente le son prédisant l'arrivée du choc électrique aux deux rats, qu'ils réagissent de façon similaire. Ceci montre que le rat ayant subi le choc électrique a transmis sa peur au rat naïf. Les mêmes phénomènes ont été observés pour le transfert de la douleur (Meyza et al., 2017).

On pourrait ainsi imaginer une expérience qui reproduirait l'expérience démonstrateur/expérimentateur et l'expérience de transmission de la peur sociale démontrée précédemment, en modulant l'Ach au sein du cortex préfrontal. Cela permettrait de savoir si l'Ach joue bien un rôle dans la discrimination des émotions des congénères. Ces résultats pourraient être mis en perspective de nos résultats d'interaction sociale.

D'autres études ont montré que les rongeurs étaient capables d'établir des comportements prosociaux. Ce sont des comportements destinés à aider une autre souris. Un des tests pour mesurer le comportement prosocial chez le rat est celui développé par Ben-Ami Bartal et collaborateurs (2011). Dans cette étude, les rats sont entraînés à ouvrir intentionnellement une cage comprenant un compagnon de cage en détresse. Il a été montré que les rats n'ouvraient la porte que si la cage contenait un compagnon en détresse et non si elle était vide ou si elle contenait un objet inanimé. De plus ce comportement n'a pas l'air d'être motivé par un contact social car quand les rats avaient le choix entre libérer un congénère piégé ou ouvrir le dispositif pour obtenir une friandise de chocolat, ils ouvraient généralement les deux dispositifs et partageaient le chocolat (Ben-Ami Bartal et al., 2011; Sivaselvachandran et al., 2018). Fait intéressant, il a été montré que les rats libèrent uniquement les rats de même souche, sauf si les deux animaux de souches différentes sont élevés ensemble pendant un certain temps (Meyza et al., 2017). Ces résultats montrent que la familiarité peut induire des comportements prosociaux (Meyza et al., 2017; Puścian et al., 2021). Les comportements d'aide ou les comportements prosociaux peuvent intervenir lors de tests d'interaction sociale. Nous pouvons donc imaginer que si l'Ach modifie les comportements prosociaux ou les comportements d'aide en réalisant l'expérience de libération citée précédemment (Ben-Ami Bartal et al., 2011), je peux supposer que cela aura un impact sur notre test d'interaction sociale. Cela pourra nous donner une meilleure interprétation des faits observés dans notre test.

L'ensemble des données présentées ici suggère que le ressenti de l'état émotionnel du congénère est un facteur très important lors des interactions sociales. Le cortex préfrontal joue

un rôle majeur dans les processus d'empathie. De plus, des expériences au laboratoire ont montré que l'état émotionnel, généré par exemple par l'exposition à un stress aigu, modifie de façon importante le répertoire et les interactions sociales (Nosjean et al., 2015), ainsi que l'activité et la connectivité du cortex préfrontal (Nosjean and Granon, 2021; Nosjean et al., 2018). Ainsi, étudier les processus d'empathie ou les comportements prosociaux pendant les interactions pourrait permettre d'avoir une meilleure compréhension de nos résultats.

3.3. Rôle des vocalisations ultrasoniques : Seulement un marqueur émotionnel ?

Afin d'approfondir mes travaux, nous pouvons aussi essayer d'améliorer l'étude des vocalisations ultrasoniques. Comme décrit précédemment, les USVs sont principalement émises pendant les contacts sociaux, particulièrement lorsque la souris hôte est derrière la souris visiteuse (Chabout et al., 2012; Ferhat et al., 2015). De plus, lors de l'interaction sociale des arguments suggèrent que c'est la souris hôte qui émet le plus d'USVs (Ferhat et al., 2015). L'étude de Chabout et collaborateurs (2012) a discriminé une dizaine d'USVs émises lors des interactions sociales. À partir de cette étude et de la possibilité de synchroniser les USVs au comportement social, je pourrais émettre l'hypothèse que des USVs spécifiques pourraient conduire à un comportement déterminé, par exemple, une approche suivie d'un contact social. Cette étude peut cependant s'avérer compliquée car il faudrait un grand nombre de vocalisations de souris enregistrées durant l'interaction sociale. De plus, l'émission d'USVs présente une grande variabilité et n'est pas stéréotypée, ce qui rend la recherche plus difficile. Mais il n'est pas impossible d'imaginer que des séquences spécifiques en termes de fréquence, de types de vocalisation ou d'autres paramètres permettent de prédire un comportement. Des études ont montré que chez les rats taupes, chaque individu a une signature individuelle spécifique et, au sein du même groupe social, ces rats ont un dialecte spécifique de sorte qu'il pouvait détecter la présence d'un individu venant d'une autre colonie (Barker et al., 2021). Cet argument est en faveur du fait que les vocalisations ultrasoniques ont une signification pour les rongeurs. Par conséquent, il peut être intéressant de continuer à étudier le rôle des vocalisations ultrasoniques dans l'élaboration des interactions sociales.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de montrer que les souris ChAT-IRES-Cre exprimant la Cre recombinase présentait un phénotype social et de communication normal. La libération ou l'inhibition de la libération d'Ach dans les terminaisons cholinergiques du cortex préfrontal au cours des comportements sociaux a permis l'obtention de plusieurs résultats. Tout d'abord, cette modulation cholinergique préfrontale ne perturbe pas la motivation à interagir avec un congénère. En revanche, lors des interactions sociales, la libération d'Ach provoque une diminution de la dominance et des approches sociales, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des vocalisations ultrasonores alors que l'inhibition de la libération d'acétylcholine provoque une diminution de la dominance et une augmentation des approches sociales ainsi qu'une diminution de la fréquence des vocalisations ultrasonores. Une hypothèse est que la perturbation de la communication acoustique par la modulation cholinergique préfrontale induit des comportements sociaux inappropriés. L'acétylcholine préfrontale joue un rôle déterminant dans la libération locale d'autres neurotransmetteurs tels que la dopamine, la sérotonine, le GABA et le glutamate, permettant ainsi le filtrage attentionnel des informations sociales. Notre étude montre, pour la première fois, le rôle spécifique de l'acétylcholine préfrontale dans le décodage des informations sociales comme dans l'organisation des comportements sociaux.

Référence bibliographique

Aasum, E., Hafstad, A.D., Severson, D.L., and Larsen, T.S. (2003). Age-Dependent Changes in Metabolism, Contractile Function, and Ischemic Sensitivity in Hearts From db/db Mice. *Diabetes* 52, 434–441. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.2.434>.

Abrams, P., Andersson, K.-E., Buccafusco, J.J., Chapple, C., de Groat, W.C., Fryer, A.D., Kay, G., Laties, A., Nathanson, N.M., Pasricha, P.J., et al. (2006). Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* 148, 565–578. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706780>.

Adolphs, R. (2001). The neurobiology of social cognition. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 231–239. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00202-6).

Adolphs, R. (2009). The Social Brain: Neural Basis of Social Knowledge. *Annu. Rev. Psychol.* 60, 693–716. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163514>.

Aharoni, D., and Hoogland, T.M. (2019). Circuit Investigations With Open-Source Miniaturized Microscopes: Past, Present and Future. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 141. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00141>.

Ahl, A.S. (1986). The role of vibrissae in behavior: a status review. *Vet. Res. Commun.* 10, 245–268. <https://doi.org/10.1007/BF02213989>.

Akam, T., and Walton, M.E. (2019). pyPhotometry: Open source Python based hardware and software for fiber photometry data acquisition. *Sci. Rep.* 9, 3521. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39724-y>.

Albers, H.E. (2012). The regulation of social recognition, social communication and aggression: vasopressin in the social behavior neural network. *Horm. Behav.* 61, 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.10.007>.

Allen, B.D., Singer, A.C., and Boyden, E.S. (2015). Principles of designing interpretable optogenetic behavior experiments. *Learn. Mem.* 22, 232–238. <https://doi.org/10.1101/lm.038026.114>.

Allsop, S.A., Vander Weele, C.M., Wichmann, R., and Tye, K.M. (2014). Optogenetic insights on the relationship between anxiety-related behaviors and social deficits. *Front. Behav. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00241>.

Antoniadis, E.A., and McDonald, R.J. (2006). Fornix, medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and mediodorsal thalamic nucleus: roles in a fear-based context discrimination task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 85, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.08.011>.

Aoki, S., Liu, A.W., Zucca, A., Zucca, S., and Wickens, J.R. (2015). Role of Striatal Cholinergic Interneurons in Set-Shifting in the Rat. *J. Neurosci.* 35, 9424–9431. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0490-15.2015>.

Araujo, J.A., Studzinski, C.M., and Milgram, N.W. (2005). Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 411–422. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.12.008>.

Arroyo, S., Bennett, C., Aziz, D., Brown, S.P., and Hestrin, S. (2012). Prolonged Disynaptic Inhibition in the Cortex Mediated by Slow, Non- $\alpha 7$ Nicotinic Excitation of a Specific Subset of Cortical Interneurons. *J. Neurosci.* *32*, 3859–3864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0115-12.2012>.

Arroyo, S., Bennett, C., and Hestrin, S. (2014). Nicotinic modulation of cortical circuits. *Front. Neural Circuits* *8*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00030>.

Avale, M.E., Faure, P., Pons, S., Robledo, P., Deltheil, T., David, D.J., Gardier, A.M., Maldonado, R., Granon, S., Changeux, J.-P., et al. (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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807635105>.

Avale, M.E., Chabout, J., Pons, S., Serreau, P., De Chaumont, F., Iivo-Marin, J., Bourgeois, J., Masos, U., Changeux, J., and Granon, S. (2011). Prefrontal nicotinic receptors control novel social interaction between mice. *FASEB J.* *25*, 2145–2155. <https://doi.org/10.1096/fj.10-178558>.

Avena, N.M., Bocarsly, M.E., Rada, P., Kim, A., and Hoebel, B.G. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiol. Behav.* *94*, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.01.008>.

Babinet, C. (1998). Un nouveau pas dans l'utilisation du système Cre-LoxP chez les cellules souches embryonnaires de souris : la création de remaniements chromosomiques. *médecine/sciences* *11*, 1154. <https://doi.org/10.4267/10608/2426>.

Báez-Mendoza, R., and Schultz, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. *Front. Neurosci.* *7*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00233>.

Ballinger, E.C., Ananth, M., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2016). Basal Forebrain Cholinergic Circuits and Signaling in Cognition and Cognitive Decline. *Neuron* *91*, 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.006>.

Barat, E., Wirth, S., and Duhamel, J.-R. (2018). Face cells in orbitofrontal cortex represent social categories. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E11158–E11167. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806165115>.

Barker, A.J., Vevjurko, G., Bennett, N.C., Hart, D.W., Mograby, L., and Lewin, G.R. (2021). Cultural transmission of vocal dialect in the naked mole-rat. *Science* *371*, 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.abc6588>.

BARNETT, S.A. (1958). AN ANALYSIS OF SOCIAL BEHAVIOUR IN WILD RATS. *Proc. Zool. Soc. Lond.* *130*, 107–152. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1958.tb00565.x>.

Bartfai, T., Iverfeldt, K., Fisone, G., and Serfözö, P. (1988). Regulation of the release of coexisting neurotransmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *28*, 285–310. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.28.040188.001441>.

Beaudet, G., Paizanis, E., Zoratto, F., Lacivita, E., Leopoldo, M., Freret, T., Laviola, G., Boulouard, M., and Adriani, W. (2017). LP-211, a selective 5-HT7 receptor agonist, increases novelty-preference and promotes risk-prone behavior in rats. *Synap. N. Y. N* *71*. <https://doi.org/10.1002/syn.21995>.

Bechara, A., Damasio, A.R., Damasio, H., and Anderson, S.W. (1994). Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition* *50*, 7–15. .

- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., and Damasio, A.R. (1996). Failure to respond autonomically to anticipated future outcomes following damage to prefrontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 6, 215–225. .
- Bejanin, S., Cervini, R., Mallet, J., and Berrard, S. (1994). A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J. Biol. Chem.* 269, 21944–21947. .
- Ben-Ami Bartal, I., Decety, J., and Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science* 334, 1427–1430. <https://doi.org/10.1126/science.1210789>.
- Bernstein, J.G., and Boyden, E.S. (2011). Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends Cogn. Sci.* 15, 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.10.003>.
- Berridge, .C. (2 9 . ‘Li in g’ and ‘wanting’ food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol. Behav.* 97, 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.044>.
- Besson, M., and Forget, B. (2016). Cognitive Dysfunction, Affective States, and Vulnerability to Nicotine Addiction: A Multifactorial Perspective. *Front. Psychiatry* 7, 160. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00160>.
- Besson, M., Granon, S., Mameli-Engvall, M., Cloéz-Tayarani, I., Maubourguet, N., Cormier, A., Cazala, P., David, V., Changeux, J.-P., and Faure, P. (2007). Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8155–8160. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702698104>.
- Besson, M., Forget, B., Correia, C., Blanco, R., and Maskos, U. (2019). Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in *CHRNA5*: a role in alcohol dependence and feeding behavior. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 44, 1906–1916. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0462-0>.
- Bhatnagar, S., Vining, C., Iyer, V., and Kinni, V. (2006). Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal function, body temperature, body weight and food intake with repeated social stress exposure in rats. *J. Neuroendocrinol.* 18, 13–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01375.x>.
- Bicks, L.K., Koike, H., Akbarian, S., and Morishita, H. (2015). Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Front. Psychol.* 6, 1805. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01805>.
- Bicks, L.K., Yamamuro, K., Flanigan, M.E., Kim, J.M., Kato, D., Lucas, E.K., Koike, H., Peng, M.S., Brady, D.M., Chandrasekaran, S., et al. (2020). Prefrontal parvalbumin interneurons require juvenile social experience to establish adult social behavior. *Nat. Commun.* 11, 1003. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14740-z>.
- Bielsky, I.F., and Young, L.J. (2004). Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25, 1565–1574. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.05.019>.
- Birrell, J.M., and Brown, V.J. (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 4320–4324. .
- Björklund, A., and Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006>.

- Blanchard, R.J., Hebert, M.A., Ferrari, P., Palanza, P., Figueira, R., Blanchard, D.C., and Parmigiani, S. (1998). Defensive behaviors in wild and laboratory (Swiss) mice: The mouse defense test battery. *Physiol. Behav.* *65*, 201–209. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00012-2).
- Bloem, B., Poorthuis, R.B., and Mansvelder, H.D. (2014a). Cholinergic modulation of the medial prefrontal cortex: the role of nicotinic receptors in attention and regulation of neuronal activity. *Front. Neural Circuits* *8*, 17. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00017>.
- Bloem, B., Schoppink, L., Rotaru, D.C., Faiz, A., Hendriks, P., Mansvelder, H.D., van de Berg, W.D.J., and Wouterlood, F.G. (2014b). Topographic mapping between basal forebrain cholinergic neurons and the medial prefrontal cortex in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 16234–16246. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3011-14.2014>.
- Boukersi, H., Lebaili, N., Nosjean, A., Samson, N., Faure, A., and Granon, S. (2021). Effects of water restriction on social behavior and 5-HT neurons density in the dorsal and median raphe nuclei in mice. *Behav. Brain Res.* *399*, 113022. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113022>.
- Boulanger-Bertolus, J., and Mouly, A.-M. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. *Brain Sci.* *11*, 616. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050616>.
- Bourin, M. (2002). Bases anatomiques et neurobiologiques de l'anxiété. *PSN Volume 11*, 39–52. .
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* *8*, 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>.
- Boyer, F., Jaouen, F., Ibrahim, E.C., and Gascon, E. (2019). Deficits in Social Behavior Precede Cognitive Decline in Middle-Aged Mice. *Front. Behav. Neurosci.* *13*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00055>.
- Branchi, I., Santucci, D., Vitale, A., and Alleva, E. (1998). Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Dev. Psychobiol.* *33*, 249–256. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199811\)33:3<249::aid-dev5>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199811)33:3<249::aid-dev5>3.0.co;2-r).
- Brandstätter, E., and Körner, C. (2014). Attention in risky choice. *Acta Psychol. (Amst.)* *152*, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.actpsy.2014.08.008>.
- Brown, D.A. (2010). Muscarinic Acetylcholine Receptors (mAChRs) in the Nervous System: Some Functions and Mechanisms. *J. Mol. Neurosci.* *41*, 340–346. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9377-2>.
- Brudzynski, S.M. (2007). Ultrasonic calls of rats as indicator variables of negative or positive states: Acetylcholine–dopamine interaction and acoustic coding. *Behav. Brain Res.* *182*, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.004>.
- Brudzynski, S.M. (2014). The Ascending Mesolimbic Cholinergic System—A Specific Division of the Reticular Activating System Involved in the Initiation of Negative Emotional States. *J Mol Neurosci* *10*.
- Brudzynski, S.M. (2015). Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr. Neuropharmacol.* *13*, 180–192. <https://doi.org/10.2174/1570159X13999150210141444>.

- Brudzynski, S.M., Silkstone, M.J.D., and Mulvihill, K.G. (2018). Chapter 23 - Ascending Activating Systems of the Brain for Emotional Arousal. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, S.M. Brudzynski, ed. (Elsevier), pp. 239–251.
- Bubser, M., Byun, N., Wood, M.R., and Jones, C.K. (2012). Muscarinic Receptor Pharmacology and Circuitry for the Modulation of Cognition. In *Muscarinic Receptors*, A.D. Fryer, A. Christopoulos, and N.M. Nathanson, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 121–166.
- Burgdorf, J., Wood, P.L., Kroes, R.A., Moskal, J.R., and Panksepp, J. (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav. Brain Res.* *182*, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.010>.
- Burgdorf, J., Panksepp, J., and Moskal, J.R. (2011). Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *35*, 1831–1836. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.11.011>.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 30–40. <https://doi.org/10.1038/nrn1809>.
- Bussey, T.J., Muir, J.L., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (1997). Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat. *Behav. Neurosci.* *111*, 920–936. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.111.5.920>.
- Cai, D.J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., Wei, B., Veshkini, M., La-Vu, M., Lou, J., et al. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature* *534*, 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature17955>.
- Carrillo, M., Han, Y., Migliorati, F., Liu, M., Gazzola, V., and Keysers, C. (2019). Emotional Mirror Neurons in the Rat's Anterior Cingulate Cortex. *Curr. Biol.* *29*, 1301-1312.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.024>.
- Cervini, R., Houhou, L., Pradat, P.F., Béjanin, S., Mallet, J., and Berrard, S. (1995). Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *J. Biol. Chem.* *270*, 24654–24657. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.24654>.
- Chabout, J., Serreau, P., Ey, E., Bellier, L., Aubin, T., Bourgeron, T., and Granon, S. (2012). Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment. *PLoS ONE* *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029401>.
- Chabout, J., Cressant, A., Hu, X., Edeline, J.-M., and Granon, S. (2013). Making choice between competing rewards in uncertain vs. safe social environment: role of neuronal nicotinic receptors of acetylcholine. *Front. Hum. Neurosci.* *7*, 468. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00468>.
- Chabout, J., Sarkar, A., Dunson, D.B., and Jarvis, E.D. (2015). Male mice song syntax depends on social contexts and influences female preferences. *Front. Behav. Neurosci.* *9*, 76. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00076>.
- Champtiaux, N., and Changeux, J.-P. (2004). Knockout and knockin mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Prog. Brain Res.* *145*, 235–251. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(03\)45016-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(03)45016-4).

- Chang, Q., Savage, L.M., and Gold, P.E. (2006). Microdialysis measures of functional increases in ACh release in the hippocampus with and without inclusion of acetylcholinesterase inhibitors in the perfusate. *J. Neurochem.* 97, 697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03765.x>.
- de Chaumont, F., Coura, R.D.-S., Serreau, P., Cressant, A., Chabout, J., Granon, S., and Olivo-Marin, J.-C. (2012). Computerized video analysis of social interactions in mice. *Nat. Methods* 9, 410–417. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1924>.
- Chen, P., and Hong, W. (2018). Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron* 98, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>.
- Chen, E., Lallai, V., Sherafat, Y., Grimes, N.P., Pushkin, A.N., Fowler, J., and Fowler, C.D. (2018). Altered Baseline and Nicotine-Mediated Behavioral and Cholinergic Profiles in ChAT-Cre Mouse Lines. *J. Neurosci.* 38, 2177–2188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1433-17.2018>.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Chevallier, C., Kohls, G., Troiani, V., Brodtkin, E.S., and Schultz, R.T. (2012). The social motivation theory of autism. *Trends Cogn. Sci.* 16, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.02.007>.
- Chudasama, Y., and Robbins, T.W. (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: Comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol. Psychol.* 73, 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.01.005>.
- Church, R.M. (1959). Emotional reactions of rats to the pain of others. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 52, 132–134. <https://doi.org/10.1037/h0043531>.
- Clutton-Brock, T. (2009). Cooperation between non-kin in animal societies. *Nature* 462, 51–57. <https://doi.org/10.1038/nature08366>.
- Collins, A.L., Aitken, T.J., Huang, I.-W., Shieh, C., Greenfield, V.Y., Monbouquette, H.G., Ostlund, S.B., and Wassum, K.M. (2019). Nucleus Accumbens Cholinergic Interneurons Oppose Cue-Motivated Behavior. *Biol. Psychiatry* 86, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.02.014>.
- Contestabile, A., Casarotto, G., Girard, B., Tzanoulinou, S., and Bellone, C. (2021). Deconstructing the contribution of sensory cues in social approach. *Eur. J. Neurosci.* 53. <https://doi.org/10.1111/ejn.15179>.
- Cooper, J.D., Lindholm, D., and Sofroniew, M.V. (1994). Reduced transport of [125I]nerve growth factor by cholinergic neurons and down-regulated TrkA expression in the medial septum of aged rats. *Neuroscience* 62, 625–629. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90462-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90462-6).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.03.006>.
- Coura, R.S., Cressant, A., Xia, J., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.C., Pelloux, Y., Dalley, J.W., and Granon, S. (2013). Nonaggressive and adapted social cognition is controlled by the interplay between noradrenergic and nicotinic receptor mechanisms in the prefrontal cortex. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4343–4354. <https://doi.org/10.1096/fj.13-231084>.

- Crittenden, J.R., Lacey, C.J., Lee, T., Bowden, H.A., and Graybiel, A.M. (2014). Severe drug-induced repetitive behaviors and striatal overexpression of VAcHT in ChAT-ChR2-EYFP BAC transgenic mice. *Front. Neural Circuits* 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00057>.
- Dalley, J.W., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.09.006>.
- Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A.M., and Damasio, A.R. (1994). The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264, 1102–1105. .
- Dani, J.A., and Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>.
- Darvesh, A.S., Carroll, R.T., Geldenhuys, W.J., Gudelsky, G.A., Klein, J., Meshul, C.K., and Van der Schyf, C.J. (2011). In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 109–127. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.547189>.
- Dautan, D., Huerta-Ocampo, I., Witten, I.B., Deisseroth, K., Bolam, J.P., Gerdjikov, T., and Mena-Segovia, J. (2014). A Major External Source of Cholinergic Innervation of the Striatum and Nucleus Accumbens Originates in the Brainstem. *J. Neurosci.* 34, 4509–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5071-13.2014>.
- Daviu, N., Bruchas, M.R., Moghaddam, B., Sandi, C., and Beyeler, A. (2019). Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol. Stress* 11, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100191>.
- De Gois, S., Houhou, L., Oda, Y., Corbex, M., Pajak, F., Thévenot, E., Vodjdani, G., Mallet, J., and Berrard, S. (2000). Is RE1/NRSE a common cis-regulatory sequence for ChAT and VAcHT genes? *J. Biol. Chem.* 275, 36683–36690. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006895200>.
- Decker, M.W. (1987). The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res.* 434, 423–438. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(87\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0165-0173(87)90007-5).
- Defaix, C., Solgadi, A., Pham, T.H., Gardier, A.M., Chaminade, P., and Tritschler, L. (2018). Rapid analysis of glutamate, glutamine and GABA in mice frontal cortex microdialysis samples using HPLC coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 152, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.039>.
- Deisseroth, K. (2011). Optogenetics. *Nat. Methods* 8, 26–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.324>.
- Deisseroth, K. (2015). Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience. *Nat. Neurosci.* 18, 1213–1225. <https://doi.org/10.1038/nn.4091>.
- Deng, W., Goldys, E.M., Farnham, M.M.J., and Pilowsky, P.M. (2014). Optogenetics, the intersection between physics and neuroscience: light stimulation of neurons in physiological conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R1292-1302. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00072.2014>.
- Dere, E., Dahm, L., Lu, D., Hammerschmidt, K., Ju, A., Tantra, M., Kästner, A., Chowdhury, K., and Ehrenreich, H. (2014). Heterozygous *ambra1* deficiency in mice: a genetic trait with autism-like behavior restricted to the female gender. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 181. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00181>.

- Docherty, J.R. (2007). Use of knockout technology to resolve pharmacological problems. *Br. J. Pharmacol.* *150*, 1–2. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706941>.
- Dolensek, N., Gehrlach, D.A., Klein, A.S., and Gogolla, N. (2020). Facial expressions of emotion states and their neuronal correlates in mice. *Science* *368*, 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.aaz9468>.
- Doya, K. (2008). Modulators of decision making. *Nat. Neurosci.* *11*, 410–416. <https://doi.org/10.1038/nn2077>.
- Dugué, G., and Tricoire, L. (2019). Principes et applications de l'optogénétique en neuroscience.
- Dulac, C., and Wagner, S. (2006). Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu. Rev. Genet.* *40*, 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.093937>.
- Duque-Wilckens, N., Torres, L.Y., Yokoyama, S., Minie, V.A., Tran, A.M., Petkova, S.P., Hao, R., Ramos-Maciel, S., Rios, R.A., Jackson, K., et al. (2020). Extrahypothalamic oxytocin neurons drive stress-induced social vigilance and avoidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *117*, 26406–26413. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011890117>.
- Eggermann, E., Kremer, Y., Crochet, S., and Petersen, C.C.H. (2014). Cholinergic signals in mouse barrel cortex during active whisker sensing. *Cell Rep.* *9*, 1654–1660. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.005>.
- Ehret, G. (1987). Left hemisphere advantage in the mouse brain for recognizing ultrasonic communication calls. *Nature* *325*, 249–251. <https://doi.org/10.1038/325249a0>.
- Ellegood, J., and Crawley, J.N. (2015). Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *12*, 521–533. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0360-z>.
- von Engelhardt, J., Eliava, M., Meyer, A.H., Rozov, A., and Monyer, H. (2007). Functional Characterization of Intrinsic Cholinergic Interneurons in the Cortex. *J. Neurosci.* *27*, 5633–5642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4647-06.2007>.
- Epelbaum Jacques (1992). Neuropeptides et neuromédiateurs / coordinateur, J. Epelbaum,... (Rueil-Malmaison: Laboratoires Sandoz).
- Ernst, M., and Paulus, M.P. (2005). Neurobiology of decision making: a selective review from a neurocognitive and clinical perspective. *Biol. Psychiatry* *58*, 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.004>.
- Ey, E., Torquet, N., Le Sourd, A.-M., Leblond, C.S., Boeckers, T.M., Faure, P., and Bourgeron, T. (2013). The Autism ProSAP1/Shank2 mouse model displays quantitative and structural abnormalities in ultrasonic vocalisations. *Behav. Brain Res.* *256*, 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.031>.
- Ey, E., Torquet, N., de Chaumont, F., Lévi-Strauss, J., Ferhat, A.-T., Le Sourd, A.-M., Boeckers, T.M., and Bourgeron, T. (2018). Shank2 Mutant Mice Display Hyperactivity Insensitive to Methylphenidate and Reduced Flexibility in Social Motivation, but Normal Social Recognition. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 365. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00365>.
- Faure, A., Pittaras, E., Nosjean, A., Chabout, J., Cressant, A., and Granon, S. (2017). Social behaviors and acoustic vocalizations in different strains of mice. *Behav. Brain Res.* *320*, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.003>.

- Faure, A., Nosjean, A., Pittaras, E., Duchêne, A., Andrieux, A., Gory-Fauré, S., Charvériat, M., and Granon, S. (2019). Dissociated features of social cognition altered in mouse models of schizophrenia: Focus on social dominance and acoustic communication. *Neuropharmacology* *159*, 107334. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.009>.
- Ferguson, B.R., and Gao, W.-J. (2018). PV Interneurons: Critical Regulators of E/I Balance for Prefrontal Cortex-Dependent Behavior and Psychiatric Disorders. *Front. Neural Circuits* *12*, 37. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00037>.
- Ferguson, J.N., Aldag, J.M., Insel, T.R., and Young, L.J. (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 8278–8285. .
- Ferguson, J.N., Young, L.J., and Insel, T.R. (2002). The neuroendocrine basis of social recognition. *Front. Neuroendocrinol.* *23*, 200–224. <https://doi.org/10.1006/frne.2002.0229>.
- Ferguson, S.M., Bazalakova, M., Savchenko, V., Tapia, J.C., Wright, J., and Blakely, R.D. (2004). Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8762–8767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401667101>.
- Ferhat, A.-T., Le Sourd, A.-M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Bourgeron, T., and Ey, E. (2015). Social Communication in Mice – Are There Optimal Cage Conditions? *PLoS ONE* *10*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121802>.
- Fernández, M., Mollinedo-Gajate, I., and Peñarikano, O. (2018). Neural Circuits for Social Cognition: Implications for Autism. *Neuroscience* *370*, 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.013>.
- Ferretti, V., Maltese, F., Contarini, G., Nigro, M., Bonavia, A., Huang, H., Gigliucci, V., Morelli, G., Scheggia, D., Managò, F., et al. (2019). Oxytocin Signaling in the Central Amygdala Modulates Emotion Discrimination in Mice. *Curr. Biol. CB* *29*, 1938-1953.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.070>.
- File, S.E., Kenny, P.J., and Ouagazzal, A.M. (1998). Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav. Neurosci.* *112*, 1423–1429. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.112.6.1423>.
- Finlayson, K., Lampe, J.F., Hintze, S., Würbel, H., and Melotti, L. (2016). Facial Indicators of Positive Emotions in Rats. *PLoS ONE* *11*, e0166446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166446>.
- Flecknell, P.A. (2010). Do mice have a pain face? *Nat. Methods* *7*, 437–438. <https://doi.org/10.1038/nmeth0610-437>.
- Floresco, S.B., and Jentsch, J.D. (2011). Pharmacological enhancement of memory and executive functioning in laboratory animals. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *36*, 227–250. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.158>.
- Floresco, S.B., Ghods-Sharifi, S., Vexelman, C., and Magyar, O. (2006). Dissociable roles for the nucleus accumbens core and shell in regulating set shifting. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 2449–2457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4431-05.2006>.

- Floresco, S.B., Block, A.E., and 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. *Behav. Brain Res.* *190*, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.008>.
- Franklin, T.B., Silva, B.A., Perova, Z., Marrone, L., Masferrer, M.E., Zhan, Y., Kaplan, A., Greetham, L., Verrechia, V., Halman, A., et al. (2017). Prefrontal cortical control of a brainstem social behavior circuit. *Nat. Neurosci.* *20*, 260–270. <https://doi.org/10.1038/nn.4470>.
- Frotscher, M., Vida, I., and Bender, R. (2000). Evidence for the existence of non-GABAergic, cholinergic interneurons in the rodent hippocampus. *Neuroscience* *96*, 27–31. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00525-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00525-4).
- Fryszak, R.J., and Neafsey, E.J. (1991). The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, “freezing,” and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb. Cortex N. Y. N* *1991* *1*, 418–425. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.5.418>.
- Furey, M.L., Pietrini, P., Haxby, J.V., and Drevets, W.C. (2008). Selective Effects of Cholinergic Modulation on Task Performance during Selective Attention. *Neuropsychopharmacology* *33*, 913–923. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301461>.
- Furtak, S.C., and Brown, T.H. (2018). Chapter 9 - Limbic-System Involvement in Rat Ultrasonic Communications. In *Handbook of Ultrasonic Vocalization*, S.M. Brudzynski, ed. (Elsevier), pp. 95–108.
- Gage, F.H., Chen, K.S., Buzsaki, G., and Armstrong, D. (1988). Experimental approaches to age-related cognitive impairments. *Neurobiol. Aging* *9*, 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(88\)80129-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(88)80129-5).
- Gallagher, M., and Colombo, P.J. (1995). Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Curr. Opin. Neurobiol.* *5*, 161–168. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80022-0).
- Gao, M., Liu, C.-L., Yang, S., Jin, G.-Z., Bunney, B.S., and Shi, W.-X. (2007). Functional coupling between the prefrontal cortex and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 5414–5421. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5347-06.2007>.
- Gardier, A.M. (2013). Antidepressant activity: contribution of brain microdialysis in knock-out mice to the understanding of BDNF/5-HT transporter/5-HT autoreceptor interactions. *Front. Pharmacol.* *4*, 98. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00098>.
- Gesquiere, L.R., Learn, N.H., Simao, M.C.M., Onyango, P.O., Alberts, S.C., and Altmann, J. (2011). Life at the top: rank and stress in wild male baboons. *Science* *333*, 357–360. <https://doi.org/10.1126/science.1207120>.
- Gil, Z., Connors, B.W., and Amitai, Y. (1997). Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* *19*, 679–686. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80380-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80380-3).
- Girard, B., and Bellone, C. (2020). Revealing animal emotions. *Science* *368*, 33–34. <https://doi.org/10.1126/science.abb2796>.
- Gisquet-Verrier, P., and Delatour, B. (2006). The role of the rat prelimbic/infralimbic cortex in working memory: Not involved in the short-term maintenance but in monitoring and processing functions. *Neuroscience* *141*, 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.009>.

- Gjendal, K., Franco, N.H., Ottesen, J.L., Sørensen, D.B., and Olsson, I.A.S. (2018). Eye, body or tail? Thermography as a measure of stress in mice. *Physiol. Behav.* 196, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.08.022>.
- Glock, C., Nagpal, J., and Gottschalk, A. (2015). Microbial Rhodopsin Optogenetic Tools: Application for Analyses of Synaptic Transmission and of Neuronal Network Activity in Behavior. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1327, 87–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2842-2_8.
- Gong, S., Doughty, M., Harbaugh, C.R., Cummins, A., Hatten, M.E., Heintz, N., and Gerfen, C.R. (2007). Targeting Cre Recombinase to Specific Neuron Populations with Bacterial Artificial Chromosome Constructs. *J. Neurosci.* 27, 9817–9823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2707-07.2007>.
- Gradinaru, V., Thompson, K.R., and Deisseroth, K. (2008). eNpHR: a Natronomonas halorhodopsin enhanced for optogenetic applications. *Brain Cell Biol.* 36, 129–139. <https://doi.org/10.1007/s11068-008-9027-6>.
- Graef, S., Schönknecht, P., Sabri, O., and Hegerl, U. (2011). Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl.)* 215, 205–229. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2153-8>.
- Granon, S., and Changeux, J.-P. (2012). Deciding between conflicting motivations: what mice make of their prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 229, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.011>.
- Granon, S., and Floresco, S. (2009). Functional neuroanatomy of flexible behaviors in mice and rats. pp. 83–103.
- Granon, S., and Poucet, B. (1995). Medial prefrontal lesions in the rat and spatial navigation: evidence for impaired planning. *Behav. Neurosci.* 109, 474–484. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.109.3.474>.
- Granon, S., Vidal, C., Thinus-Blanc, C., Changeux, J.P., and Poucet, B. (1994). Working memory, response selection, and effortful processing in rats with medial prefrontal lesions. *Behav. Neurosci.* 108, 883–891. .
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF02246154>.
- Granon, S., Passetti, F., Thomas, K.L., Dalley, J.W., Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2000). Enhanced and impaired attentional performance after infusion of D1 dopaminergic receptor agents into rat prefrontal cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 1208–1215. .
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533498100>.
- Granon, S., Faure, A., Chauveau, F., Cressant, A., and Ey, E. (2018). Chapter 40 - Why Should My Mouse Call Me? Acoustic Communication in Mouse Models of Social Disorders: Ultrasonic Vocalizations as an Index of Emotional and Motivational States. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, S.M. Brudzynski, ed. (Elsevier), pp. 423–431.

- Gritton, H.J., Howe, W.M., Mallory, C.S., Hetrick, V.L., Berke, J.D., and Sarter, M. (2016). Cortical cholinergic signaling controls the detection of cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E1089–E1097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516134113>.
- Guillem, K., Bloem, B., Poorthuis, R.B., Loos, M., Smit, A.B., Maskos, U., Spijker, S., and Mansvelder, H.D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunits in the medial prefrontal cortex control attention. *Science* *333*, 888–891. <https://doi.org/10.1126/science.1207079>.
- Gulledge, A.T., and Stuart, G.J. (2005). Cholinergic inhibition of neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 10308–10320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2697-05.2005>.
- Gunaydin, L.A., Grosenick, L., Finkelstein, J.C., Kauvar, I.V., Fenno, L.E., Adhikari, A., Lammel, S., Mirzabekov, J.J., Airan, R.D., Zalocusky, K.A., et al. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell* *157*, 1535–1551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.017>.
- Hammerschmidt, K., Radyushkin, K., Ehrenreich, H., and Fischer, J. (2009). Female mice respond to male ultrasonic ‘songs’ with approach behaviour. *Biol. Lett.* *5*, 589–592. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0317>.
- Han, X., Wang, W., Shao, F., and Li, N. (2011). Isolation rearing alters social behaviors and monoamine neurotransmission in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of adult rats. *Brain Res.* *1385*, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.035>.
- Harno, E., Cottrell, E.C., and White, A. (2013). Metabolic Pitfalls of CNS Cre-Based Technology. *Cell Metab.* *18*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.019>.
- Hasselmo, M.E., and Giocomo, L.M. (2006). Cholinergic modulation of cortical function. *J. Mol. Neurosci.* *MN 30*, 133–135. <https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:133>.
- Hernandez-Lallement, J., Attah, A.T., Soyman, E., Pinhal, C.M., Gazzola, V., and Keyser, C. (2020). Harm to Others Acts as a Negative Reinforcer in Rats. *Curr. Biol. CB 30*, 949-961.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.017>.
- Higley, M.J., and Picciotto, M.R. (2014). Neuromodulation by Acetylcholine: Examples from Schizophrenia and Depression. *Curr. Opin. Neurobiol.* *0*, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.06.004>.
- Higley, M.J., Gittis, A.H., Oldenburg, I.A., Balthasar, N., Seal, R.P., Edwards, R.H., Lowell, B.B., Kreitzer, A.C., and Sabatini, B.L. (2011). Cholinergic interneurons mediate fast VGLUT3-dependent glutamatergic transmission in the striatum. *PLoS One* *6*, e19155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019155>.
- Hillman, K.L., and Bilkey, D.K. (2012). Neural encoding of competitive effort in the anterior cingulate cortex. *Nat. Neurosci.* *15*, 1290–1297. <https://doi.org/10.1038/nn.3187>.
- Himmler, B.T., Kisko, T.M., Euston, D.R., Kolb, B., and Pellis, S.M. (2014). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. *Behav. Processes* *106*, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.04.014>.
- Hnasko, T.S., and Edwards, R.H. (2012). Neurotransmitter Co-release: Mechanism and Physiological Role. *Annu. Rev. Physiol.* *74*, 225–243. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020911-153315>.

- Hoebel, B.G., Avena, N.M., and Rada, P. (2007). Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 617–627. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.10.014>.
- Holler, T., Berse, B., Cermak, J.M., Diebler, M.F., and Blusztajn, J.K. (1996). Differences in the developmental expression of the vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 212, 107–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12808-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12808-1).
- van Holstein, M., and Floresco, S.B. (2020). Dissociable roles for the ventral and dorsal medial prefrontal cortex in cue-guided risk/reward decision making. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 45, 683–693. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0557-7>.
- Holy, T.E., and Guo, Z. (2005). Ultrasonic Songs of Male Mice. *PLoS Biol.* 3, e386. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030386>.
- Howe, W.M., Ji, J., Parikh, V., Williams, S., Mocaër, E., Trocmé-Thibierge, C., and Sarter, M. (2010). Enhancement of attentional performance by selective stimulation of alpha4beta2(*) nAChRs: underlying cholinergic mechanisms. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 35, 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.9>.
- Huang, W.-C., Zucca, A., Levy, J., and Page, D.T. (2020). Social Behavior Is Modulated by Valence-Encoding mPFC-Amygdala Sub-circuitry. *Cell Rep.* 32, 107899. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107899>.
- Husson, M., Harrington, L., Tochon, L., Cho, Y., Ibañez-Tallon, I., Maskos, U., and David, V. (2020). β 4-Nicotinic Receptors Are Critically Involved in Reward-Related Behaviors and Self-Regulation of Nicotine Reinforcement. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40, 3465–3477. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0356-19.2020>.
- Husson, S.J., Liewald, J.F., Schultheis, C., Stirman, J.N., Lu, H., and Gottschalk, A. (2012). Microbial Light-Activatable Proton Pumps as Neuronal Inhibitors to Functionally Dissect Neuronal Networks in *C. elegans*. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040937>.
- Inagi, K., Schultz, E., and Ford, C.N. (1998). An anatomic study of the rat larynx: establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngol.--Head Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol.-Head Neck Surg.* 118, 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70378-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70378-X).
- Izquierdo, A., Newman, T.K., Higley, J.D., and Murray, E.A. (2007). Genetic modulation of cognitive flexibility and socioemotional behavior in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14128–14133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706583104>.
- Jakupovic, J., Kang, N., and Baum, M.J. (2008). Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice. *Physiol. Behav.* 93, 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.10.005>.
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., et al. (2008). Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1710–1715. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711555105>.
- Janickova, H., Prado, V.F., Prado, M.A.M., El Mestikawy, S., and Bernard, V. (2017). Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) over-expression induces major modifications of striatal cholinergic

interneuron morphology and function. *J. Neurochem.* *142*, 857–875.
<https://doi.org/10.1111/jnc.14105>.

Jenni, N.L., Larkin, J.D., and Floresco, S.B. (2017). Prefrontal Dopamine D1 and D2 Receptors Regulate Dissociable Aspects of Decision Making via Distinct Ventral Striatal and Amygdalar Circuits. *J. Neurosci.* *37*, 6200–6213. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0030-17.2017>.

Jennings, J.H., Kim, C.K., Marshel, J.H., raffiee, M., Ye, L., Quirin, S., Pak, S., ramakrishnan, C., and Deisseroth, K. (2019). Interacting neural ensembles in orbitofrontal cortex for social and feeding behaviour. *Nature* *565*, 645–649. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0866-8>.

Jing, M., Zhang, P., Wang, G., Feng, J., Mesik, L., Zeng, J., Jiang, H., Wang, S., Looby, J.C., Guagliardo, N.A., et al. (2018). A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for in vitro and in vivo studies. *Nat. Biotechnol.* *36*, 726–737. <https://doi.org/10.1038/nbt.4184>.

Johansen, J.P., Hamanaka, H., Monfils, M.H., Behnia, R., Deisseroth, K., Blair, H.T., and LeDoux, J.E. (2010). Optical activation of lateral amygdala pyramidal cells instructs associative fear learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12692–12697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002418107>.

Johnson, A.M., Ciucci, M.R., Russell, J.A., Hammer, M.J., and Connor, N.P. (2010). Ultrasonic output from the excised rat larynx. *J. Acoust. Soc. Am.* *128*, EL75-79. <https://doi.org/10.1121/1.3462234>.

Jung, S.Y., Lee, K.-W., Choi, S.-M., and Yang, E.J. (2015). Bee Venom Protects against Rotenone-Induced Cell Death in NSC34 Motor Neuron Cells. *Toxins* *7*, 3715–3726.
<https://doi.org/10.3390/toxins7093715>.

Kalmbach, A., and Waters, J. (2014). Modulation of high- and low-frequency components of the cortical local field potential via nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in anesthetized mice. *J. Neurophysiol.* *111*, 258–272. <https://doi.org/10.1152/jn.00244.2013>.

Kalmbach, A., Hedrick, T., and Waters, J. (2012). Selective optogenetic stimulation of cholinergic axons in neocortex. *J. Neurophysiol.* *107*, 2008–2019. <https://doi.org/10.1152/jn.00870.2011>.

Karvat, G., and Kimchi, T. (2014). Acetylcholine elevation relieves cognitive rigidity and social deficiency in a mouse model of autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *39*, 831–840. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.274>.

Karwicka, W., Wiatrowska, M., Kondrakiewicz, K., Knapska, E., Kursa, M.B., and Hamed, A. (2021). Relaying Aversive Ultrasonic Alarm Calls Depends on Previous Experience, Empathy, Social Buffering, or Panic? *Brain Sci.* *11*, 759. <https://doi.org/10.3390/brainsci11060759>.

Kawai, H., Lazar, R., and Metherate, R. (2007). Nicotinic control of axon excitability regulates thalamocortical transmission. *Nat. Neurosci.* *10*, 1168–1175. <https://doi.org/10.1038/nn1956>.

Kelm-Nelson, C.A., Lenell, C., Johnson, A.M., and Ciucci, M.R. (2018). Chapter 4 - Laryngeal Activity for Production of Ultrasonic Vocalizations in Rats. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, S.M. Brudzynski, ed. (Elsevier), pp. 37–43.

Kikusui, T., Sonobe, M., Yoshida, Y., Nagasawa, M., Ey, E., de Chaumont, F., Bourgeron, T., Nomoto, K., and Mogi, K. (2021). Testosterone Increases the Emission of Ultrasonic Vocalizations With Different Acoustic Characteristics in Mice. *Front. Psychol.* *12*, 680176.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.680176>.

- Kiser, D., Steemers, B., Branchi, I., and Homberg, J.R. (2012). The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *36*, 786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.12.009>.
- Kisko, T.M., Euston, D.R., and Pellis, S.M. (2015a). Are 50-khz calls used as play signals in the playful interactions of rats? III. The effects of devocalization on play with unfamiliar partners as juveniles and as adults. *Behav. Processes* *113*, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.01.016>.
- Kisko, T.M., Himmler, B.T., Himmler, S.M., Euston, D.R., and Pellis, S.M. (2015b). Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav. Processes* *111*, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.11.011>.
- Klein, J.T., Shepherd, S.V., and Platt, M.L. (2009). Social Attention and the Brain. *Curr. Biol.* *19*, R958–R962. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.010>.
- Klein, M.O., Battagello, D.S., Cardoso, A.R., Hauser, D.N., Bittencourt, J.C., and Correa, R.G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* *39*, 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>.
- Klinkenberg, I., Sambeth, A., and Blokland, A. (2011). Acetylcholine and attention. *Behav. Brain Res.* *221*, 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.033>.
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. *Front. Neural Circuits* *11*, 41. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00041>.
- Ko, S.W., Chatila, T., and Zhuo, M. (2005). Contribution of CaMKIV to injury and fear- induced ultrasonic vocalizations in adult mice. *Mol. Pain* *1*, 10. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-1-10>.
- Kokaz, S.F., Deb, P.K., Abed, S.N., Al-Aboudi, A., Das, N., Younes, F.A., Salou, R.A., Bataineh, Y.A., Venugopala, K.N., and Mailavaram, R.P. (2020). Pharmacology of Acetylcholine and Cholinergic Receptors. In *Frontiers in Pharmacology of Neurotransmitters*, P. Kumar, and P.K. Deb, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 69–105.
- Kolisnyk, B., Guzman, M.S., Raulic, S., Fan, J., Magalhães, A.C., Feng, G., Gros, R., Prado, V.F., and Prado, M.A.M. (2013). ChAT-ChR2-EYFP mice have enhanced motor endurance but show deficits in attention and several additional cognitive domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 10427–10438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0395-13.2013>.
- Kolonie, J.M., and Stern, J.M. (1990). Maternal aggression: disruption by perioral anesthesia in lactating Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol. Wash. DC* *1983* *104*, 352–360. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.104.4.352>.
- König, M., Thinnies, A., and Klein, J. (2018). Microdialysis and its use in behavioural studies: Focus on acetylcholine. *J. Neurosci. Methods* *300*, 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.08.013>.
- Kosaka, T., Tauchi, M., and Dahl, J.L. (1988). Cholinergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp. Brain Res.* *70*, 605–617. <https://doi.org/10.1007/BF00247609>.
- Koshimizu, H., Leiter, L.M., and Miyakawa, T. (2012). M4 muscarinic receptor knockout mice display abnormal social behavior and decreased prepulse inhibition. *Mol. Brain* *5*, 10. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-10>.

- Krawczyk, D.C. (2002). Contributions of the prefrontal cortex to the neural basis of human decision making. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 631–664. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(02\)00021-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(02)00021-0).
- Kruglikov, I., and Rudy, B. (2008). Perisomatic GABA Release and Thalamocortical Integration onto Neocortical Excitatory Cells Are Regulated by Neuromodulators. *Neuron* 58, 911–924. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.024>.
- Kuchibhotla, K.V., Gill, J.V., Lindsay, G.W., Papadoyannis, E.S., Field, R.E., Hindmarsh Sten, T.A., Miller, K.D., and Froemke, R.C. (2017). Parallel processing by cortical inhibition enables context-dependent behavior. *Nat. Neurosci.* 20, 62–71. <https://doi.org/10.1038/nn.4436>.
- Kummer, K., Klement, S., Eggart, V., Mayr, M.J., Saria, A., and Zernig, G. (2011). Conditioned place preference for social interaction in rats: contribution of sensory components. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 80. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00080>.
- Laland, K.N., and Plotkin, H.C. (1993). Social transmission of food preferences among Norway rats by marking of food sites and by gustatory contact. *Anim. Learn. Behav.* 21, 35–41. <https://doi.org/10.3758/BF03197974>.
- Lambe, E.K., Picciotto, M.R., and Aghajanian, G.K. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 28, 216–225. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300032>.
- Lammel, S., Hetzel, A., Häckel, O., Jones, I., Liss, B., and Roeper, J. (2008). Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57, 760–773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.022>.
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., et al. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* 7, 447–449. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>.
- Larrieu, T., Cherix, A., Duque, A., Rodrigues, J., Lei, H., Gruetter, R., and Sandi, C. (2017). Hierarchical Status Predicts Behavioral Vulnerability and Nucleus Accumbens Metabolic Profile Following Chronic Social Defeat Stress. *Curr. Biol. CB* 27, 2202–2210.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.027>.
- Lavery, J.J., and Foley, P.J. (1963). Altruism or Arousal in the Rat? *Science* 140, 172–173. <https://doi.org/10.1126/science.140.3563.172>.
- Lee, S., Kim, K., and Zhou, Z.J. (2010). Role of ACh-GABA cotransmission in detecting image motion and motion direction. *Neuron* 68, 1159–1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.031>.
- Lee, S.A., Holly, K.S., Voziyanov, V., Villalba, S.L., Tong, R., Grigsby, H.E., Glasscock, E., Szele, F.G., Vlachos, I., and Murray, T.A. (2016). Gradient Index Microlens Implanted in Prefrontal Cortex of Mouse Does Not Affect Behavioral Test Performance over Time. *PLOS ONE* 11, e0146533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146533>.
- Lefebvre, E., Granon, S., and Chauveau, F. (2020). Social context increases ultrasonic vocalizations during restraint in adult mice. *Anim. Cogn.* 23, 351–359. <https://doi.org/10.1007/s10071-019-01338-2>.
- Li, Y., and Dulac, C. (2018). Neural coding of sex-specific social information in the mouse brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 53, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.005>.

- Li, Y., Mathis, A., Grewe, B.F., Osterhout, J.A., Ahanonu, B., Schnitzer, M.J., Murthy, V.N., and Dulac, C. (2017). Neuronal Representation of Social Information in the Medial Amygdala of Awake Behaving Mice. *Cell* 171, 1176-1190.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.015>.
- Liang, B., Zhang, L., Barbera, G., Fang, W., Zhang, J., Chen, X., Chen, R., Li, Y., and Lin, D.-T. (2018). Distinct and Dynamic ON and OFF Neural Ensembles in the Prefrontal Cortex Code Social Exploration. *Neuron* 100, 700-714.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.043>.
- Liberti, W.A., Perkins, L.N., Leman, D.P., and Gardner, T.J. (2017). An open source, wireless capable miniature microscope system. *J. Neural Eng.* 14, 045001. <https://doi.org/10.1088/1741-2552/aa6806>.
- Lima, R. de F., Prado, V.F., Prado, M.A.M., and Kushmerick, C. (2010). Quantal release of acetylcholine in mice with reduced levels of the vesicular acetylcholine transporter. *J. Neurochem.* 113, 943–951. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06657.x>.
- Lin, J.Y. (2011). A se r's Guide to Channelrhodopsin Variants: Features, Limitations and Future Developments. *Exp. Physiol.* 96, 19–25. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051961>.
- Lin, D.Y., Zhang, S.-Z., Block, E., and Katz, L.C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434, 470–477. <https://doi.org/10.1038/nature03414>.
- Lin, J.Y., Knutsen, P.M., Muller, A., Kleinfeld, D., and Tsien, R.Y. (2013). ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat. Neurosci.* 16, 1499–1508. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>.
- Lindzey, G., Winston, H., and Manosevitz, M. (1961). Social dominance in inbred mouse strains. *Nature* 191, 474–476. <https://doi.org/10.1038/191474a0>.
- Liu, Y., Zhang, J., Liu, D., and Zhang, J. (2014). Vomeronasal organ lesion disrupts social odor recognition, behaviors and fitness in golden hamsters. *Integr. Zool.* 9, 255–264. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12057>.
- Lockwood, P.L., and Wittmann, M.K. (2018). Ventral anterior cingulate cortex and social decision-making. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 92, 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.030>.
- Loughlin, S.E., Foote, S.L., and Bloom, F.E. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience* 18, 291–306. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90155-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90155-7).
- Love, T.M. (2014). Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 119, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.06.011>.
- MacDonald, T., and Brudzynski, S.M. (2018). Chapter 2 - Ultrasonic Vocalizations, Their Recording, and Bioacoustic Analysis. In *Handbook of Behavioral Neuroscience*, S.M. Brudzynski, ed. (Elsevier), pp. 7–19.
- Macoveanu, J., Rowe, J.B., Hornboll, B., Elliott, R., Paulson, O.B., Knudsen, G.M., and Siebner, H.R. (2013). Serotonin 2A receptors contribute to the regulation of risk-averse decisions. *NeuroImage* 83, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.06.063>.

- Mahrt, E., Agarwal, A., Perkel, D., Portfors, C., and Elemans, C.P.H. (2016). Mice produce ultrasonic vocalizations by intra-laryngeal planar impinging jets. *Curr. Biol.* 26, R880–R881. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.032>.
- Mandairon, N., Ferretti, C.J., Stack, C.M., Rubin, D.B., Cleland, T.A., and Linster, C. (2006). Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 24, 3234–3244. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05212.x>.
- Mantanona, C.P., Alsiö, J., Elson, J.L., Fisher, B.M., Dalley, J.W., Bussey, T., and Pienaar, I.S. (2019). Altered motor, anxiety-related and attentional task performance at baseline associate with multiple gene copies of the vesicular acetylcholine transporter and related protein overexpression in ChAT::Cre+ rats. *Brain Struct. Funct.* 224, 3095–3116. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01957-y>.
- Mar, A.C., Walker, A.L.J., Theobald, D.E., Eagle, D.M., and Robbins, T.W. (2011). Dissociable effects of lesions to orbitofrontal cortex subregions on impulsive choice in the rat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 6398–6404. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6620-10.2011>.
- Marking, S., Krosnowski, K., Ogura, T., and Lin, W. (2017). Dichotomous Distribution of Putative Cholinergic Interneurons in Mouse Accessory Olfactory Bulb. *Front. Neuroanat.* 11. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00010>.
- Martos, Y.V., Braz, B.Y., Beccaria, J.P., Murer, M.G., and Belforte, J.E. (2017). Compulsive Social Behavior Emerges after Selective Ablation of Striatal Cholinergic Interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 2849–2858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3460-16.2017>.
- Martyn, A.C., De Jaeger, X., Magalhães, A.C., Kesarwani, R., Gonçalves, D.F., Raulic, S., Guzman, M.S., Jackson, M.F., Izquierdo, I., MacDonald, J.F., et al. (2012). Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 17651–17656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215381109>.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005a). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., et al. (2005b). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature03694>.
- Matamales, M., Skrbis, Z., Hatch, R.J., Balleine, B.W., Götz, J., and Bertran-Gonzalez, J. (2016). Aging-Related Dysfunction of Striatal Cholinergic Interneurons Produces Conflict in Action Selection. *Neuron* 90, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.006>.
- Matsuno-Yagi, A., and Mukohata, Y. (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 237–243. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(77\)91245-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(77)91245-1).
- Matthews, G.A., and Tye, K.M. (2019). Neural mechanisms of social homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1457, 5–25. <https://doi.org/10.1111/nyas.14016>.

Mattis, J., Tye, M., Ferenczi, E.A., Ramarishnan, C., Shea, D.J., Prakash, R., Gunaydin, L.A., Hyun, M., Fenno, L.E., Gradinaru, V., et al. (2011). Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins. *Nat. Methods* 9, 159–172. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1808>.

McAlonan, K., and Brown, V.J. (2003). Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav. Brain Res.* 146, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.09.019>.

McCormick, D.A., and Prince, D.A. (1985). Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6344–6348.

McCormick, D.A., and Prince, D.A. (1986). Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. *J. Physiol.* 375, 169–194.

McIsaac, R.S., Bedbrook, C.N., and Arnold, F.H. (2015). Recent Advances in Engineering Microbial Rhodopsins for Optogenetics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 33, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.05.001>.

Mei, L., Zhou, Y., Sun, Y., Liu, H., Zhang, D., Liu, P., and Shu, H. (2020). Acetylcholine Muscarinic Receptors in Ventral Hippocampus Modulate Stress-Induced Anxiety-Like Behaviors in Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 13. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.598811>.

Mesulam, M.M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., and Levey, A.I. (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10, 1185–1201.

Meyza, K.Z., Bartal, I.B.-A., Monfils, M.H., Panksepp, J.B., and Knapska, E. (2017). The roots of empathy: Through the lens of rodent models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.028>.

Millar, N.S., and Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.041>.

Minami, C., Shimizu, T., and Mitani, A. (2017). Neural activity in the prelimbic and infralimbic cortices of freely moving rats during social interaction: Effect of isolation rearing. *PLoS One* 12, e0176740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176740>.

Mohrhardt, J., Nagel, M., Fleck, D., Ben-Shaul, Y., and Spehr, M. (2018). Signal Detection and Coding in the Accessory Olfactory System. *Chem. Senses* 43, 667–695. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy061>.

Mora, F., Segovia, G., and del Arco, A. (2007). Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain Res. Rev.* 55, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.03.011>.

Morley, B.J., Dolan, D.F., Ohlemiller, K.K., and Simmons, D.D. (2017). Generation and Characterization of $\alpha 9$ and $\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Knockout Mice on a C57BL/6J Background. *Front. Neurosci.* 11, 516. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00516>.

Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J., and Crawley, J.N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3, 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>.

- Murugan, M., Jang, H.J., Park, M., Miller, E., Cox, J., Taliaferro, J., Parker, N.F., Bhave, V., Hur, H., Liang, Y., et al. (2017). Combined social and spatial coding in a descending projection from prefrontal cortex. *Cell* 171, 1663-1677.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.002>.
- Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395–2398. <https://doi.org/10.1126/science.1072068>.
- Nagy, P.M., and Aubert, I. (2012). Overexpression of the vesicular acetylcholine transporter increased acetylcholine release in the hippocampus. *Neuroscience* 218, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.047>.
- Nagy, P.M., and Aubert, I. (2013). B6eGFPChAT mice overexpressing the vesicular acetylcholine transporter exhibit spontaneous hypoactivity and enhanced exploration in novel environments. *Brain Behav.* 3, 367–383. <https://doi.org/10.1002/brb3.139>.
- Nieves-Martinez, E., Haynes, K., Childers, S.R., Sonntag, W.E., and Nicolle, M.M. (2012). Muscarinic receptor/G-protein coupling is reduced in the dorsomedial striatum of cognitively impaired aged rats. *Behav. Brain Res.* 227, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.10.048>.
- Noack, J., Richter, K., Laube, G., Haghgoo, H.A., Veh, R.W., and Engelmann, M. (2010). Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 568–575. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.09.013>.
- Nosjean, A., and Granon, S. (2021). Brain Adaptation to Acute Stress: Effect of Time, Social Buffering, and Nicotinic Cholinergic System. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* bhab461. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab461>.
- Nosjean, A., Cressant, A., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Chauveau, F., and Granon, S. (2015). Acute stress in adulthood impoverishes social choices and triggers aggressiveness in preclinical models. *Front. Behav. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00447>.
- Nosjean, A., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., and Granon, S. (2018). Stress-induced brain activation: buffering role of social behavior and neuronal nicotinic receptors. *Brain Struct. Funct.* 223, 4259–4274. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1745-7>.
- Nunez, A.A., Pomerantz, S.M., Bean, N.J., and Youngstrom, T.G. (1985). Effects of laryngeal denervation on ultrasound production and male sexual behavior in rodents. *Physiol. Behav.* 34, 901–905. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90011-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90011-3).
- Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature. New Biol.* 233, 149–152. <https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>.
- Ohmura, Y., Tsutsui-Kimura, I., and Yoshioka, M. (2012). Impulsive behavior and nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 413–422. <https://doi.org/10.1254/jphs.11r06cr>.
- Oizumi, H., Kuriyama, N., Imamura, S., Tabuchi, M., Omiya, Y., Mizoguchi, K., and Kobayashi, H. (2019). Influence of aging on the behavioral phenotypes of C57BL/6J mice after social defeat. *PloS One* 14, e0222076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222076>.

Isztyński, H., Polowy, R., Małz, M., Boguszewski, P.M., and Filipowski, R. (2020). Playback of Alarm and Appetitive Calls Differentially Impacts Vocal, Heart-Rate, and Motor Response in Rats. *iScience* 23, 101577. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101577>.

Oualian, C., and Gisquet-Verrier, P. (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. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 17, 654–668. <https://doi.org/10.1101/lm.1858010>.

Ouzounov, D.G., Wang, T., Wang, M., Feng, D.D., Horton, N.G., Cruz-Hernández, J.C., Cheng, Y.-T., Reimer, J., Tolia, A.S., Nishimura, N., et al. (2017). In vivo three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain. *Nat. Methods* 14, 388–390. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4183>.

Panksepp, J., and Panksepp, J.B. (2013). Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends Neurosci.* 36, 10.1016/j.tins.2013.04.009. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.009>.

Parr, L.A., Waller, B.M., and Fugate, J. (2005). Emotional communication in primates: implications for neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 716–720. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.10.017>.

Pellis, S.M., McKenna, M.M., Field, E.F., Pellis, V.C., Prusky, G.T., and Whishaw, I.Q. (1996). Uses of vision by rats in play fighting and other close-quarter social interactions. *Physiol. Behav.* 59, 905–913. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(95\)02162-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02162-0).

Pentkowski, N.S., Painter, M.R., Thiel, K.J., Peartree, N.A., Cheung, T.H.C., Deviche, P., Adams, M., Alba, J., and Neisewander, J.L. (2011). Nicotine-induced plasma corticosterone is attenuated by social interactions in male and female adolescent rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 100, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.07.005>.

Pham, T.H., and Gardier, A.M. (2019). Fast-acting antidepressant activity of ketamine: highlights on brain serotonin, glutamate, and GABA neurotransmission in preclinical studies. *Pharmacol. Ther.* 199, 58–90. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.017>.

Picciotto, M.R., and Wickman, K. (1998). Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol. Rev.* 78, 1131–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1131>.

Picciotto, M.R., Zoli, M., Léna, C., Bessis, A., Lallemand, Y., Le Novère, N., Vincent, P., Pich, E.M., Brûlet, P., and Changeux, J.P. (1995). Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 374, 65–67. <https://doi.org/10.1038/374065a0>.

Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K., and Changeux, J.P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391, 173–177. <https://doi.org/10.1038/34413>.

Picciotto, M.R., Higley, M.J., and Mineur, Y.S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76, 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>.

Pittaras, E., Cressant, A., Serreau, P., Bruijijel, J., Dellu-Hagedorn, F., Callebert, J., Rabat, A., and Granon, S. (2013). Mice Gamble for Food: Individual Differences in Risky Choices and Prefrontal Cortex Serotonin. <https://doi.org/10.4172/2155-6105.S4-011>.

Pittaras, E., Callebert, J., Chennaoui, M., Rabat, A., and Granon, S. (2016a). Individual behavioral and neurochemical markers of unadapted decision-making processes in healthy inbred mice. *Brain Struct. Funct.* *221*, 4615–4629. <https://doi.org/10.1007/s00429-016-1192-2>.

Pittaras, E.C., Faure, A., Leray, X., Moraitopoulou, E., Cressant, A., Rabat, A.A., Meunier, C., Fossier, P., and Granon, S. (2016b). Neuronal Nicotinic Receptors Are Crucial for Tuning of E/I Balance in Prelimbic Cortex and for Decision-Making Processes. *Front. Psychiatry* *7*, 171. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00171>.

Poorthuis, R.B., and Mansvelder, H.D. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 1089–1098. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.003>.

Prado, M.A.M., Reis, R.A.M., Prado, V.F., de Mello, M.C., Gomez, M.V., and de Mello, F.G. (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem. Int.* *41*, 291–299. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00044-X).

Prado, V.F., Martins-Silva, C., de Castro, B.M., Lima, R.F., Barros, D.M., Amaral, E., Ramsey, A.J., Sotnikova, T.D., Ramirez, M.R., Kim, H.-G., et al. (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* *51*, 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.005>.

Prado, V.F., Roy, A., Kolisnyk, B., Gros, R., and Prado, M.A.M. (2013). Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem. J.* *450*, 265–274. <https://doi.org/10.1042/BJ20121662>.

Prado, V.F., Janickova, H., Al-Onaizi, M.A., and Prado, M.A.M. (2017). Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience* *345*, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.013>.

Puig, M.V., and Gullledge, A.T. (2011). Serotonin and Prefrontal Cortex Function: Neurons, Networks, and Circuits. *Mol. Neurobiol.* *44*, 449–464. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8214-0>.

Puścian, A., Brysa, A., Ondraiewicz, L., Ostec, M., Iniański, M., and Knapska, E. (2021). Ability to share emotions of others as a foundation of social learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *132*, 23–36. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.11.022>.

Qu, C., and Dreher, J.-C. (2018). Sociobiology: Changing the Dominance Hierarchy. *Curr. Biol.* *28*, R167–R169. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.018>.

Ragozzino, M.E., Wilcox, C., Raso, M., and Kesner, R.P. (1999). Involvement of rodent prefrontal cortex subregions in strategy switching. *Behav. Neurosci.* *113*, 32–41. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.113.1.32>.

Ragozzino, M.E., Ragozzino, K.E., Mizumori, S.J.Y., and Kesner, R.P. (2002). Role of the Dorsomedial Striatum in Behavioral Flexibility for Response and Visual Cue Discrimination Learning. *Behav. Neurosci.* *116*, 105–115. .

Rangel, A., Camerer, C., and Montague, P.R. (2008). A framework for studying the neurobiology of value-based decision making. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 545–556. <https://doi.org/10.1038/nrn2357>.

Ratiu, P., Talos, I.-F., Haker, S., Lieberman, D., and Everett, P. (2004). The tale of Phineas Gage, digitally remastered. *J. Neurotrauma* *21*, 637–643. <https://doi.org/10.1089/089771504774129964>.

Raybuck, J.D., and Gould, T.J. (2010). The Role of Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in Trace Fear Conditioning. *Neurobiol. Learn. Mem.* *94*, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.08.001>.

Rein, M.L., and Deussing, J.M. (2012). The optogenetic (r)evolution. *Mol. Genet. Genomics MGG* *287*, 95–109. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0663-7>.

Remedios, R., Kennedy, A., Zelikowsky, M., Grewe, B.F., Schnitzer, M.J., and Anderson, D.J. (2017). Social behaviour shapes hypothalamic neural ensemble representations of conspecific sex. *Nature* *550*, 388–392. <https://doi.org/10.1038/nature23885>.

Resendez, S.L., Jennings, J.H., Ung, R.L., Namboodiri, V.M.K., Zhou, Z.C., Otis, J.M., Nomura, H., McHenry, J.A., Kosyk, O., and Stuber, G.D. (2016). Visualization of cortical, subcortical and deep brain neural circuit dynamics during naturalistic mammalian behavior with head-mounted microscopes and chronically implanted lenses. *Nat. Protoc.* *11*, 566–597. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.021>.

Rice, G.E., and Gainer, P. (1972). “Altruism” in the albino rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *55*, 123–125. <https://doi.org/10.1037/h0042276>.

Rich, E.L., and Shapiro, M. (2009). Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 7208–7219. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6068-08.2009>.

Riede, T. (2011). Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *J. Neurophysiol.* *106*, 2580–2592. <https://doi.org/10.1152/jn.00478.2011>.

Riede, T. (2013). Stereotypic laryngeal and respiratory motor patterns generate different call types in rat ultrasound vocalization. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Genet. Physiol.* *319*, 213–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1785>.

Rivalan, M., Ahmed, S.H., and Dellu-Hagedorn, F. (2009). Risk-prone individuals prefer the wrong options on a rat version of the Iowa Gambling Task. *Biol. Psychiatry* *66*, 743–749. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.04.008>.

Robbins, T.W., Granon, S., Muir, J.L., Duranton, F., Harrison, A., and Everitt, B.J. (1998). Neural systems underlying arousal and attention. Implications for drug abuse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *846*, 222–237. .

Roberts, L.H. (1975). The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics* *13*, 83–88. [https://doi.org/10.1016/0041-624x\(75\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0041-624x(75)90052-9).

Rollema, H., Wilson, G.G., Lee, T.C., Folgering, J.H.A., and Flik, G. (2011). Effect of co-administration of varenicline and antidepressants on extracellular monoamine concentrations in rat prefrontal cortex. *Neurochem. Int.* *58*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.10.015>.

Rolls, E.T. (2004). The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn.* *55*, 11–29. [https://doi.org/10.1016/S0278-2626\(03\)00277-X](https://doi.org/10.1016/S0278-2626(03)00277-X).

Rolls, E.T., Cheng, W., and Feng, J. (2020). The orbitofrontal cortex: reward, emotion and depression. *Brain Commun.* *2*, fcaa196. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa196>.

Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C.E., Choi, M.J., Lauzon, D., Lowell, B.B., and Elmquist, J.K. (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate

- energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* *13*, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.010>.
- Rosvold, H.E., Mirsky, A.F., and Pribram, K.H. (1954). Influence of amygdectomy on social behavior in monkeys. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *47*, 173–178. <https://doi.org/10.1037/h0058870>.
- Rudebeck, P.H., and Rich, E.L. (2018). Orbitofrontal cortex. *Curr. Biol. CB* *28*, R1083–R1088. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.018>.
- Rudebeck, P.H., Walton, M.E., Millette, B.H.P., Shirley, E., Rushworth, M.F.S., and Bannerman, D.M. (2007). Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *Eur. J. Neurosci.* *26*, 2315–2326. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05844.x>.
- Runfeldt, M.J., Sadovsky, A.J., and MacLean, J.N. (2014). Acetylcholine functionally reorganizes neocortical microcircuits. *J. Neurophysiol.* *112*, 1205–1216. <https://doi.org/10.1152/jn.00071.2014>.
- Ryan, B.C., Young, N.B., Moy, S.S., and Crawley, J.N. (2008). Olfactory cues are sufficient to elicit social approach behaviors but not social transmission of food preference in C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* *193*, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.06.002>.
- Salamone, J.D., Correa, M., Mingote, S., and Weber, S.M. (2003). Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *305*, 1–8. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035063>.
- Salchner, P., Lubec, G., and Singewald, N. (2004). Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour. *Behav. Brain Res.* *151*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.07.002>.
- Santana, N., and Artigas, F. (2017). Laminar and Cellular Distribution of Monoamine Receptors in Rat Medial Prefrontal Cortex. *Front. Neuroanat.* *11*, 87. <https://doi.org/10.3389/fnana.2017.00087>.
- dos Santos Coura, R., and Granon, S. (2012). Prefrontal neuromodulation by nicotinic receptors for cognitive processes. *Psychopharmacology (Berl.)* *221*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2596-6>.
- Sarna, J.R., Dyck, R.H., and Whishaw, I.Q. (2000). The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav. Brain Res.* *108*, 39–45. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00137-0).
- Sarter, M., and Kim, Y. (2015). Interpreting chemical neurotransmission in vivo: techniques, time scales, and theories. *ACS Chem. Neurosci.* *6*, 8–10. <https://doi.org/10.1021/cn500319m>.
- Sarter, M., and Parikh, V. (2005). Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrn1588>.
- Sarter, M., Parikh, V., and Howe, W.M. (2009). Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 383–390. <https://doi.org/10.1038/nrn2635>.
- Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., and Hen, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* *265*, 1875–1878. <https://doi.org/10.1126/science.8091214>.

- Saunders, A., Oldenburg, I.A., Berezovskii, V.K., Johnson, C.A., Kingery, N.D., Elliott, H.L., Xie, T., Gerfen, C.R., and Sabatini, B.L. (2015a). A direct GABAergic output from the basal ganglia to frontal cortex. *Nature* 521, 85–89. <https://doi.org/10.1038/nature14179>.
- Saunders, A., Granger, A.J., and Sabatini, B.L. (2015b). Corelease of acetylcholine and GABA from cholinergic forebrain neurons. *ELife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06412>.
- Schambra, U.B., Sulik, K.K., Petrusz, P., and Lauder, J.M. (1989). Ontogeny of cholinergic neurons in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* 288, 101–122. <https://doi.org/10.1002/cne.902880109>.
- Scheggia, D., Managò, F., Maltese, F., Bruni, S., Nigro, M., Dautan, D., Latuske, P., Contarini, G., Gomez-Gonzalo, M., Requeie, L.M., et al. (2020). Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice. *Nat. Neurosci.* 23, 47–60. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0551-8>.
- Schliebs, R., and Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* 221, 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., and Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13702–13707. <https://doi.org/10.1073/pnas.240471297>.
- Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nat. Immunol.* 8, 665–668. <https://doi.org/10.1038/ni0707-665>.
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A., and Gallagher, M. (2000). Changes in Functional Connectivity in Orbitofrontal Cortex and Basolateral Amygdala during Learning and Reversal Training. *J. Neurosci.* 20, 5179–5189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-13-05179.2000>.
- Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomeza, J., Basile, A.S., Alzheimer, C., and Wess, J. (2004). M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10117–10127. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3581-04.2004>.
- 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. Brain Res.* 225, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.016>.
- Shannon, R.J., Carpenter, K.L.H., Guilfoyle, M.R., Helmy, A., and Hutchinson, P.J. (2013). Cerebral microdialysis in clinical studies of drugs: pharmacokinetic applications. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 40, 343–358. <https://doi.org/10.1007/s10928-013-9306-4>.
- Sherman, K.A., and Friedman, E. (1990). Pre- and post-synaptic cholinergic dysfunction in aged rodent brain regions: new findings and an interpretative review. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 8, 689–708. [https://doi.org/10.1016/0736-5748\(90\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0736-5748(90)90063-8).
- Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., and Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol. Brain* 9, 11. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0191-9>.
- Silinsky, E.M. (1975). On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol.* 247, 145–162. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1975.sp010925>.

- Silva, A.J. (2017). Miniaturized two-photon microscope: seeing clearer and deeper into the brain. *Light Sci. Appl.* *6*, e17104. <https://doi.org/10.1038/lssa.2017.104>.
- Simola, N., and Granon, S. (2019). Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology* *159*, 107420. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.008>.
- Singer, T., Seymour, B., Doherty, J., Huber, R., Dolan, R.J., and Frith, C.D. (2004). Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science* *303*, 1157–1162. <https://doi.org/10.1126/science.1093535>.
- Sirotnin, Y.B., Costa, M.E., and Laplagne, D.A. (2014). Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 399. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00399>.
- Sivaselvachandran, S., Acland, E.L., Abdallah, S., and Martin, L.J. (2018). Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *91*, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.007>.
- Smith, R.S., Hu, R., DeSouza, A., Eberly, C.L., Krahe, K., Chan, W., and Araneda, R.C. (2015). Differential Muscarinic Modulation in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *35*, 10773–10785. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0099-15.2015>.
- Song, C., and Knöpfel, T. (2016). Optogenetics enlightens neuroscience drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* *15*, 97–109. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.15>.
- Song, H., Ming, G., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R.H., and Poo, M. (1997). Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* *18*, 815–826. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80320-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80320-7).
- Stalnaker, T.A., Cooch, N.K., and Schoenbaum, G. (2015). What the orbitofrontal cortex does not do. *Nat. Neurosci.* *18*, 620–627. <https://doi.org/10.1038/nn.3982>.
- Sterley, T.-L., and Bains, J.S. (2021). Social communication of affective states. *Curr. Opin. Neurobiol.* *68*, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.12.007>.
- Stowers, L. (2002). Loss of Sex Discrimination and Male-Male Aggression in Mice Deficient for TRP2. *Science* *295*, 1493–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1069259>.
- Sugita, S., Fleming, L.L., Wood, C., Vaughan, S.K., Gomes, M.P.S.M., Camargo, W., Naves, L.A., Prado, V.F., Prado, M.A.M., Guatimosim, C., et al. (2016). VAcHT overexpression increases acetylcholine at the synaptic cleft and accelerates aging of neuromuscular junctions. *Skelet. Muscle* *6*. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0105-7>.
- Tait, D.S. (2013). Tacrine improves reversal learning in older rats. *6*.
- Talbot, T., Mattern, C., de Souza Silva, M.A., and Brandão, M.L. (2017). Intranasal administration of dopamine attenuates unconditioned fear in that it reduces restraint-induced ultrasound vocalizations and escape from bright light. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *31*, 682–690. <https://doi.org/10.1177/0269881116686882>.
- Tallini, Y.N., Shui, B., Greene, K.S., Deng, K.-Y., Doran, R., Fisher, P.J., Zipfel, W., and Kotlikoff, M.I. (2006). BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral

- cholinergic neurons. *Physiol. Genomics* 27, 391–397.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00092.2006>.
- Thiele, A. (2013). Muscarinic signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 36, 271–294.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062012-170433>.
- Thor, D.H., and Holloway, W.R. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 1000–1006. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.96.6.1000>.
- Tice, M.A., Hashemi, T., Taylor, L.A., and McQuade, R.D. (1996). Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 92, 70–76.
[https://doi.org/10.1016/0165-3806\(95\)01515-9](https://doi.org/10.1016/0165-3806(95)01515-9).
- Ting, J.T., and Feng, G. (2014). Recombineering strategies for developing next generation BAC transgenic tools for optogenetics and beyond. *Front. Behav. Neurosci.* 8.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00111>.
- Tolu, S., Eddine, R., Marti, F., David, V., Graupner, M., Pons, S., Baudonnat, M., Husson, M., Besson, M., Reperant, C., et al. (2013). Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement. *Mol. Psychiatry* 18, 382–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.83>.
- Tritschler, L., Kheirbek, M.A., Dantec, Y.L., Mendez-David, I., Guilloux, J.-P., Faye, C., Doan, J., Pham, T.H., Hen, R., David, D.J., et al. (2017). Optogenetic activation of granule cells in the dorsal dentate gyrus enhances dopaminergic neurotransmission in the Nucleus Accumbens. *Neurosci. Res.*
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.12.002>.
- Uddin, L.Q. (2021). Cognitive and behavioural flexibility: neural mechanisms and clinical considerations. *Nat. Rev. Neurosci.* 22, 167–179. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00428-w>.
- Ungerstedt, U. (1991). Microdialysis-principles and applications for studies in animals and man. *J. Intern. Med.* 230, 365–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.1991.tb00459.x>.
- Vandecasteele, M., Varga, V., Berényi, A., Papp, E., Barthó, P., Venance, L., Freund, T.F., and Buzsáki, G. (2014). Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13535–13540.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1411233111>.
- Vertes, R.P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142, 1–20.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.027>.
- Vizi, E.S., and Lendvai, B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 30, 219–235. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(99\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(99)00016-8).
- de Waal, F.B.M., and Preston, S.D. (2017). Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 498–509. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.72>.
- Wacker, D.W., and Ludwig, M. (2012). Vasopressin, oxytocin, and social odor recognition. *Horm. Behav.* 61, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.08.014>.

- Wallace, T.L., and Bertrand, D. (2013). Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochem. Pharmacol.* *85*, 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.04.001>.
- Wang, F., Zhu, J., Zhu, H., Zhang, Q., Lin, Z., and Hu, H. (2011). Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science* *334*, 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.1209951>.
- Wang, F., Kessels, H.W., and Hu, H. (2014). The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. *Trends Neurosci.* *37*, 674–682. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.07.005>.
- Wang, H., Liang, S., Burgdorf, J., Wess, J., and Yeomans, J. (2008). Ultrasonic vocalizations induced by sex and amphetamine in M2, M4, M5 muscarinic and D2 dopamine receptor knockout mice. *PLoS One* *3*, e1893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001893>.
- Wang, S., Shi, Y., and Li, B.-M. (2017). Neural representation of cost-benefit selections in rat anterior cingulate cortex in self-paced decision making. *Neurobiol. Learn. Mem.* *139*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.003>.
- Watanabe, N., and Yamamoto, M. (2015). Neural mechanisms of social dominance. *Front. Neurosci.* *9*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00154>.
- White, N.R., Prasad, M., Barfield, R.J., and Nyby, J.G. (1998). 40- and 70-kHz vocalizations of mice (*Mus musculus*) during copulation. *Physiol. Behav.* *63*, 467–473. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00484-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00484-8).
- Williams, A.V., Duque-Wilckens, N., Ramos-Maciél, S., Campi, K.L., Bhela, S.K., Xu, C.K., Jackson, K., Chini, B., Pesavento, P.A., and Trainor, B.C. (2020). Social approach and social vigilance are differentially regulated by oxytocin receptors in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* *45*, 1423–1430. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0657-4>.
- Willuhn, I., Tose, A., Wanat, M.J., Hart, A.S., Hollon, N.G., Phillips, P.E.M., Schwarting, R.K.W., and Wöhr, M. (2014). Phasic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens in Response to Pro-Social 50 kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. *J. Neurosci.* *34*, 10616–10623. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1060-14.2014>.
- Wilson, M.A., and Fadel, J.R. (2017). Cholinergic regulation of fear learning and extinction. *J. Neurosci. Res.* *95*, 836–852. <https://doi.org/10.1002/jnr.23840>.
- Winters, B.D., Borowski, J., Słojan, R.M., Jędrzejewska-Szmek, J., Kondrakiewicz, L., Mankiewicz, L., Chaturvedi, M., Turzyński, D., Puścian, A., et al. (2021). Social learning about rewards – how information from others helps to adapt to changing environment. *BioRxiv* 2021.03.09.434563. <https://doi.org/10.1101/2021.03.09.434563>.
- Winstanley, C.A., Theobald, D.E.H., Cardinal, R.N., and Robbins, T.W. (2004). Contrasting Roles of Basolateral Amygdala and Orbitofrontal Cortex in Impulsive Choice. *J. Neurosci.* *24*, 4718–4722. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5606-03.2004>.
- Wöhr, M., Moles, A., Schwarting, R.K.W., and D’Amato, F.R. (2011). Lack of social exploratory activation in male μ -opioid receptor KO mice in response to playback of female ultrasonic vocalizations. *Soc. Neurosci.* *6*, 76–87. <https://doi.org/10.1080/17470911003765560>.

- Wojcik, S.M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., and Rhee, J.-S. (2006). A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 50, 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.04.016>.
- Wu, M., Brudzynski, S.M., and Mogenson, G.J. (1993). Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in the regulation of locomotion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 407–413. <https://doi.org/10.1139/y93-061>.
- Wu, T., Zang, Y., Wang, L., Long, X., Li, K., and Chan, P. (2007). Normal aging decreases regional homogeneity of the motor areas in the resting state. *Neurosci. Lett.* 423, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.06.057>.
- Yamagishi, A., Lee, J., and Sato, N. (2020). Oxytocin in the anterior cingulate cortex is involved in helping behaviour. *Behav. Brain Res.* 393, 112790. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112790>.
- Yamamuro, K., Yoshino, H., Ogawa, Y., Makinodan, M., Toritsuka, M., Yamashita, M., Corfas, G., and Kishimoto, T. (2018). Social Isolation During the Critical Period Reduces Synaptic and Intrinsic Excitability of a Subtype of Pyramidal Cell in Mouse Prefrontal Cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 28, 998–1010. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx010>.
- Yang, M., and Crawley, J.N. (2009). Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley AI *CHAPTER*, Unit-8.24. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>.
- Yang, M., Loureiro, D., Kalikhman, D., and Crawley, J.N. (2013). Male mice emit distinct ultrasonic vocalizations when the female leaves the social interaction arena. *Front. Behav. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00159>.
- Yilmaz, M., and Meister, M. (2013). Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. *Curr. Biol. CB* 23, 2011–2015. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.08.015>.
- Yizhar, O., and Levy, D.R. (2021). The social dilemma: prefrontal control of mammalian sociability. *Curr. Opin. Neurobiol.* 68, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.01.007>.
- Yizhar, O., Fennell, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., Shikama, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171–178. <https://doi.org/10.1038/nature10360>.
- Yu, A.J., and Dayan, P. (2005). Uncertainty, neuromodulation, and attention. *Neuron* 46, 681–692. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.026>.
- Zant, J.C., Kim, T., Prokaj, L., Szarka, S., McNally, J., McKenna, J.T., Shukla, C., Yang, C., Kalinchuk, A.V., McCarley, R.W., et al. (2016). Cholinergic Neurons in the Basal Forebrain Promote Wakefulness by Actions on Neighboring Non-Cholinergic Neurons: An Opto-Dialysis Study. *J. Neurosci.* 36, 2057–2067. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3318-15.2016>.
- Zeeb, F.D., Baarendse, P.J.J., Vanderschuren, L.J.M.J., and Winstanley, C.A. (2015). Inactivation of the prelimbic or infralimbic cortex impairs decision-making in the rat gambling task. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 4481–4491. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4075-y>.
- Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S.P., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2008). Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carterii*. *Nat. Neurosci.* 11, 631–633. <https://doi.org/10.1038/nn.2120>.

Zhang, F., Gradinaru, V., Adamantidis, A.R., Durand, R., Airan, R.D., de Lecea, L., and Deisseroth, K. (2010). Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat. Protoc.* 5, 439–456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.226>.

Zhou, T., Sandi, C., and Hu, H. (2018). Advances in understanding neural mechanisms of social dominance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 49, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.006>.

Zizlsperger, L., Sauvigny, T., and Haarmeier, T. (2012). Selective attention increases choice certainty in human decision making. *PloS One* 7, e41136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041136>.

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. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1235>.

Titre : Rôle de l'acétylcholine préfrontale dans les comportements sociaux

Mots clés : Acétylcholine ; Optogénétique ; Interaction sociale ; ChAT-IRES-Cre; Cortex préfrontal; souris

Dans le monde animal, les rongeurs, comme tous les autres mammifères, interagissent en permanence avec leurs congénères. Interagir socialement consiste à choisir entre plusieurs options d'actions qui tiennent compte de son état interne propre et de la prédiction quant à aux réactions possibles de son (ou ses) congénères. Les interactions sociales constituent donc un modèle de prise de décision. Le cortex préfrontal est une structure cérébrale clef des prises de décision, qu'elles soient sociales ou non. Des études précédentes au laboratoire ont établi, chez la souris, que la modulation par l'acétylcholine des récepteurs nicotiques du cortex préfrontal sous-tend les processus de décision lors d'interactions sociales. Néanmoins, ces études ne permettent pas de connaître précisément le rôle de l'acétylcholine au sein du cortex préfrontal, car ils ont été obtenus chez des souris présentant également des altérations d'autres neurotransmetteurs. En outre, notre équipe comme d'autres, a montré que la communication vocale ultrasonore, régie par l'équilibre entre les systèmes cholinergique et dopaminergique, est un des éléments importants des interactions sociales chez la souris adulte, sans qu'on connaisse actuellement son rôle exact. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de comprendre l'effet de la modulation de la libération de l'acétylcholine dans le cortex préfrontal dans les comportements sociaux et d'investiguer quels paramètres de ces comportements sont plus particulièrement contrôlés par ce neurotransmetteur. Pour ce faire nous allons utiliser des souris ChAT-IRES-Cre exprimant la cre recombinase au sein des neurones cholinergiques, dont nous montrons ici qu'elles présentent un phénotype social et de communication vocale normal. Couplée à l'activation ou l'inhibition optogénétique de la libération d'acétylcholine spécifiquement dans les terminaisons préfrontales, l'utilisation de tests comportementaux variés a permis d'obtenir plusieurs résultats novateurs : La modulation de l'innervation cholinergique préfrontale ne modifie pas la motivation à interagir avec un congénère.

2 La libération d'acétylcholine provoque une diminution la dominance et des approches sociales, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des vocalisations ultrasonores alors que l'inhibition de la libération d'acétylcholine provoque une diminution de la dominance et une augmentation des approches sociales ainsi qu'une diminution de la fréquence des vocalisations ultrasonores. 3) La synchronisation des vocalisations ultrasonores avec les comportements sociaux ne permet pas d'associer leur émission à un comportement spécifique, renforçant l'idée que ces vocalisations transmettent une information générale relative à l'état émotionnel de l'animal émetteur. La modulation cholinergique provoque également des interruptions plus fréquentes du contact social par le congénère non stimulé, laissant penser que ce dernier perçoit l'action et la vocalisation de son congénère comme inappropriée. Ces résultats, associés aux données de la littérature actuelle, permettent d'émettre l'hypothèse que la modulation cholinergique du cortex préfrontal est au cœur de l'intégration de plusieurs paramètres sociaux perçus chez les congénères, intégration qui aboutit à la construction de décisions sociales adaptées. L'acétylcholine préfrontale joue un rôle déterminant dans la libération locale d'autres neurotransmetteurs -dopamine, sérotonine, noradrénaline, GABA, glutamate...- par l'intermédiaire de récepteurs nicotiques distribués sur tous les compartiments cellulaires, et permet le maintien de la balance excitation/inhibition du cortex préfrontal, ce qui a rendu son étude délicate jusqu'ici. Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent, pour la première fois, le rôle déterminant et spécifique de l'acétylcholine préfrontale, indépendamment des autres neurotransmetteurs, dans la cognition sociale, une fonction largement altérée dans les pathologies mentales.

Title : Role of prefrontal acetylcholine in social behaviors

Keywords : Acetylcholine; Optogenetic ; Social interaction; ChAT-IRES-Cre; refrontal cortex

Abstract: In the animal world, rodents, like all other mammals, interact constantly with their congeners. Interacting socially consists in choosing between several options that take into account the individual's own internal state and the prediction of the possible reactions of its conspecifics. Therefore, social interactions can serve as a model for decision making. The prefrontal cortex is a key structure of decision making in social, as well as in non-social, context. Previous studies in the laboratory have shown that the cholinergic modulation of the nicotinic receptors in the prefrontal cortex -PFC- underlies decision-making processes in social interactions. Nevertheless, these studies don't allow us to determine the precise role of acetylcholine in the PFC because they were obtained in mice showing alterations in other neurotransmitter levels. Moreover, our team and others showed that vocal ultrasonic communication, modulated by the cholinergic/dopaminergic balance, is an important element of adult mice social interactions, without its exact role being known yet. In this context, the aim of my PhD is to understand the effect of the cholinergic modulation in the prefrontal cortex in social behaviors and to investigate which behavioral parameters are particularly controlled by this neuromodulator. To this aim, we used ChAT-IRES-Cre mice expressing the cre recombinase in cholinergic neurons which, as we show in this work, display healthy social and vocal communication phenotypes. Coupled with optogenetic activation or inhibition of acetylcholine release specifically from cholinergic terminals in the prefrontal cortex, the use of varied behavioral tests has allowed for several new results: 1) Modulation of prefrontal cholinergic innervation doesn't change the motivation for investigating congeners.

2) acetylcholine release decreases dominance and increases social approaches and emission of high frequency USV, whereas inhibition of acetylcholine release decreases dominance and increases social approaches but decreases USV frequency. 3) Synchronization of USV and social behaviors don't allow associating their emission to a specific behavior, strengthening the idea that these vocalizations transmit global information of the emotional state of the animal. 4) Cholinergic modulation within the PFC triggers a more frequent interruption of social contact by the no stimulate congener, a behavior that may reveal a reaction to the perception of an inappropriate social interaction and vocal communication from the stimulated mouse. These results, associated with the literature data, allows hypothesizing that the cholinergic modulation in the prefrontal cortex plays a fulcrum role in the integration of several social parameters perceived by the interacting congeners. Their integration leads to the construction of adapted social decisions. Ach in the prefrontal cortex plays a predominant role in the local liberation of other neurotransmitters such as dopamine, serotonin, noradrenaline , GABA, glutamate... by the nicotinic receptors distributed on all cellular compartments, and allows the maintenance of the excitatory/inhibitory balance in the prefrontal cortex, which has made its study delicate until now. The result obtained during my PhD shows, for the first time, the determinant and specific role of prefrontal acetylcholine in social cognition, independently of other neurotransmitters, a function largely altered in brain pathologies.

