

Effets du moment de test et de paramètres méthodologiques sur le comportement et la cognition de la souris de laboratoire



Aurélie Zaros & André Ferrara
Université de Liège, Liège, Belgium
Unité de recherche en Psychologie et Neurosciences Cognitives (PsyNCog)
Modèles animaux de la cognition



CONTEXTE

La plupart des espèces terrestres se sont adaptées au cycle nyctéméral en développant des rythmes circadiens physiologiques et comportementaux. La lumière (ou *zeitgeber*) est l'indice environnemental le plus important qui influence de nombreux aspects tels que l'activité, la vigilance, la température corporelle, la régulation hormonale ou la potentialisation à long terme^{1,2}. Les souris font partie des principaux animaux employés dans les laboratoires de neurosciences comportementales et de recherche préclinique. Bien que nocturnes, ces dernières sont généralement testées pendant leur phase de repos, le jour, et sous des conditions lumineuses classiques. Bien que cette pratique soit plus commode pour l'expérimentateur, toute perturbation du cycle veille-sommeil (comme les manipulations diurnes liées à la maintenance ou à l'expérimentation), pourrait générer un certain stress pour l'animal et affecter son bien-être et aussi mener à la production de données peu fiables^{2,3}. Ainsi, le moment du test pourrait constituer une variable importante affectant le comportement animal et par là certaines conclusions que nous faisons sur les processus cognitifs. Il semblerait que les rongeurs soient moins anxieux durant la phase sombre, cependant, un manque de données relatif à l'effet du moment de test sur le comportement a récemment été mis en avant^{2,3}. En outre, plusieurs études évaluant les effets du moment de test sur diverses capacités cognitives ont montré des résultats contradictoires ; ces écarts peuvent s'expliquer par divers aspects méthodologiques tels que les paramètres liés à la procédure (comme les conditions d'éclairage au moment du test, l'espèce, voire la souche étudiée) mais également par la manière de recueillir et d'interpréter les données comportementales.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur un test d'anxiété (le labyrinthe en croix surélevé, EPM) et sur un test de mémoire (le test de reconnaissance d'objets, ORT). Nous avons comparé les performances de quatre groupes de sujets testés à 4 moments différents du cycle circadien veille-sommeil (deux dans la phase active et deux dans la phase de repos) pour déterminer s'il y avait un moment de test plus approprié pour l'expérimentation animale où les souris montreraient une anxiété réduite et de meilleures performances. Nous montrons que la manière d'analyser le comportement peut affecter la conclusion concernant l'influence du moment de test sur la performance et suggérons que les paramètres procéduraux et d'analyses soient davantage considérés et justifiés afin d'aboutir à de meilleures conclusions relatives au comportement de l'animal.

METHODE

Animaux et conditions d'hébergement : 72 souris femelles C57/BL6 ont été hébergées par paire selon un cycle lumière-obscurité standard (lumières allumées à 09h30 et éteintes à 21h30, N=36) ou sous un cycle lumière-obscurité inversé (lumières allumées à 21h30 et éteintes à 09h30, N=36). Les souris ont été testées au début ou au milieu de la phase claire/sombre (respectivement ZT01 et ZT05 en phase claire et ZT13 et ZT17 en phase sombre).

1. EPM

Dispositif et procédure : l'analyse des comportements liés à l'anxiété s'est déroulée dans un labyrinthe surélevé, sous une luminosité de 60 lux pendant 5 min.

Mesures comportementales⁴ : Pourcentage de temps passé dans les bras ouverts, pourcentage d'entrées dans les bras ouverts, nombre de head-dips et le nombre total d'entrées dans les bras fermés et ouverts.

2. ORT

Dispositif et procédure : le test s'est déroulé dans une arène circulaire en plastique opaque (Ø 45 cm). Le niveau de lumière était de 10 lux au centre de l'arène. Des objets usuels ont été utilisés (bouteilles en verre et blocs de construction colorés en plastique). Le test était divisé en 3 phases : (1) phase d'habituation à l'arène vide (1 heure), (2) phase de familiarisation avec deux objets identiques (séance de 3 minutes), (3) phase de test avec remplacement d'un objet familier par un objet neuf et différent (séance de 3 minutes) avec un intervalle de rétention de 1 heure.

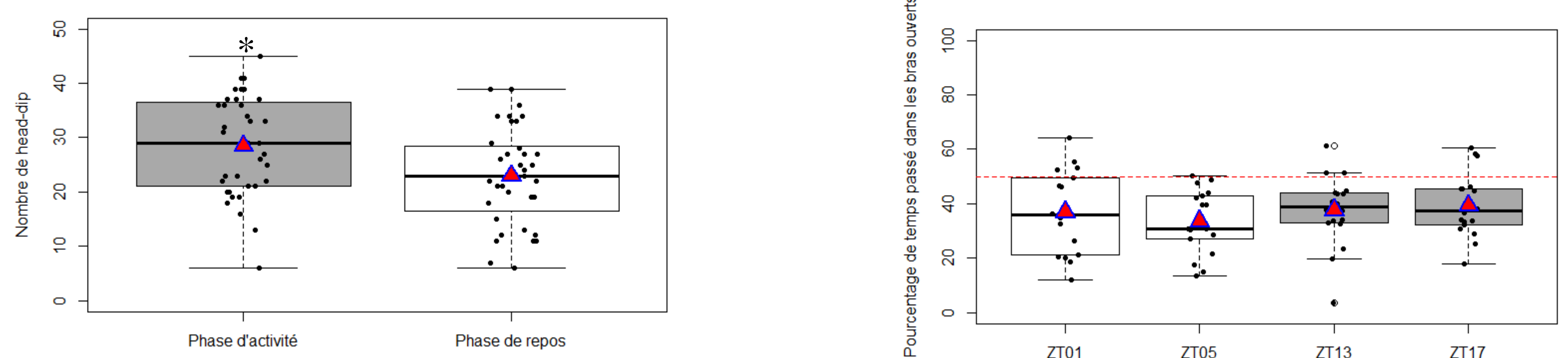
Mesures comportementales⁵ : nous avons utilisé un indice mnésique classique (d_2) basé sur le temps d'exploration de chaque objet reflétant, à travers l'exploration préférentielle du nouvel objet, qu'une trace en mémoire était conservée de l'objet familier. Cet indice a été calculé à partir du comportement exploratoire dans la première minute et dans les trois minutes du test. Scorage par deux observateurs (coefficient de corrélation intra-classe supérieur à 0,95 pour toutes les mesures).

Analyses statistiques: les conditions d'application des tests statistiques ont été vérifiées.

- ANOVA à 2 facteurs avec la phase (active ou repos) et le moment de test (début ou milieu) comme facteur inter-sujets sur toutes les mesures comportementales.
- T de Student pour un échantillon afin de comparer la performance sur d_2 de chaque groupe à une moyenne nulle.

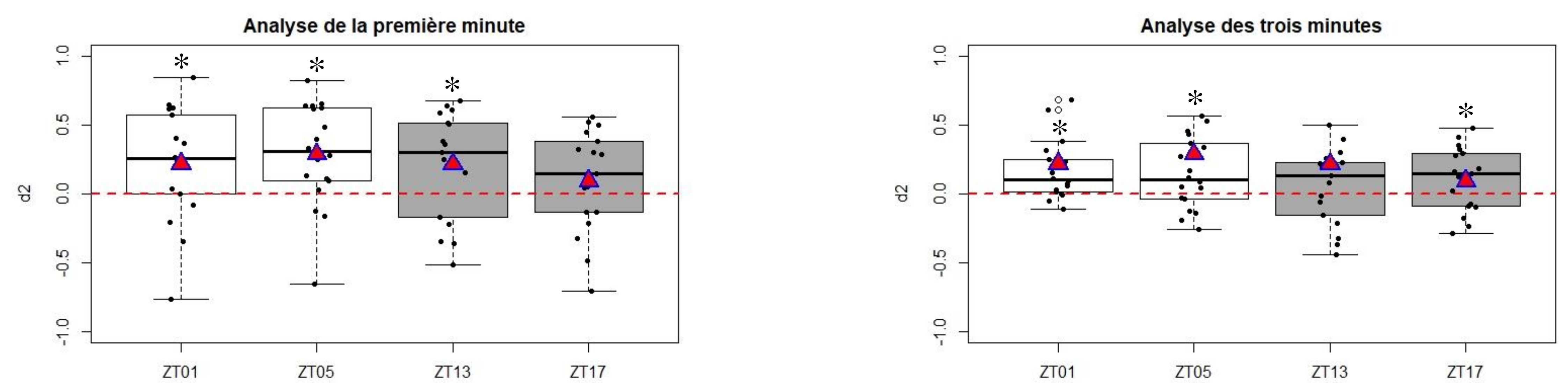
RESULTATS

1.EPM



Il n'y a pas d'effets principaux sur le nombre total d'entrées dans les bras (*phase* : $F(1,67)=0.02$, $p=0.86$; *moment de test* : $F(1,67)>0.01$, $p=0.98$), sur le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts (*phase* : $F(1,67)=0.61$, $p=0.43$; *moment de test* : $F(1,67)=1.24$, $p=0.26$), sur le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (*phase* : $F(1,67)=1.71$, $p=0.19$; *moment de test* : $F(1,67)=0.02$, $p=0.87$) mais il y a un effet de la phase sur le nombre de head-dips ($F(1,67)=6.12$, $p=0.01$, $\eta_p^2=0.08$) mais pas du moment de test ($F(1,67)=0.29$, $p=0.58$). Aucune interaction n'est significative.

2.ORT



Il n'y a pas d'effet principal de la phase ($F(1,66)=1.16$, $p=0.28$) ou du moment de test ($F(1,66)=0.07$, $p=0.78$). Aucune interaction n'est significative.

Le test t comparant la moyenne de chaque groupe au niveau de chance suggère que l'indice de discrimination pour les groupes ZT01, ZT05 et ZT13 est significativement supérieur à 0 (ZT01: $t(17)=2.27$; $p=0.01$; $d = 0,53$, ZT05: $t(17)=3.25$; $p<0.01$; $d = 0,76$, ZT13: $t(16)=2.23$; $p=0.02$; $d = 0,54$, ZT17: $t(16)=0.99$; $p=0.16$).

Il n'y a pas d'effet principal de la phase ($F(1,66)=1.16$, $p=0.20$) ou du moment de test ($F(1,66)=0.06$, $p=0.80$). Aucune interaction n'est significative.

Le test t comparant la moyenne de chaque groupe au niveau de chance suggère que l'indice de discrimination pour les groupes ZT01, ZT05 et ZT17 est significativement supérieur à 0 (ZT01: $t(17)=3.26$; $p<0.01$; $d = 0,82$, ZT05: $t(17)=2.38$; $p=0.01$; $d = 0,60$, ZT13: $t(16)=0.79$; $p=0.22$, ZT17: $t(16)=1.86$; $p=0.04$; $d = 0,49$).

CONCLUSIONS

Pour l'EPM, nous n'avons trouvé aucun effet du moment de test pour la plupart de nos mesures hormis pour le nombre de head-dips. Les animaux testés pendant leur phase active font plus de head-dips que les souris testées pendant leur phase de repos quel que soit le moment de test, ce qui pourrait traduire moins d'anxiété dans ces groupes⁶. Néanmoins, l'analyse de l'évolution des head-dips intra-séance montre que ce comportement est particulièrement présent durant la première minute du test et ensuite s'amenuise pour arriver à une équivalence entre les groupes. Ainsi, compte tenu de cette analyse et de celle des autres comportements anxieux, nous n'avons pas pu conclure à une véritable différence d'anxiété entre les groupes. Néanmoins, il se pourrait que le moment de test n'impacte seulement que certaines mesures⁷ et peu d'études emploient des mesures éthologiques du comportement, il est donc encore compliqué de comprendre leurs réelles significations. Concernant l'ORT, nous avons remarqué une certaine variabilité entre les études sur la durée de la session de test qui pourrait également expliquer des conclusions contradictoires retrouvées sur l'effet du moment de test. Il semble que la préférence pour le nouvel objet ne s'exprimerait que brièvement au début de la session de test⁸. Nous avons donc effectué notre analyse de l'ORT sur la première minute et sur les trois minutes de la session de test. En comparant ces deux analyses, ce ne sont pas les mêmes groupes d'animaux qui discriminent le nouvel objet du familier et l'indice de discrimination est plus élevé durant la première minute du test ; ainsi, définir différemment le temps d'observation conduit à des conclusions divergentes. La durée de la session de test est potentiellement un paramètre important et pourrait être davantage pris en compte et justifié lors de l'analyse du comportement dans un tel test.

Pour conclure, le bon sens nous pousse à tester les animaux durant leur période d'activité. Cependant, il n'y a pas de signes d'une anxiété réduite ou d'une performance augmentée dans ces groupes et ces résultats vont plutôt à l'encontre de nos attentes. Il demeure un certain nombre d'incertitudes quant à la manière d'analyser et d'interpréter les indices comportementaux et cela peut contribuer au manque de reproductibilité et aux résultats contradictoires actuellement observés quant à l'effet du moment de test sur la performance.

REFERENCES

- ¹Fisk, A. S., Tam, S. K. E., Brown, L. A., Vyazovskiy, V. V., Bannerman, D. M., & Peirson, S. N. (2018). doi : 10.3389/fneur.2018.00056
- ²Peirson, S. N., Brown, L. A., Potheary, C. A., Benson, L. A., & Fisk, A. S. (2018). doi : 10.1016/j.jneumeth.2017.04.007
- ³Hawkins, P., & Gollidge, H. D. R. (2018). doi : 10.1016/j.jneumeth.2017.05.014
- ⁴Walf & Frye. (1007). doi : 10.1038/nprot.2007.44
- ⁵Lueptow, L. (2017). doi : 10.3791/55718
- ⁶Espejo, E. (1997). doi : 10.1016/S0166-4328(96)02245-0
- ⁷Bertoglio & Carobrez (2002). doi : 10.1016/s0166-4328(01)00396-5
- ⁸Dix S.L., Aggleton J.P. (1999). doi:10.1016/S0166-4328(98)00079-5