
L'effet du moment du test sur la cognition et le comportement de la souris de laboratoire évalués au moyen de procédures opérantes

Auteur : Terpini, Marianthi

Promoteur(s) : Ferrara, André

Faculté : Faculté de Psychologie, Logopédie et Sciences de l'Éducation

Diplôme : Master en sciences psychologiques, à finalité spécialisée en neuroscience cognitive et comportement

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/19283>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

L'effet du moment du test sur la cognition et le comportement de la souris de laboratoire évalués au moyen de procédures opérantes

Mémoire présenté par Marianthi Terpini en vue de l'obtention du grade de master en sciences psychologiques à finalité spécialisée en neurosciences cognitive et comportementale

Année Académique 2022-2023

PROMOTEUR : André Ferrara

LECTEURS : Etienne Quertemont & Vincent Didone

Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon superviseur, Monsieur André Ferrara, pour son aide et sa disponibilité durant ce mémoire.

Je tiens également à remercier Aurélie Zaros, la chercheuse doctorale avec qui j'ai collaboré sur cette étude, pour son soutien et sa guidance. Travailler avec elle a rendu l'expérience en laboratoire encore plus agréable.

Je souhaiterais aussi remercier mes lecteurs pour le temps qu'ils consacreront à lire et à évaluer mon mémoire.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien pendant mes années universitaires. En particulier, je remercie ma partenaire, qui a été non seulement mon plus grand soutien, mais aussi ma principale source de motivation pour persévérer et atteindre mes objectifs académiques, et bien plus que ça.

Table des matières

RÉSUMÉ	1
INTRODUCTION	2
La neurobiologie des rythmes circadiens : structures cérébrales et modulateurs hormonaux..	2
Tester les rongeurs pendant leur phase de repos : une pratique discutable ?	3
Controverses et limites de la recherche actuelle.....	5
Les implications du moment de testing sur la cognition et le comportement des rongeurs : l'intérêt des tâches opérantes.....	11
Restriction calorique dans les tâches opérantes : nécessité, préoccupations éthiques et impact sur le comportement des rongeurs.....	13
Le choix des tâches appropriées.	17
Les objectifs de l'étude actuelle : Hypothèses.....	19
MÉTHODES.....	23
Expérience 1	23
1. Animaux.....	23
2. Groupes expérimentaux	23
3. Matériaux.....	24
4. Procédure.....	24
5. Design expérimental.....	27
6. Mesures comportementales	27
7. Analyse des données.....	28
Expérience 2	28
1. Animaux.....	28
2. Groupes expérimentaux	29
3. Matériaux.....	29
4. Procédure.....	29
5. Mesures comportementales	31
6. Analyse des données.....	31
RESULTATS	31
Expérience 1	31
Expérience 2	50
DISCUSSION.....	53
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	61
ANNEXES.....	68

RÉSUMÉ

Dans les études animales, les expérimentations sur les souris sont généralement menées en journée sous lumière artificielle, bien que la plupart de ces rongeurs soient nocturnes. En raison de l'impact de la rythmicité circadienne sur la physiologie, la cognition et le comportement, des préoccupations éthiques et pratiques sont soulevées par ce choix. Bien que des études aient montré l'impact de la phase de test sur le comportement des rongeurs, peu de recherches ont été menées avec des tâches opérantes.

Aussi, d'autres conditions expérimentales qui peuvent affecter les performances des souris sont l'exposition à la lumière et la restriction calorique. La lumière joue un rôle clé dans la régulation de notre horloge circadienne, mais son impact est souvent négligé dans les études animales. De plus, tester les rongeurs dans des tâches opérantes exige une restriction calorique sur une période prolongée, cette restriction étant supposée avoir des conséquences néfastes sur la santé des animaux. Il est donc important de vérifier si les rongeurs peuvent bien réussir dans les tâches opérantes sans cette restriction calorique.

Ce mémoire vise donc à examiner les effets du moment du test sur la cognition et le comportement de la souris C57BL/6 évalués au moyen de procédures opérantes. Dans la première expérience, les effets de la phase de testing sur la cognition ont été explorés en utilisant deux tâches opérantes : le Serial Order Learning (SOL) et le Reversal Learning (RV). Pour évaluer l'effet de la lumière, le même groupe de souris a été testé dans deux conditions lumineuses (allumée et éteinte). Enfin, l'effet de la restriction calorique a été exploré de deux manières : en testant un groupe de souris alimentées ad libitum ; en réintroduisant un accès libre à la nourriture après que le comportement opérant ait été bien acquis. Dans la deuxième expérience, nous avons évalué si le moment du test affecte la motivation pour une récompense alimentaire en soumettant deux groupes de jeunes souris mâles C57BL/6 à une tâche de Progressive Ratio (PR).

Les résultats ont montré que la performance dans les tests opérants semble moins affectée par le moment du test que dans les tests rapides. L'apprentissage automatisé, la flexibilité cognitive et la motivation pour une récompense alimentaire n'ont pas été impactés par la phase de test. De plus, l'exposition à la lumière ne semble pas avoir influencé le comportement des animaux dans notre étude. Enfin, nous avons découvert que bien que la restriction calorique soit nécessaire pour la réalisation des tâches opérantes, un accès libre à la nourriture peut être rétabli une fois que le comportement est maîtrisé.

INTRODUCTION

La neurobiologie des rythmes circadiens : structures cérébrales et modulateurs hormonaux

Quotidiennement, nous sommes exposés à l'alternance entre le jour et la nuit, caractérisée notamment par une exposition à la lumière le jour et à l'obscurité la nuit. Afin de s'adapter à ces changements environnementaux, les humains et d'autres espèces ont développé des rythmes circadiens qui sont des périodes d'environ 24 h qui nous aident à maintenir un fonctionnement normal (Walker et al., 2020 ; Fisk et al., 2018). L'exposition à la lumière ou à l'obscurité est considérée comme le *Zeitgeber* le plus important (un mot allemand qui se traduit par « donneur de temps »), donc l'un des principaux repères temporels permettant de synchroniser nos rythmes jour-nuit (Pinel, 2007 ; Tosini et al., 2007 ; Vitaterna et al., 2001). En plus des cycles lumière/obscurité, d'autres *Zeitgebers* (indices temporels) incluent : la température, l'humidité, la disponibilité alimentaire et les cycles sociaux (Sharma & Chandrashekar, 2005). Les humains sont actifs pendant la journée et dorment la nuit pendant environ 6 à 9 h, alors que les espèces nocturnes comme les souris ont tendance à dormir plusieurs fois par jour en courtes périodes. Celles-ci sont appelées *bouts*, et elles se produisent majoritairement pendant la journée (Hawkins & Golledge, 2018). Cette rythmicité est conservée même dans des conditions de luminosité constante (exposition constante à la lumière/à l'obscurité) laissant croire que nous possédons une horloge biologique qui, outre les signaux environnementaux, participe à l'organisation des rythmes circadiens (Acosta et al., 2020 ; Pinel, 2007).

Dans le but de comprendre les processus génétiques impliqués dans les cycles circadiens chez les mammifères, les chercheurs ont utilisé, dès le début des années 1990, une démarche de dépistage par mutagenèse, et le premier gène circadien muté de la souris a été découvert : le gène *Clock* (Vitaterna et al., 2001). De plus, des recherches continues ont permis d'identifier plusieurs autres gènes impliqués dans l'horloge circadienne (pour une liste de ces gènes et leur rôle, voir : Vitaterna et al., 2001). La découverte de ces gènes a ouvert la voie à une compréhension plus approfondie de la neurobiologie des rythmes circadiens, notamment du rôle de l'interaction *gènes-rétine-cerveau* dans la régulation de la rythmicité circadienne. Voici une brève explication de cette interaction :

La rétine des mammifères contient trois types différents de photorécepteurs : les cônes, les bâtonnets et les cellules ganglionnaires rétiniennes intrinsèquement photosensibles (ipRGCs) qui expriment la mélanopsine (Peirson et al., 2018). Les deux premiers permettent la formation

des images (vision scotopique/pour les faibles luminosités et vision photopique/pour les fortes luminosités, respectivement), tandis que les derniers sont responsables de la vision qui ne forme pas des images (Paul et al., 2009 ; Peirson et al., 2018). Il a été constaté que ces cellules photoréceptrices ipRGCs contiennent les transcriptions de presque tous les gènes de l'horloge circadienne, à l'exception des gènes *Npas2* et *Per2*, ce qui suggère que les composants moléculaires de l'horloge sont présents dans ces cellules rétiniennes (Tosini et al., 2007). En outre, il a été découvert que les ipRGCs sont directement liés au noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus, le principal oscillateur circadien, et qu'elles influencent ainsi la synthèse de la mélatonine (Tosini et al., 2007 ; Paul et al., 2009 ; Acosta et al., 2020). La mélatonine, une hormone sécrétée principalement la nuit chez tous les mammifères, a des fonctions distinctes selon les espèces, signalant le sommeil et le repos chez les animaux diurnes, tandis qu'elle est associée à une activité accrue chez les espèces nocturnes (Bilu & Kronfeld-Schor, 2013). Cette hormone joue un rôle clé dans le contrôle des différentes fonctions de la rétine et l'ajustement aux changements de la lumière (Paul et al., 2009 ; Peirson et al., 2018). Enfin, on pense que le système circadien est organisé de manière hiérarchique, le NSC coordonnant les horloges périphériques et influençant également indirectement l'activité et l'alimentation (Paul et al., 2009). Dans l'ensemble, ces différentes structures et les réponses neuronales et humorales déclenchées par leur interaction permettent un fonctionnement optimal du corps (Paul et al., 2009 ; Karatsoreos, 2012).

Les oscillateurs circadiens provoquent des changements quotidiens dans les systèmes physiologiques, tels que la régulation quotidienne des gènes responsables de l'homéostasie métabolique, du développement et de la signalisation cellulaires, et de la fonction immunitaire (Gritton et al., 2012). On pense également que les rythmes nyctéméraux affectent les systèmes comportementaux, la dérégulation de ces rythmes entraînant donc diverses pathologies affectant la fonction cognitive (Gritton et al., 2012). Ainsi, l'horloge circadienne interne peut affecter la santé physique et les mécanismes cognitifs et comportementaux du cerveau. Cela soulève la préoccupation suivante : Dans les études comportementales et cognitives chez l'animal, tient-on compte de ce paramètre ?

Tester les rongeurs pendant leur phase de repos : une pratique discutable ?

Les procédures expérimentales chez les rongeurs sont le plus souvent effectuées pendant la journée et sous un éclairage artificiel, alors que la plupart de ces rongeurs sont nocturnes, ce qui signifie qu'ils sont testés pendant leur phase de repos (Hawkins & Golledge, 2018). Le choix de tester les rongeurs pendant la journée repose sur de raisons de commodité, mais en

faisant cela, il semble que les rongeurs font du « travail de nuit ». Compte tenu de l'implication de la rythmicité circadienne non seulement dans les fonctions physiologiques, mais aussi dans la cognition et le comportement, on peut penser que le choix de tester les rongeurs pendant leur phase de repos réduirait la qualité des données récoltées. Mais cette possibilité est souvent ignorée. Les effets de la phase de testing (phase de repos-phase d'activité) sont considérés comme des facteurs secondaires et il est supposé que des protocoles de test bien élaborés conduisent à des résultats similaires entre les laboratoires (Mungenast & Fox, 2021). Une supposition qui pourrait être fautive et contribuer au problème de la reproductibilité dans les études animales. De plus, d'un point de vue éthologique, étant donné que la recherche animale vise à éventuellement fournir des informations sur les processus biologiques et comportementaux humains, il serait plus approprié de tester ces animaux pendant leur phase dark/active (Peirson et al., 2018). Ainsi, les données recueillies correspondraient mieux aux conditions humaines (Peirson et al., 2018), rendant la recherche plus translationnelle. Cependant, Peirson et al. (2018) mentionnent plusieurs limitations et facteurs à prendre en compte lors des tests sur les rongeurs pendant leur phase active, en particulier lorsque cela est réalisé en inversant les cycles veille/sommeil (la phase dark ayant lieu pendant la journée). Certains de ces facteurs incluent :

1. **Rythmes circadiens dans la fonction rétinienne** : Des variations circadiennes sont observées dans *l'amplitude de l'onde b*, qui est réduite pendant la phase active. Aussi, *la sensibilité au contraste* atteint son maximum pendant la phase lumineuse/phase de repos. Cela suggère que la réalisation de tests impliquant des indices visuels pendant la phase dark pourrait éventuellement entraîner une performance altérée.
2. **Défis pratiques** :
 - Difficulté de surveillance du bien-être en raison de l'utilisation d'un éclairage très faible ou d'outils de vision nocturne. Cette difficulté peut entraîner une négligence des problèmes de santé ou de sécurité et un temps accru pour effectuer les soins routiniers.
 - En inversant le cycle, la phase active des rongeurs aura lieu pendant les heures les plus chargées de l'établissement, ce qui pourrait potentiellement être un facteur de stress.
 - Lors de l'utilisation d'une lumière de longue longueur d'onde, comme la lumière rouge, l'intensité de l'éclairage doit être prise en compte. Une exposition prolongée peut avoir des conséquences imprévues sur le bien-être animal.

Enfin, les études humaines ont mis en évidence que les perturbations ou les altérations des cycles lumière-obscureté peuvent entraîner des troubles tels que l'anxiété, les troubles

maniaques et la dépression (Mungenast & Fox, 2021 ; McClung, 2013 ; Walker et al., 2020). En revanche, pour les études menées sur les animaux, la situation reste moins claire. Nous verrons pourquoi dans la section suivante. Il est important de souligner que ce mémoire ne vise pas à étudier directement les effets des rythmes circadiens, mais plutôt l'effet du moment de testing (phase de repos-phase active) sur le comportement et la cognition des souris et à répondre à la question suivante : Faut-il tester les rongeurs pendant leur phase de repos ? À partir de ce point, nous nous référerons aux animaux testés pendant la phase active en tant que **DARK**, et à ceux testés pendant leur phase de repos en tant que **LIGHT**, afin de faciliter la lisibilité de ce travail. Les deux phases seront désignées comme *phase light/phase de repos/phase inactive/phase lumineuse* et *phase dark/phase active/phase sombre*.

Controverses et limites de la recherche actuelle

Comme mentionné précédemment, l'impact du moment du test sur le comportement et la cognition des rongeurs reste encore peu défini. En fait, les recherches actuelles ont produit des résultats variés et parfois contradictoires, mettant en évidence la complexité de la relation entre ces facteurs. Toutefois, est-ce la complexité de cette relation qui amène à ces divergences, ou existe-t-il d'autres explications ? Dans un premier temps, examinons quelques-unes de ces études.

Dans une étude menée par Roedel et al. (2005), les effets du moment de testing sur plusieurs dimensions comportementales (activité locomotrice, anxiété, exploration directe et générale, inhibition alimentaire, éveil) et cognitives (choix erronés, choix répétés, erreurs d'omission) ont été explorés en utilisant le test du Hole Board modifié. Les chercheurs ont conclu que les souris DBA montraient moins d'inhibition comportementale lorsqu'elles étaient testées pendant la phase active. De plus, être testé pendant la phase de repos a entraîné une perturbation cognitive globale, avec plus de temps nécessaire pour accomplir la tâche et également plus d'erreurs commises pour les souris LIGHT par rapport aux souris DARK. En outre, une étude longitudinale qui visait à examiner les variations quotidiennes du comportement des rongeurs en utilisant le Elevated Plus Maze (EPM) renforce davantage l'idée que les animaux DARK présentent des performances améliorées comparées aux animaux LIGHT (Andrade et al., 2003). Plus précisément, dans cette étude menée par Andrade et al. (2003), 72 rats mâles Wistar ont été utilisés. La moitié de ces rats a suivi un cycle veille-sommeil standard (allumage des lumières à 8h), tandis que l'autre moitié était maintenue dans un cycle veille-sommeil inversé (allumage des lumières à 20h). Les rats ont été soumis à des tests à six moments différents : aux 1er, 2e, 3e, 6e, 12e et 18e mois de leur vie. Chaque rongeur a effectué un total de 12

sessions d'EPM, avec un intervalle de 2 h entre chaque essai. Cela indique que lorsqu'on se réfère aux résultats de la phase light, cela englobe non seulement les rats maintenus dans un cycle veille-sommeil normal, mais également l'autre moitié des animaux. Étant donné que les rongeurs étaient testés à des intervalles de 2 h, chaque animal a participé à des sessions d'EPM pendant ses phases light et dark. Les résultats de cette étude ont montré que pour toutes les différentes mesures de l'EPM, les rats ont obtenu de meilleures performances pendant leur phase dark par rapport à leur phase light, cette différence de performance étant présente à tous les âges. Ces résultats suggèrent que le comportement de type anxieux dépend du moment de testing.

D'autre part, Verma et al. (2010), qui ont examiné les effets de la phase circadienne sur les comportements dépressifs et anxieux chez les rats Sprague-Dawley mâles et femelles, laissent à penser que tester les rongeurs pendant leur phase active aura un impact négatif sur leur comportement. Dans leur expérience, ces chercheurs ont testé les rats à l'aide de différentes tâches telles que le Open Field (OF), l'EPM et le test de nage forcée (Forced swim test, FST), et les effets de la phase circadienne et du sexe ont été analysés. Les données ont révélé que dans le OF, le groupe DARK était plus actif par rapport au groupe LIGHT, mais que cette tendance s'est inversée après un stress aigu. Le stress a également entraîné une diminution du temps passé au centre de l'arène pour le groupe DARK, mais pour le groupe LIGHT, ce temps a augmenté. En ce qui concerne le EPM, il a été démontré que les rongeurs femelles présentaient des comportements de type anxieux plus élevés lorsqu'elles étaient testées pendant la phase dark par rapport à la phase light, tandis qu'il n'y avait aucune différence pour les rongeurs mâles. Le même pattern a été observé dans le test de FST, les femelles DARK montrant une immobilité accrue par rapport à celles testées dans leur phase de repos, mais aucune différence significative entre les deux groupes de mâles n'a été vue. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent que les effets du moment du test sur le comportement des rongeurs dépendent de différents facteurs modulateurs tels que le sexe et le stress, et que pour les rats femelles et dans les modèles de stress (indépendamment du sexe) il est plus bénéfique de tester les rongeurs pendant leur phase inactive.

Malgré les résultats mentionnés précédemment, il existe des études qui ne montrent aucun impact du moment de testing sur diverses mesures comportementales. Beeler et al. (2006) n'ont trouvé aucun effet sur l'activité dans le OF, l'émotivité dans le EPM, la mémoire spatiale dans le labyrinthe aquatique de Morris (Morris Water Maze), l'exploration d'objets nouveaux et l'hyperactivité en réponse à l'amphétamine. D'autres études n'ont également montré aucune

différence notable en termes de coordination motrice, d'anxiété, d'apprentissage ou de mémoire spatiale (Tsao et al., 2022). Cependant, Tsao et al. (2022) indiquent que les souris ont montré une sensibilité cutanée légèrement plus élevée, une mémoire contextuelle à long terme améliorée et une réponse d'évitement active plus importante pendant la phase dark. En ligne avec ces études, Jones et King (2001) n'ont pas trouvé d'effet discernable sur le comportement anxieux, suggérant que la relation entre le moment des testing et l'anxiété peut être non conclusive.

Dans certaines recherches, même les résultats au sein de la même étude sont peu clairs. Par exemple, dans une étude menée par Huynh et al. (2011) examinant l'impact du stress chronique sur l'anxiété et le comportement dépressif chez les rongeurs mâles et femelles, il a été démontré que le stress chronique augmentait l'anxiété chez les deux sexes pendant la phase active, mais pas pendant la phase de repos. En revanche, les symptômes dépressifs étaient affectés différemment en fonction du sexe des rongeurs, avec les mâles montrant des symptômes dépressifs accrus pendant la phase light et les femelles présentant le pattern inverse. Cette étude montre que parfois le moment du test peut avoir un impact différent sur certains troubles de l'humeur et selon le sexe des animaux.

Dans l'ensemble, comme on peut le voir, les recherches actuelles présentent une image complexe et multifacette. Différentes études montrent des résultats variables, certaines mettant en évidence des impacts peu clairs, des effets négatifs, des effets non significatifs et même des effets positifs. Mais pourquoi ces divergences ? En analysant la littérature actuelle et en réfléchissant sur le sujet, je pense qu'il existe quatre problèmes interdépendants qui contribuent aux divergences dans les résultats entre les laboratoires : les problèmes de *reporting* du moment du test, les différences entre les laboratoires dans l'implémentation d'une même tâche, l'effet de l'exposition à la lumière indépendamment du moment de testing et l'utilisation principalement des tests rapides pour étudier cette thématique. Explorons chacun de ces points.

1. Problèmes de reporting du moment du test

Dans une revue rédigée par Nelson et al. (2021), il est signalé qu'il existe un manque de cohérence observé dans les cycles veille/sommeil choisis lors de l'expérimentation avec des rongeurs. La majorité des études rapportent la réalisation des tests pendant la journée, qui correspond à la période de repos des animaux, et seules quelques-unes effectuent les tests pendant la phase active des animaux. Ces chercheurs expliquent que, pour tester les rongeurs pendant leur phase active, certains laboratoires adoptent un cycle inverse lumière-obscurité

(testant les animaux pendant leur période active). D'autres en revanche maintiennent un cycle lumière-obscurité similaire à l'environnement externe mais effectuent les tests pendant la phase dark du cycle quotidien d'illumination. Puis certains laboratoires réalisent les tests soit tôt soit tard pendant la phase active.

Lorsque Nelson et al. (2021) ont examiné les 25 articles de recherche les plus cités sur l'apprentissage et la mémoire, ils ont constaté que la majorité des articles ne spécifiaient pas l'heure de la journée (17 articles), cinq articles décrivaient les tests comportementaux effectués pendant la phase de repos, et trois articles fournissaient des informations peu claires. De plus, les 25 articles de recherche les plus cités sur le comportement d'apport alimentaire chez les rongeurs comportaient les informations suivantes : Cinq articles ont testé les rongeurs pendant la phase lumineuse ; deux articles ont testé les rongeurs pendant la phase sombre ; quatre articles les ont testés pendant les deux phases ; deux articles ne mentionnaient pas le moment des tests ; douze articles fournissaient des informations peu claires.

Comme nous pouvons le constater, il s'agit d'un problème récurrent dans la majorité de la littérature publiée et cela témoigne d'un manque de rigueur dans la conduite appropriée des études animales, d'autant plus que même les directives ARRIVE (Kilkenny et al., 2010) mentionnent la nécessité de rapporter des informations sur les cycles veille-sommeil.

2. Différences inter-laboratoires dans l'implémentation d'une même tâche

Pour comprendre cette problématique et étant donné qu'il s'agit du test le plus mentionné dans les études précédemment citées, on va prendre l'exemple du EPM.

L'**Elevated Plus Maze** (EPM) est un test comportemental d'une durée de cinq minutes utilisé pour l'évaluation du comportement de type anxieux chez les rongeurs (Walf & Frye, 2007 ; Schneider et al., 2011 ; Leo & Pamplona, 2014), et il a été validé comme un bon outil bi-directionnellement sensible aux manipulations de l'anxiété (Espejo, 1997). Ce test est utilisé pour comprendre les racines biologiques de l'émotivité dans différents domaines tels que la mémoire et l'apprentissage, la toxicomanie, le sevrage et différents types de troubles anxieux (Carobrez & Bertoglio, 2005). Dans leur revue, Carobrez et Bertoglio (2005) expliquent qu'il existe deux types de variables qui peuvent influencer les résultats observés dans l'EPM. Ces deux variables sont de *nature biologique* (l'espèce utilisée, la souche utilisée, l'âge, le sexe et le cycle œstral) et de *nature procédurale* (les conditions d'hébergement, le handling, l'appareillage, l'éclairage, les mesures notées et leur définition, la méthode de cotation, etc.).

En plus, ils précisent que dans l'EPM il existe deux types de mesures : les mesures conventionnelles et les mesures éthologiques.

Les « mesures conventionnelles » comprenant le temps passé sur chaque bras et le nombre d'entrées dans chaque bras sont les plus cohérentes entre les laboratoires (Augustsson & Meyerson, 2004 ; Carola et al., 2002). Les paramètres éthologiques sont mesurés pour donner une meilleure compréhension du comportement anxieux des rongeurs (Carola et al., 2002). Ces mesures comprennent : les head-dips, les postures d'étirement (stretch-attend posture : SAP), l'élevage (rearing), le freezing, le reniflement, le toilettage et le nombre de fecal boli. Ces mesures sont en effet très utiles dans l'interprétation des résultats, mais elles peuvent également être l'une des raisons pour lesquelles il existe des différences dans les résultats rapportés par différents laboratoires. Ce dernier se produit en raison de divergences dans la définition opérationnelle de chacun de ces paramètres dans différents protocoles. Si on prend l'exemple du head-dip, habituellement, il est décrit comme un mouvement vers le bas avec la tête vers le sol dans les bras ouverts du labyrinthe (Walf & Frye, 2007 ; Schneider et al., 2011 ; Leo & Pamplona, 2014). Mais il existe des études qui divisent ce paramètre en deux sous-catégories : protégé et non protégé (Augustsson & Meyerson, 2004 ; Carola et al., 2002). Le head-dip non protégé correspond à la définition donnée juste avant, cependant les head-dips protégés se produisent lorsque les rongeurs regardent par-dessus le bord de l'un des bras ouverts alors qu'au moins deux pattes sont dans les bras fermés ou dans la zone centrale (Carola et al., 2002). En outre, Carola et al. (2002) interprètent les head-dips non protégés comme des indicateurs d'exploration non anxiogène, tandis que les head-dips protégés sont associés à une exploration anxiogène.

3. L'effet de l'exposition à la lumière

Lors de l'explication des mécanismes neurobiologiques des rythmes circadiens, nous avons évoqué que la lumière est le principal Zeitgeber régulant notre horloge circadienne (Tosini et al., 2007 ; Vitaterna et al., 2001). Chez les animaux nocturnes, la perception de la lumière favorise le sommeil et inhibe l'activité, tandis que l'obscurité augmente l'éveil (Fisk et al., 2018). Cependant cette variable semble souvent être négligée dans les études animales.

Premièrement, de nombreuses études manquent d'informations sur les niveaux de lumière dans les laboratoires (Peirson et al., 2018). En plus, bien qu'il existe un grand nombre d'études humaines publiées qui tendent à montrer que l'exposition à la lumière peut influencer différents processus cognitifs, les études animales sont moins avancées, avec beaucoup moins de

recherches menées sur le sujet (Fisk et al., 2018). Même dans les études déjà publiées, les effets observés ne semblent pas être cohérents (Fisk et al., 2018). Peirson et al. (2018) soulèvent la question des réglementations actuelles sur les niveaux de lumière dans les établissements de recherche. Concrètement, ils ont constaté que le niveau de lumière est décidé dans la perspective de faciliter le travail des chercheurs plutôt que d'être adapté aux besoins physiologiques des animaux. Ils expliquent que les études rapportent principalement les niveaux de lumière en lux car les luxmètres sont généralement moins chers et plus disponibles que les spectromètres ou les wattmètres, bien que ces derniers soient mieux adaptés à la sensibilité spectrale des rongeurs. Enfin, étant donné que dans ce travail nous explorons l'effet du moment de testing, il est crucial de prendre en compte la lumière lors de la préparation du protocole. Hawkins & Golledge (2018) suggèrent que la phase dark ne devrait pas être contaminée par une lumière inattendue afin d'éviter d'induire de l'inactivité chez les rongeurs.

4. L'utilisation de tests à court terme/rapides

À partir des études que nous avons mentionnées explorant les effets de la phase light/dark sur le comportement, l'émotion et la cognition des animaux, nous pouvons constater que la majorité des tests utilisés sont des tests rapides. L'EPM est généralement un test de cinq minutes (Leo & Pamplona, 2014), le OF est un test rapide et relativement facile de 10 min (Seibenhener & Wooten, 2015), dans le FST, les animaux sont exposés au réservoir pendant 15 min le premier jour, puis pendant cinq minutes le deuxième jour (Verma et al., 2010), dans le Morris Water Maze, il y a généralement six jours d'essais, chacun durant 60 s (Bromley-Brits et al., 2011), et ainsi de suite. D'après ce que j'ai remarqué dans mes recherches sur le moment de testing et la cognition des rongeurs, il y avait un manque d'études utilisant des tâches opérantes, ce qui permettrait une étude à plus long terme des effets possibles. Jusqu'à présent, nous avons observé des effets sur la mémoire spatiale (Beeler et al., 2006 ; Tsao et al., 2022) et sur les capacités cognitives globales (Roedel et al., 2005), mais encore une fois, ces études ont utilisé des tests rapides. L'étude de Gritton et al. (2012) et l'étude de Mungenast et Fox (2021) sont deux des rares études que j'ai réussi à trouver utilisant des tests opérants sur le sujet. Également, Acosta et al. (2020) déclarent que leur travail est le premier à explorer le lien entre la motivation et le système circadien en utilisant la tâche de Progressive Ratio (les trois études seront détaillées dans la section ci-dessous). Ces informations nous ont amenés à conclure que l'utilisation de tâches opérantes pour comprendre l'implication du moment du test sur la cognition des rongeurs est essentielle afin d'avoir une compréhension globale plus claire de la question.

Les implications du moment de testing sur la cognition et le comportement des rongeurs : l'intérêt des tâches opérantes

Commençons par détailler les trois études précédemment citées qui utilisent des tâches opérantes pour étudier les effets du moment du test sur la cognition des rongeurs.

Gritton et al. (2012) ont testé 18 rats mâles Sprague-Dawley en utilisant une tâche d'attention soutenue (Sustained Attention Task, SAT). Les rats ont d'abord été entraînés à appuyer sur un levier pour obtenir une récompense, puis ils ont appris à faire la distinction entre les essais signal et les essais non-signal (bruits), et enfin la SAT a été réalisée. Les chercheurs ont observé que les tests effectués pendant la phase active des rongeurs ont conduit à une acquisition plus rapide du critère de réussite (2 fois plus rapide) par rapport aux tests réalisés pendant leur phase de repos. Gritton et al. (2012) ont également décidé d'inverser le moment de test, les animaux testés pendant leur phase active ont été testés pendant leur phase de repos et vice versa. Ils ont montré que les animaux testés initialement pendant la phase dark (phase active) ont diminué leurs performances lorsqu'ils ont été testés pendant la phase light (et l'inverse s'est produit pour l'autre groupe). Ainsi, nous pouvons constater que tester les rongeurs pendant leur phase active améliore les performances. Toutefois, une découverte intéressante dans cette étude révèle que la relation entre la phase de testing et la performance des rats est plus complexe. En effet, les rongeurs testés initialement pendant leur phase inactive et puis pendant leur phase dark n'ont jamais atteint les mêmes niveaux de performance que l'autre groupe, ce dernier ne montrant jamais de performances aussi faibles que le premier. Ces résultats semblent indiquer que l'impact le plus important des rythmes circadiens sur la cognition des rats s'est produit pendant la phase d'acquisition, cette dernière ayant un impact à long terme sur leurs performances.

Mugenast & Fox (2021) ont utilisé une tâche de dévaluation différée (Delay Discounting, DD) pour explorer les effets du moment de testing sur l'impulsivité chez 16 rats mâles Wistar. Ils ont également étudié les effets sur l'OF, l'EPM et la coordination motrice globale (Rotarod), mais ici, nous analysons uniquement la tâche opérante. Dans cette étude, les rats ont été répartis en deux groupes égaux : le premier groupe a subi 20 jours de tests pendant leur phase dark, puis 20 jours supplémentaires pendant leur phase de repos, tandis que le deuxième groupe a été testé initialement pendant leur phase light, puis pendant leur phase dark. Avant la tâche, 7 jours de Shaping ont eu lieu. Pendant la tâche DD, les animaux devaient choisir entre deux types d'appuis sur le levier : appuyer sur le levier gauche pour obtenir une récompense plus importante (3 pellets), mais en attendant un certain laps de temps (0s-15s-30s), appelé condition

LL (larger-later reward) ; appuyer sur le levier droit pour obtenir immédiatement une récompense, appelée condition SS (smaller-sooner reward). La tâche comportait 3 blocs par session (un bloc pour chacun des trois délais de la condition LL), où chaque bloc comprenait 6 essais en choix forcé (3 pour chaque condition, LL ou SS) et 14 essais en choix libre (les deux conditions étaient présentées simultanément). Les analyses statistiques ont montré que les rats des deux groupes choisissaient de moins en moins le LL à mesure que le délai de récompense augmentait, mais il n'y a pas eu d'effet significatif de la phase de test ni d'interaction entre la phase et le délai LL. Cela amène à penser que le moment de testing n'influence pas le comportement DD, mais quelques enjeux de la présente étude doivent quand même être mentionnés. Tout d'abord, lors des jours sept à neuf et 27 à 29, les rats ont initialement passé l'une des tâches non-DD, puis la tâche DD, ce qui signifie qu'il y a eu deux tâches par jour. Ce choix pourrait éventuellement causer de la fatigue voire du stress en raison de la nature des autres tâches (par exemple : l'EPM étant un test d'anxiété). Par ailleurs, les chercheurs expliquent avoir choisi de maintenir les lumières du box opérant allumées pour les deux phases (light et dark) et ils reconnaissent que peut-être sans lumières, les résultats auraient pu être différents, notamment pendant la phase active.

Dans leur étude, Acosta et al. (2020) ont testé des souris C57BL/6 (jeunes et âgées) en utilisant la tâche de Progressive Ratio (Progressive Ratio, PR) afin d'explorer la modulation circadienne de la motivation, plus spécifiquement de la motivation liée à la recherche de nourriture. Ils ont initialement entraîné les rongeurs à apprendre l'association levier-récompense (pendant 3 sessions), puis une session PR a eu lieu où les souris devaient travailler pendant 2 h ou ne pas travailler pendant 10 min pour terminer la tâche. Les chercheurs ont mesuré le nombre d'appuis sur le levier, le nombre de récompenses obtenues, le breakpoint (le nombre d'appuis sur le levier nécessaires pour obtenir une récompense qui n'a pas été atteint) et le pourcentage de survie (le pourcentage de rongeurs ayant travaillé pendant 2 h). Les résultats suivants ont été obtenus :

- Ils ont constaté que les rongeurs testés pendant leur phase active (groupe LD nuit) présentaient de meilleures performances pour les quatre variables dépendantes par rapport au groupe testé pendant leur phase de repos (groupe LD jour), indépendamment de l'âge. Les deux groupes ont été maintenus selon un cycle de sommeil normal.
- Ils ont testé un groupe de rongeurs maintenus dans l'obscurité constante (groupe DD) pendant 7 jours, qui a de nouveau montré de meilleures performances globales, ce qui indique qu'il y a un caractère endogène des variations quotidiennes de la motivation.

- Lorsqu'ils ont testé des groupes maintenus dans une lumière constante (groupe LL) pendant 25 jours consécutifs (dans le but d'induire une arythmie circadienne), les résultats ont montré que les souris jeunes avaient une motivation plus faible par rapport aux souris maintenues selon un cycle veille-sommeil normal et testées pendant leur phase active, mais des performances comparables au groupe LD testé pendant leur phase de repos.
- Ils ont également testé l'effet de la restriction calorique en testant deux groupes de souris nourries ad libitum (un groupe testé pendant leur phase active et l'autre testé pendant leur phase de repos). Ils ont décidé d'utiliser des pellets de chocolat au lieu de pellets normaux car les rongeurs ne montraient aucun intérêt pour ces derniers. Les résultats ont de nouveau indiqué une plus grande motivation pour les souris testées pendant la phase sombre par rapport à l'autre groupe.

Comme nous pouvons le constater, la première et la troisième étude semblent montrer un impact du moment des tests sur différents aspects cognitifs et comportementaux tels que l'attention soutenue et la motivation. De plus, d'après les expériences d'Acosta et al. (2020), le caractère de cet effet est endogène et présent même sans restriction calorique. En revanche, Mugenast & Fox (2021) n'ont trouvé aucun effet dans leur étude. Même avec seulement quelques études publiées sur le sujet, il y a encore des contradictions, ce qui souligne encore une fois l'importance de mener des études supplémentaires pour explorer les effets du moment de testing sur les processus cognitifs et comportementaux chez les rongeurs. Deux autres problèmes se posent avec ces nouvelles informations : l'utilisation de protocoles de restriction calorique lors des tests opérants et le choix des tâches appropriées pour notre étude.

Restriction calorique dans les tâches opérantes : nécessité, préoccupations éthiques et impact sur le comportement des rongeurs

Nous savons tous que tester des rongeurs dans des tâches opérantes nécessite une restriction calorique, qui peut durer de longues périodes étant donné que ces types de tâches prennent généralement plusieurs séances à mettre en œuvre. Ainsi, comprendre l'impact de la restriction calorique est crucial pour assurer l'utilisation éthique des animaux dans des études scientifiques. Avant de poursuivre cette section, il est important de faire une distinction entre les mots "*restriction*" et "*privation*". Le premier implique un accès restreint/limité à la nourriture (voire à l'eau), tandis que le second fait référence au refus total d'accès à l'eau ou à la nourriture (Toth & Gardiner, 2000). Nous nous concentrerons principalement sur les techniques de restriction alimentaire.

La restriction alimentaire chez les animaux de laboratoire a été un sujet d'intérêt important, car elle peut avoir des effets profonds sur leur bien-être, leur comportement et leur durée de vie (pour une méta-analyse, voir : [Swindell, 2012](#)). C'est pourquoi des préoccupations ont été soulevées concernant les implications éthiques de la restriction alimentaire et son impact potentiel sur le comportement animal. Plusieurs études ont mis en lumière les effets de différentes routines d'alimentation et les avantages et préoccupations potentiels associés à la restriction alimentaire ([Gabloffsky et al., 2022](#) ; [Hashimoto & Watanabe, 2005](#) ; [Feige-Diller et al., 2020](#) ; [Toth & Gardiner, 2000](#)). Par exemple, la recherche a montré que la restriction alimentaire chronique peut améliorer la mémoire chez la souris, suggérant un effet positif sur la fonction cognitive ([Hashimoto & Watanabe, 2005](#)). Diverses espèces soumises à une restriction calorique ont démontré une longévité accrue et une incidence réduite de maladies liées à l'âge et de néoplasmes spontanés ([Toth & Gardiner, 2000](#)). Toth et Gardiner (2000) expliquent en outre que la longévité des rongeurs augmente de 50% lorsqu'ils sont nourris avec des restrictions alimentaires par rapport à l'alimentation ad libitum, et cette augmentation est proportionnelle au degré de la restriction calorique.

Cependant, il a été démontré que les animaux soumis à une restriction calorique ont montré une motivation similaire pour la nourriture que ceux souffrant de privation aiguë, augmentant potentiellement leur envie de consommer des aliments appétissants ([Hashimoto & Watanabe, 2005](#)). Dans leur article, Hashimoto et Watanabe (2005) expliquent que cette motivation accrue à manger peut soulever des inquiétudes quant au développement d'un comportement de type compulsif ou d'un effet « régime yo-yo », où les animaux peuvent présenter des comportements de frénésie alimentaire lors d'un accès intermittent à des aliments appétissants.

Comme nous pouvons le constater, plusieurs études rapportent des effets positifs de la restriction calorique sur la santé des rongeurs, mais il y en a aussi certaines qui rapportent des effets négatifs. Cela revient à conclure qu'un aspect déterminant de l'impact positif ou négatif des protocoles de restriction alimentaire réside dans la qualité de leur mise en œuvre. Toth et Gardiner (2000) affirment qu'il existe trois problèmes principaux dans l'évaluation de ces protocoles : le besoin et le degré de restriction calorique, l'évaluation des éventuelles conséquences négatives, et l'évaluation appropriée des soins nécessaires pour éviter les effets indésirables sur les animaux tout en permettant la bonne administration des tâches pour lesquelles la restriction est nécessaire. Ces chercheurs expliquent en outre que les besoins métaboliques sont généralement calculés en fonction du poids corporel et de la consommation

alimentaire, mais les variables suivantes peuvent avoir un impact sur ces mesures et conduire ainsi à une information limitée sur les besoins caloriques minimaux appropriés :

- La variabilité interindividuelle de la consommation alimentaire et du poids corporel
- Les facteurs environnementaux tels que l'occasion de faire de l'exercice et les conditions de logement peuvent influencer les besoins caloriques
- Les différences de stockage des calories
- La palatabilité et la facilité d'obtention de la nourriture

Comment choisir la bonne façon de mettre en œuvre la restriction calorique ? Que dit la littérature à ce sujet ?

Feige-Diller et al. (2020) ont cherché à étudier l'impact de différentes routines d'alimentation sur le bien-être des souris de laboratoire en réalisant deux expériences indépendantes, chacune impliquant 36 souris mâles C57BL/6 :

- Dans **l'expérience 1** (d'une durée totale de 8 semaines), trois routines d'alimentation ont été comparées : l'alimentation ad libitum (accès illimité à la nourriture), un régime sur une période de 24 h (recevoir une quantité réduite de nourriture une fois par jour) et la retraite de nourriture pendant 4 h (la nourriture était retirée pendant 4 h pendant une période d'activité alimentaire élevée - immédiatement après l'extinction des lumières). Les résultats de l'expérience 1 ont montré que le groupe alimenté ad libitum et le groupe de retrait temporaire de nourriture ont continuellement pris du poids tout au long de l'étude, tandis que le groupe de 24 h a maintenu avec succès son poids corporel au niveau souhaité. Ce dernier groupe a également montré des niveaux plus faibles de comportement du type anxieux et un comportement exploratoire plus élevé par rapport aux souris des deux autres types de routines d'alimentation.
- Dans **l'expérience 2** (les rongeurs ayant été testés pendant 9 semaines), les chercheurs ont cherché à imiter le comportement alimentaire naturel des souris, qui consiste à manger plusieurs petits repas tout au long de la journée, et ont donc créé le groupe AUTO : ils ont reçu de la nourriture par le biais d'un dispositif d'alimentation automatisé qui distribuait de petits pellets à différents moments. Ce nouveau groupe expérimental a été à nouveau comparé à deux groupes de souris suivant soit une routine d'alimentation ad libitum, soit un régime sur une période de 24 h. Les résultats de cette deuxième expérience ont à nouveau montré que les souris alimentées ad libitum ont continuellement pris du poids, tandis que les souris des deux autres groupes ont réussi à maintenir leur poids dans la plage souhaitée.

Le groupe AUTO a montré un comportement stéréotypé plus prononcé que les autres groupes. Cependant, le groupe du régime de 24 h a présenté des niveaux plus faibles de comportement du type anxieux par rapport au groupe ad libitum et au groupe AUTO.

En conclusion, l'étude a démontré que le régime alimentaire sur une période de 24 h maintenait efficacement le poids corporel des souris tout en prévenant les effets négatifs associés à l'alimentation ad libitum, tandis que le groupe AUTO, qui imitait le comportement alimentaire naturel, entraînait un comportement stéréotypé accru, suggérant un impact négatif sur le bien-être.

Ainsi, nous devons utiliser un régime sur une période de 24 h. Mais comment calculer correctement la quantité de nourriture fournie ? Voici quelques suggestions trouvées dans la littérature :

1. Les souris doivent être maintenues à environ 85% de leur poids corporel ([Acosta et al., 2020](#)), ou entre 85 et 90% ([Alvarez et al., 2023](#)).
2. Une quantité précise de nourriture doit être fournie chaque jour après les tests opérants ([De Moura & León, 2016](#)).
3. Utilisation de méthodes permettant une perte de poids progressive ([De Moura & León, 2016](#) ; [Toth & Gardiner, 2000](#)).
4. L'isolation des animaux (single-housing) permet de contrôler correctement les portions fournies et consommées ([McGill University, 2023](#)).
5. Un personnel qualifié doit être chargé d'évaluer l'état des animaux ([McGill University, 2023](#)).
6. Le poids de base (baseline bodyweight) doit être mesuré avant la restriction calorique ([McGill University, 2023](#)) pour permettre un régime alimentaire plus individualisé ([Rowland, 2007](#)).

Un dernier aspect important à mentionner dans cette section est que les cycles veille-sommeil et l'apport alimentaire sont étroitement liés ([Challet, 2019](#)). Selon l'article de Challet (2019), la régulation de l'apport alimentaire est influencée non seulement par des mécanismes homéostatiques, mais aussi par des processus circadiens. Le cerveau possède un réseau d'horloges circadiennes qui établissent des périodes quotidiennes pendant lesquelles la consommation alimentaire peut avoir lieu, ces périodes coïncidant avec la phase active des animaux. Le chercheur explique que les signaux rythmiques provenant d'hormones métaboliques, les nutriments circulants et les entrées neuronales viscérales synchronisent le

cerveau et les organes périphériques avec le moment du repas, et il a été observé que les perturbations du rythme circadien et les repas hors phase ont des effets néfastes sur la santé métabolique. En revanche, manger pendant la phase active, même avec un régime déséquilibré, contribue à réduire les perturbations métaboliques. Par conséquent, en plus de l'apport énergétique et de la composition alimentaire, des habitudes alimentaires correctement synchronisées sont essentielles pour éviter la désynchronisation circadienne et minimiser les risques métaboliques. Dans des conditions de laboratoire où les animaux ont un accès libre à une alimentation équilibrée sur le plan nutritionnel, ils adoptent généralement un schéma alimentaire avec plusieurs repas tout au long de la journée, la plupart étant consommés pendant la phase active (Rowland, 2007). Cependant, les animaux peuvent ajuster leur moment de prise alimentaire pour correspondre à la disponibilité de la nourriture pendant les différentes phases du cycle jour-nuit (Rowland, 2007). Dans les protocoles de restriction, les animaux sont souvent nourris pendant leur phase de repos pour des raisons de commodité pour les expérimentateurs, même si l'utilisation de cycles jour-nuit inversés serait plus proche du comportement naturel (en alignant la disponibilité de la nourriture sur les rythmes alimentaires naturels ; Rowland, 2007).

Le choix des tâches appropriées.

Comme déjà évoqué, les effets du moment de testing sur les rongeurs ne sont pas encore tout à fait explorés, en particulier concernant des comportements tels que l'impulsivité, la recherche de récompenses, et l'apprentissage (Mungenast & Fox, 2021). Une des sources de diminution des performances des rongeurs aux tests comportementaux qui nécessitent des capacités d'apprentissage et de mémoire peut être la privation de sommeil (Hawkins & Golledge, 2018). Ainsi, si des tests continus sont effectués pendant la période de repos, les souris pourraient commencer à accumuler un déficit de sommeil qui à son tour affectera leurs performances, et par conséquent la qualité des résultats issus de ces études (Hawkins & Golledge, 2018). Dans ce travail, il serait donc intéressant de tester l'effet des phases light/dark sur la cognition en utilisant des tâches opérantes, vu qu'elles permettent une étude plus à long-terme de ces effets. Mais quelle tâche choisir ?

Dans les études que nous avons décrites précédemment, nous avons observé l'utilisation de différents tests tels que le SAT, le Delay Discounting et le PR. C'est pourquoi nous avons pensé qu'il serait intéressant d'utiliser une nouvelle tâche, telle que l'Apprentissage de l'Ordre Sériel (Serial Order Learning, SOL).

Le SOL est un programme opérant pour les rongeurs qui implique l'acquisition et l'exécution d'une séquence motrice ordonnée (Linden et al., 2016). La mémoire procédurale, considérée comme un type de mémoire implicite responsable de l'acquisition, du stockage et de l'exécution de comportements ou compétences hautement automatisés, joue un rôle crucial dans cette tâche (Linden et al., 2016). Dans la tâche SOL, les animaux sont entraînés à effectuer une séquence motrice spécifique, notamment un appui du levier gauche suivi immédiatement d'un appui du levier droit (Linden et al., 2016 ; Yin, 2010). À mesure que les animaux apprennent la séquence, elle devient automatique et déclenchée par des indices externes, sans nécessiter de rappel explicite, de ressources cognitives importantes ou de conscience rétrospective (Linden et al., 2016 ; Brooks et al., 2012). L'utilisation de cette tâche vise à évaluer à la fois les déficits d'apprentissage implicite et procédural, ainsi que les déficits d'attention visuo-spatiale et d'apprentissage séquentiel, permettant ainsi d'obtenir des informations sur les capacités cognitives des animaux et d'éventuels déficits dans divers aspects de l'apprentissage (Linden et al., 2016 ; Brooks et al., 2012).

Pour la deuxième partie de notre étude, nous avons décidé de reproduire l'étude d'Acosta et al. 2020 pour les raisons suivantes :

Comme déjà mentionné, Acosta et al. (2020) déclarent que leur travail est le premier à explorer le lien entre la motivation et les phases circadiennes en utilisant la tâche PR. Nous devons garder à l'esprit qu'il y a plusieurs problèmes méthodologiques avec l'étude de ces chercheurs. Après avoir analysé leur article, nous nous sommes rendu compte que pas toutes les informations issues des résultats statistiques ne sont pas mentionnées dans l'article. En plus, le nombre de sujets dans chaque groupe expérimental n'est pas mentionné dans le texte, mais il est éparpillé dans les descriptions des différents graphiques fournis par les chercheurs, rendant l'information difficile à trouver. Également, le poids des souris n'est pas donné, ce qui est important lors de l'utilisation d'un modèle de restriction calorique. Et aussi il y a très peu d'informations sur la tâche opérante qui est un élément clé pour s'assurer que les rongeurs ont appris le lien entre les appuis sur le levier et l'obtention de récompenses. Un tableau mettant en parallèle les critères du guide ARRIVE (Kilkenny et al., 2010) avec le contenu de l'article de recherche d'Acosta et al. (2020) est fourni dans *l'Annexe 1*. Ainsi, compte tenu de tous ces problèmes, une autre tentative pour comprendre l'implication du moment de testing sur la motivation pour la nourriture est selon nous nécessaire.

Le Progressive Ratio est une tâche utilisée à plusieurs fins, pour évaluer la puissance d'un renforçateur (Roane, 2008) ou tester la motivation pour une récompense alimentaire (Acosta et al., 2020). Dans une même session d'un programme PR, une fois avoir reçu un renforçateur après une réponse donnée, le nombre de réponses requises pour obtenir à nouveau un renforçateur augmente progressivement. Afin de préparer ce programme, plusieurs facteurs doivent être pris en compte, notamment : l'algorithme pour le nombre de réponses nécessaires, la quantité de renforcement donnée et les critères d'arrêt de la séance (Roane, 2008). Dans notre étude, nous utilisons le même algorithme qu'Acosta et al. (2020), qui est l'équation suivante : $P = [5 \times e^{(ix0,2)}] - 5$, avec « P » étant le nombre d'appuis nécessaires pour obtenir une récompense et « i » étant le nombre d'essais. Les mesures habituelles utilisées pour évaluer la motivation sont le nombre d'appuis sur levier effectués au cours d'une session, le nombre de renforcements obtenus et le breakpoint qui est défini comme le dernier nombre de réponses demandées pour obtenir une récompense qui n'est pas atteint avant la fin de la session (Acosta et al., 2020).

Les objectifs de l'étude actuelle : Hypothèses

Le but de ce mémoire est d'étudier les effets du moment du test sur différents processus cognitifs et comportementaux chez de jeunes souris C57BL/6. Plus précisément, deux expériences distinctes ont été menées, chacune impliquant un groupe différent de souris et évaluant des capacités différentes, afin d'obtenir une compréhension plus complète du sujet.

Dans la première expérience, l'objectif était d'examiner l'influence du moment de testing sur l'apprentissage et la rétention d'une réponse automatisée en utilisant la tâche de Serial Order Learning (SOL). De plus, l'impact du moment du test sur la flexibilité cognitive et la capacité à inhiber une réponse précédemment apprise a été évalué à l'aide de la tâche de Reversal Learning (Arias et al., 2015). Pour y parvenir, de jeunes souris femelles ont été testées pendant leur phase active ou leur phase de repos. En se basant sur la littérature existante sur le sujet (présentée dans l'Introduction de ce Mémoire), il reste peu clair si les tests effectués pendant la phase dark améliorent les performances. Bien qu'il soit suggéré que les tests effectués pendant la phase active soient plus appropriés pour des raisons méthodologiques (en particulier en ce qui concerne la reproductibilité des résultats) et éthologiques, des facteurs de stress potentiels tels que le bruit et l'exposition inattendue à la lumière pourraient potentiellement influencer négativement les performances pendant cette phase (Hawkins & Golledge, 2018 ; Peirson et al., 2018). Aussi, compte tenu des disparités constatées dans les recherches actuelles, il nous est encore plus difficile de formuler une hypothèse unidirectionnelle. Mais, considérant le fait

que la plupart des études actuelles utilisent des tests rapides, nous croyons que l'utilisation de tâches opérantes, qui sont plus robustes, nous permettrait de mieux mettre en évidence d'éventuelles différences entre les groupes. Nous fondons également notre réflexion sur l'une des seules études utilisant une tâche opérante pour étudier la cognition dans ce contexte, l'expérience de Gritton et al. (2012) décrite précédemment. Pour rappel, l'étude de Gritton et al. (2012) a montré que le groupe DARK surpassait le groupe LIGHT, en particulier lors de l'acquisition initiale. Cela nous a conduit à émettre l'hypothèse de l'existence de différences de performance entre les deux groupes dans le SOL et le Reversal Learning (RV), avec une meilleure performance pour le groupe DARK, notamment lors des sessions initiales.

De plus, une autre motivation derrière cette première expérience était de comprendre l'impact de l'exposition à la lumière sur la cognition indépendamment du moment de testing, ainsi que l'interaction possible entre ces deux concepts. C'est pourquoi le même groupe de souris sera soumis à la tâche SOL dans deux conditions lumineuses : Lumière Allumée et Lumière Éteinte. Étant donné que la lumière est le principal Zeitgeber (Tosini et al., 2007 ; Vitaterna et al., 2001) et que les rongeurs ont une aversion inhérente à la lumière (Bourin & Hascoët, 2003), nous nous attendons à ce que les performances soient perturbées par l'exposition à la lumière pour les deux groupes expérimentaux, mais que cet effet soit plus évident dans le groupe DARK.

Enfin, la nécessité de la restriction calorique dans les tests opérants sera explorée. Malgré le fait que les tâches opérantes nécessitent souvent une restriction calorique, une restriction prolongée peut affecter la santé des animaux. En outre, isoler les souris pour une administration alimentaire adéquate pourrait éventuellement entraîner également des conséquences négatives. C'est pourquoi nous avons décidé de tester s'il était possible d'obtenir des résultats satisfaisants sans restriction calorique. Dans l'une des expériences menées pour son mémoire, Zaros (2018) a testé 48 souris C57BL/6 femelles dans un plan expérimental 2 x 2 en utilisant une tâche d'Attentional Set-Shifting (ASST). Plus précisément, les groupes ont été testés soit pendant leur phase dark soit pendant leur phase light (conditions **LIGHT** et **DARK**), et ils ont été soit maintenus isolés et en restriction calorique, soit logés en groupe et nourris ad libitum (conditions **SINGLE** et **GROUP**). Les résultats de son étude ont montré que :

- *Le nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère* pour la phase de discrimination visuelle (VD) différait entre les groupes, les souris LIGHT-GROUP et DARK-GROUP ayant besoin de plus d'essais que les deux autres groupes. Lors des deux autres phases, le

changement extra dimensionnel (EDS) et le Reversal Learning, cette différence était largement atténuée.

- *Le taux d'omissions* était plus élevé pour les groupes nourris ad libitum que pour les groupes en restriction calorique pour les trois phases (VD, EDS, Reversal Learning).
- *Pour le pourcentage de réponses correctes lors de la dernière session*, il n'y a pas eu de différence entre les groupes, les performances étant d'environ 80% pour tous les groupes.
- *Pour la latence de collecte*, les groupes logés en groupe présentaient une latence plus élevée, en particulier pendant les phases d'EDS et de Reversal Learning.
- En ce qui concerne *le nombre d'erreurs*, les rongeurs du groupe LIGHT-GROUP commettent plus d'erreurs que les trois autres groupes (qui, à leur tour, présentent des performances similaires entre eux).

Sur la base de ces résultats, Zaros (2018) conclut que même s'il faut plus de temps pour que les souris nourries ad libitum atteignent le critère, elles montrent une bonne acquisition de la tâche (tous les groupes atteignant 80% de réponses correctes). Cependant, elle affirme qu'il y a un impact du moment des testing sur la manière dont les conditions alimentaires influencent la cognition. En général, les souris DARK-GROUP ont des performances similaires aux deux groupes en restriction calorique, tandis que les animaux LIGHT-GROUP présentent un nombre beaucoup plus élevé d'erreurs dans toutes les phases de l'ASST. Donc, si les groupes ad libitum de cette étude parvenaient à atteindre le critère (même si cela leur a pris plus de temps), il sera possible pour elles de bien performer dans notre étude. Dans notre expérience, l'effet de la restriction calorique sera exploré de deux manières :

1. **En testant un groupe de rongeurs ayant un accès libre à la nourriture** : Ce groupe de rongeurs sera testé dans des conditions optimales, c'est-à-dire qu'ils seront nourris ad libitum, logés en groupe (Zaros, 2018) et testés pendant leur phase active. Nous avons décidé de les tester pendant leur phase active car les rongeurs consomment principalement de la nourriture au début et à la fin de cette phase, et très peu pendant la phase light (Nelson et al., 2021).
2. À la fin de notre étude, **nous permettrons à nouveau aux rongeurs d'avoir un accès progressif à la nourriture**, et nous continuerons à les tester pendant plusieurs jours pour déterminer s'il est encore nécessaire de recourir à la restriction calorique une fois que la séquence appropriée pour obtenir une récompense est acquise.

Pour récapituler, nos hypothèses pour cette première expérience sont les suivantes :

- Il y aura une différence significative entre les conditions light/dark pour les tâches SOL et RV, avec les souris du groupe DARK ayant de meilleures performances que celles du groupe LIGHT, notamment pendant l'acquisition.
- Les conditions lumineuses auront un impact significatif sur les performances des rongeurs, les animaux performant mieux lorsqu'ils ne sont pas exposés à la lumière. De plus, le groupe DARK sera plus négativement affecté que le groupe testé pendant sa phase inactive.
- Le groupe nourri ad libitum sera capable d'effectuer la tâche, mais cela prendra plus de temps par rapport aux groupes en restriction calorique. Aussi, une fois que la séquence correcte pour obtenir une récompense sera apprise et consolidée, il ne sera plus nécessaire d'avoir recours à la restriction calorique. Cela signifie que les performances des souris sous-restriction calorique, une fois qu'elles seront à nouveau nourries ad libitum, seront comparables à celles observées pendant la période de restriction.

Dans la deuxième expérience, notre objectif principal est de déterminer si le moment du test joue un rôle dans la motivation pour une récompense alimentaire. Pour tester cela, deux groupes de jeunes souris mâles C57BL/6 seront testés dans une tâche de Progressive Ratio (PR). L'une des principales raisons pour lesquelles nous avons choisi de nous concentrer sur le comportement de recherche de nourriture est le fait que certains signaux externes, tels que la nourriture, peuvent modifier l'envie d'aller dormir ([Antle & Silver, 2015](#)). Lorsque ces signaux sont disponibles pendant une courte période, l'horloge circadienne organisera des comportements motivés afin d'avoir accès aux ressources nécessaires en fonction de leur disponibilité ([Antle & Silver, 2015](#)). Pour simplifier, si un rongeur apprend que la nourriture est accessible au début de son temps de sommeil, l'horloge circadienne permettra à la motivation pour la nourriture d'être plus importante que le besoin de dormir. Dans un livre intitulé « Behavioral Neuroscience of Motivation », Antle et Silver (2015) ont mentionné qu'un scientifique appelé Dr Fred Stephan soutenait l'idée que si la nourriture est en concurrence avec la lumière, la nourriture gagne la plupart du temps.

Dans cette perspective, la performance du groupe LIGHT ne sera pas perturbée par la phase de testing, donc les deux groupes devraient avoir des performances similaires. En revanche, l'article d'Acosta et al. (2020) montre qu'il existe une forte variation diurne de la motivation, avec un pic pendant la phase dark. Cette variation s'est avérée persistante même dans l'obscurité constante, montrant ainsi son caractère endogène. Cependant, comme nous l'avons expliqué, cette étude présente plusieurs problèmes méthodologiques, et donc sans réplique, nous ne pouvons pas émettre l'hypothèse que tester les souris pendant leur phase active augmentera leur

motivation. De plus, dans plusieurs expériences menées dans notre laboratoire (aucune étude n'est publiée), y compris celle que j'ai personnellement réalisée pendant mon stage en 2022, aucune différence significative n'a été trouvée entre les phases light/dark. Cependant, dans ces expériences, nous avons utilisé des souris femelles. Ainsi, pour reproduire correctement l'étude d'Acosta et al. (2020), nous avons décidé d'utiliser des mâles pour ce mémoire.

Globalement, notre motivation derrière cette étude est de reproduire l'étude d'Acosta et al. (2020) et de voir si les animaux montreront une variation diurne de la motivation. Compte tenu des problèmes méthodologiques de cette étude et de la priorité accordée à la nourriture par rapport au sommeil, nous émettons l'hypothèse qu'il n'y aura pas de différence entre les groupes expérimentaux pour toutes les mesures de motivation.

MÉTHODES

Expérience 1

1. Animaux

Dans cette expérience, 24 souris femelles C57BL/6 âgées de 4 mois (obtenues chez Janvier Labs, France) ont été utilisées. Toutes les souris ont eu un accès illimité à l'eau et ont reçu du matériel de nidification approprié (coton et papier), un morceau de bois, du carton, et une maisonnette en plastique. Les souris maintenues sous restriction calorique ($n = 16$) ont été séparées dans des cages individuelles lors des tests opérants. Les rongeurs nourris ad libitum ($n = 8$) ont été logés par groupes de quatre. La température moyenne dans les animaleries se situait entre 20 et 21°C et l'humidité variait entre 15 et 30%. La luminosité était de 27 lux au niveau des capteurs et de 78 lux au centre de l'animalerie (à une hauteur de 1 m). Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité d'Éthique Animale de l'Université de Liège.

2. Groupes expérimentaux

Afin de tester les effets du moment du testing sur les performances dans le SOL, deux groupes de souris ont été créés, un groupe Light maintenu sous un cycle veille-sommeil normal (lumières allumées entre 8h30-20h30 et éteintes entre 20h30-8h30) testé pendant leur phase de repos et un groupe DARK maintenu sous un cycle veille-sommeil inversé (lumière éteinte entre 8h30-20h30 et allumée entre 20h30-8h30) testé pendant sa phase active. Pour explorer les effets du régime alimentaire sur la performance des animaux, un groupe supplémentaire testé dans

des conditions optimales (testé pendant la phase active et sans restriction calorique) a été créé. Pour résumer, les trois groupes expérimentaux étaient les suivants :

1. **Light-Diet (LD)** = 8 souris testées pendant leur phase de repos et sous restriction calorique.
2. **Dark-Diet (DD)** = 8 souris testées pendant leur phase active et sous restriction calorique.
3. **Dark-Ad libitum (DA)** = 8 souris testées pendant leur phase active sans restriction calorique.

3. Matériaux

Des pellets de chocolat sans sucrose Testdiet© 20 mg ont été utilisés comme récompense pour la tâche opérante. Les rongeurs ont été testés dans deux salles de testing contenant 12 chambres opérantes MED Associates© (8 dans la première salle et 4 dans la seconde). Ces chambres contiennent : un plancher grillagé standard, deux leviers pour la réponse opérante (un à gauche et un à droite), un stimulus lumineux (28 V CC, 100 mA), un distributeur de récompense, un port de récompense central (où on trouve la mangeoire), et un panneau composé de deux stimuli lumineux (2,5 cm ; 28 V DC, 100 mA). Toutes les chambres sont insonorisées et maintenues dans l'obscurité pendant les testings. Les appuis sur le levier suivis de l'obtention de la récompense et les stimuli visuels sont tous contrôlés par le programme Medstate (via l'interface SmrtCtrlTM 8-in/16-out) exécutant le logiciel MED-PC IV (Med Associates) sur un PC (Dell OptiPlex 960).

4. Procédure

- *Restriction calorique*

Les souris ont été pesées pendant trois jours consécutifs pour déterminer leur poids corporel moyen de base. Avant de commencer la restriction calorique, on a vérifié que les groupes ne différaient pas en poids corporel. Avant le Shaping, les deux groupes sous restriction calorique (LD et DD) ont été pesés quotidiennement pendant 5 jours consécutifs afin d'ajuster progressivement leur poids à 85-90% de leur poids corporel initial. Après la dernière prise de poids, la nourriture ad libitum a été retirée et une ration d'environ 10 % du poids moyen initial a été donnée. Par la suite, le ratio alimentaire quotidien a été ajusté à l'aide d'une feuille de rationnement qui prenait en compte leur poids corporel, le nombre de pellets consommés, mais aussi la perte de poids quotidienne (au moins 1 g était fourni pour éviter d'éventuels problèmes de santé). Aussi, pendant les trois premiers jours de restriction calorique, trois pellets de

chocolat Testdiet© 20 mg ont été donnés à chaque souris pour éviter la néophobie lors du Shaping. Concernant le groupe DA, ils étaient également pesés quotidiennement, mais comme mentionné, ils avaient un accès illimité à la nourriture. Concernant le groupe DA, ils étaient également pesés quotidiennement, mais comme mentionné, ils avaient un accès illimité à la nourriture. Leur nourriture a été retirée en ZT0 (8h30) lors du shaping et de la procédure SOL, pour profiter de leur propension naturelle à consommer principalement de la nourriture au début de leur phase active (Nelson et al., 2021). Au cours de l'expérience, tous les animaux ont été pesés avant d'être testés et ont été nourris immédiatement après le test.

- *Mesures de prévention des biais*

Une procédure de randomisation a été utilisée pour déterminer la chambre opérante sur laquelle chaque rongeur a été testé (voir *Annexe 2*) pour éviter que les animaux du même groupe soient testés dans le même box. Pour pouvoir reconnaître les animaux DA, leur queue était marquée quotidiennement (à partir de la première pesée) d'un code couleur spécifique pour chaque groupe de quatre rongeurs.

Pendant le transport, les rongeurs testés pendant leur phase active (DD et DA) ont été couverts par un drap opaque. Les salles d'expérimentation ont également été maintenues dans l'obscurité et une lampe infrarouge a été utilisée pour manipuler les animaux. Le groupe Light-Diet a été exposé à la lumière ambiante pendant le transport et dans les salles de testing. Après avoir été pesés, les animaux DA ont été isolés et transportés dans des cages individuelles vers les salles de testing. Ils ont été marqués après le test puis regroupés dans des cages de quatre. Les expérimentateurs sont restés hors des salles pendant chaque session de test.

- *Shaping*

Pendant le Shaping, un seul levier était présent dans la boîte opérante (celui de gauche) afin que les rongeurs puissent apprendre l'association levier-récompense, et les renforçateurs ont été obtenus sous un ratio fixe (FR ; un appui sur le levier = une récompense). Quelques pellets étaient disponibles dans la mangeoire lors de la première session pour inciter l'animal à explorer et trouver de la nourriture. Les rongeurs ont fait une session par jour jusqu'à ce que le critère de réussite soit atteint. Chaque session s'est terminée après une heure dans la chambre opérante ou lorsque 30 renforçateurs ont été obtenus. Le critère de réussite a été atteint lorsque tous les rongeurs ont obtenu 30 renforçateurs en deux jours consécutifs.

- ***Serial Order Learning (SOL)***

Dans cette tâche, les rongeurs devaient effectuer une séquence de deux appuis sur le levier (dans notre cas gauche puis droite) afin d'obtenir la récompense. Les deux leviers étaient présents dès le début de chaque séance, et ils restaient disponibles jusqu'à ce que deux appuis consécutifs (une séquence) soient effectués. Une lumière jaune au-dessus de la mangeoire a également été allumée pendant la tâche pour indiquer sa position. Après qu'une séquence (une séquence erronée : gauche-gauche, droite-droite ou droite-gauche ; ou une séquence correcte) a été effectuée, les leviers se sont rétractés pendant 8 s, puis ils étaient à nouveau disponibles. Pour exclure la soif en tant que variable confondue potentielle, un bac à eau était disponible dans la boîte opérante pendant la tâche. Chaque session est terminée une fois que 40 récompenses ont été obtenues ou qu'une heure s'était écoulée dans la chambre opérante. Au total, 12 séances de SOL (une séance quotidienne) ont été réalisées dans notre étude.

- ***Reversal Learning (RV)***

Après le SOL, les souris ont subi 12 sessions de RL. Les tâches de Reversal Learning (apprentissage inversé) permettent de tester la flexibilité cognitive en demandant aux rongeurs d'apprendre à inhiber les actions précédemment rémunératrices et à s'adapter à un nouvel ensemble de règles pour obtenir une récompense (Arias et al., 2015). Dans notre étude, nous avons décidé de changer la bonne séquence de gauche-droite à droite-gauche. Outre ce changement, tous les autres paramètres et conditions de la chambre opérante étaient les mêmes que dans le SOL (y compris l'intervalle d'inter-séquence des leviers et les conditions de fin d'une session).

- ***Conditions de luminosité***

Dans cette partie de l'étude, les lumières de la boîte opérante ont été manipulées. Plus précisément, il y avait 4 sessions pour chaque condition lumineuse (lumières allumées ou éteintes). Ces sessions comprenaient les deux dernières sessions du RV (lumières éteintes : condition NOLIGHT), suivies de deux sessions où les lumières de la chambre opérante étaient allumées (condition LIGHT), puis à nouveau deux sessions avec les lumières éteintes, et enfin deux sessions avec les lumières allumées. Les règles pour toutes les sessions étaient les mêmes que pour la tâche RV (la séquence correcte étant droite – gauche).

- ***Changements de régime alimentaire***

Enfin, nous avons décidé de tester si le fait de réintroduire progressivement de la nourriture chez les animaux et de ne pas les maintenir sous restriction calorique, leur permettrait encore de bien performer dans la tâche de RV après qu'ils se sont familiarisés avec la tâche et aient déjà appris la séquence correcte pour obtenir des récompenses. Ainsi, lors de deux sessions RV, les rongeurs ont été maintenus à 95% de leur poids corporel initial, et lors des deux sessions suivantes, ils ont eu un accès illimité à la nourriture dans leurs cages.

5. Design expérimental

Dans la *figure 1*, un schéma récapitulatif du design expérimental peut être trouvé.

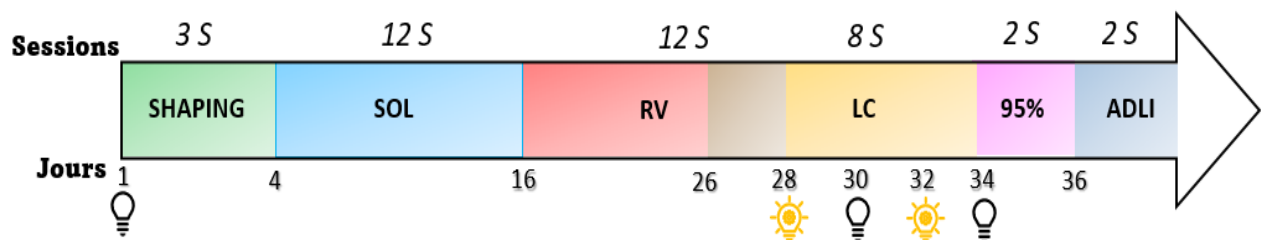


Figure 1 : Cette figure représente l'ensemble des tâches réalisées par les mêmes rongeurs (N=16 ; n=8) : Shaping, Apprentissage de l'ordre sériel (Serial-Order Learning, SOL), Apprentissage inversé (Reversal Learning, RV), Conditions lumineuses (Light Conditions, LC), sessions où les rongeurs étaient à 95% de leur poids corporel (95%), et essais où les rongeurs étaient nourris ad libitum (AL). Les sessions de chaque tâche ainsi que les jours de début de chaque tâche sont également représentées (durée totale des tests pour les souris = 38 jours). L'ampoule noire représente les tâches effectuées dans l'obscurité (les lumières dans le box opérant étaient éteintes), tandis que l'ampoule jaune représente les sessions où les lumières étaient allumées (lorsqu'il n'y a pas d'ampoule, les conditions de luminosité sont représentées par la dernière ampoule indiquée dans la figure). La zone grise entre le RV et le LC représente les deux dernières sessions de la tâche RV, qui sont également les deux premières sessions de la tâche LC.

6. Mesures comportementales

Pour analyser les données des tâches SOL et RV, les mesures suivantes ont été calculées :

1. Mesures de cognition

- **Le pourcentage de séquences correctes** (calculé comme le nombre de séquences correctes divisé par le nombre total d'essais x 100). Cette mesure indique la *précision de l'apprentissage* (Linden et al., 2016).
- **Le nombre de séquences correctes/le nombre de récompenses obtenues.**
- **Le nombre de chaque type de séquence incorrecte.**

2. Mesure de motivation/Mesure d'activité/Mesure contrôle

- **Le temps (s) nécessaire pour obtenir toutes les récompenses** (si les 40 récompenses n'étaient pas obtenues alors le temps était de 3600 s).
- **Nombre total d'essais.** Cette mesure montre la capacité des rongeurs à appuyer sur un levier (Linden et al., 2016).

7. Analyse des données

Pour analyser les données, des ANOVA mixtes suivies des comparaisons post-hoc de Tukey ont été utilisées. Les critères de normalité et d'homogénéité ont été vérifiés pour exclure la nécessité de tests non paramétriques. De plus, des corrections de sphéricité ont été appliquées si nécessaire (le test W de Mauchly a été utilisé comme test de sphéricité). Considérant que nous avons un petit échantillon (8 souris par groupe) et que la correction de Greenhouse-Geisser a tendance à être trop conservatrice (Park et al., 2009), dans les cas de non-sphéricité, les corrections de Huynh-Feldt étaient généralement utilisées. La correction de Greenhouse-Geisser a été utilisée lorsque le test de Levene a montré un manque d'homogénéité des variances dans plusieurs sessions. Dans certains cas, des tests T pour échantillons indépendants ont été utilisés pour comparer les performances entre les groupes pour la première session de l'une des tâches. Lorsque les critères de normalité et d'homogénéité n'étaient pas remplis, le test U de Mann-Whitney a été utilisé. Si les données étaient normalement distribuées mais non homogènes, le test T de Welch a été utilisé à la place. Également, des ANOVA simples (ou Kruskal-Wallis, leur équivalent non paramétrique) ont été utilisées lorsque cela était nécessaire. Tous les graphiques affichés dans la section *Résultats* présentent les valeurs moyennes avec des barres d'erreur représentant les intervalles de confiance (IC) à 95%. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Jamovi (The Jamovi Project, 2021).

Le groupe DARK-AL n'a pas pu performer correctement lors de la première tâche : seules trois sur huit souris ont réussi à atteindre le critère de réussite pendant le Shaping, et ces trois rongeurs avaient une performance non comparable à celle des souris maintenues en restriction calorique. C'est pourquoi les données de ce groupe ne seront pas analysées ni présentées dans les résultats. Étant donné qu'il ne reste que deux groupes, la plupart du temps nous ferons référence aux groupes restants en tant que **LIGHT** et **DARK**.

Expérience 2

1. Animaux

Dans cette expérience, 36 souris mâles C57BL/6 âgées de 4 mois (obtenues chez Janvier Labs, France) ont été utilisées. Toutes les souris ont été maintenues dans des conditions similaires à celles des rongeurs testés dans la tâche SOL (accès illimité à l'eau, matériel de nidification, cages individuelles, la température, l'humidité, et la luminosité). Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité d'Éthique Animale de l'Université de Liège.

2. Groupes expérimentaux

Pour tester les effets du moment du test sur les niveaux de motivation dans la tâche PR, deux groupes de souris ont été créés, le groupe LIGHT (N=18) maintenu sous un cycle veille-sommeil normal (lumières éteintes entre 1h et 13h et allumées entre 13h et 1h ; ZT0 = 13h) testé pendant leur phase de repos et le groupe DARK (N=18) maintenu sous un cycle veille-sommeil inversé (lumières allumées entre 1h et 13h et éteintes entre 13h et 1h ; ZT0 = 1h) testés pendant leur phase active. Compte tenu du nombre limité de boîtes opérantes (seulement 12 ; voir section ci-dessous), les rongeurs de chaque groupe ont été divisés en trois sous-groupes (6 souris pour chaque groupe) testés successivement. Plus de précisions seront données dans la section *Procédure*.

3. Matériaux

Des pellets à base de céréales BioServ © 20 mg ont été utilisés comme récompense pour la tâche opérante. Les rongeurs ont été testés dans deux salles de test contenant 12 chambres opérantes MED Associates© (8 dans la première salle et 4 dans la seconde). Ces chambres sont identiques à celles utilisées pour la procédure SOL, mais un seul levier était présent pour l'intégralité de l'expérience (voir la section *Matériaux* sur la tâche SOL ; Figure 2).



Figure 2 : Deux photos d'une souris travaillant dans l'une des box PR qui seront utilisées dans notre étude. Dans la première photo, la souris appuie sur le levier situé dans le côté gauche du box. Sur la seconde photo, la souris est dans la mangeoire à la recherche du pellet et on peut voir également le distributeur des pellets.

4. Procédure

- *Restriction calorique*

Comme dans la procédure SOL, les souris ont été pesées pendant trois jours consécutifs pour déterminer leur poids corporel moyen de base et des analyses statistiques ont été effectuées pour vérifier que les groupes ne différaient pas en poids corporel. Avant le Shaping, les deux groupes ont été pesés quotidiennement pendant 5 jours consécutifs afin d'ajuster progressivement leur poids à 85-90% de leur poids corporel initial. Après la dernière prise de poids, la nourriture ad libitum a été retirée et une ration d'environ 12 % du poids moyen initial

a été donnée. Par la suite, le ratio alimentaire quotidien a été ajusté à l'aide d'une feuille de rationnement (comme dans la première expérience) qui prenait en compte leur poids corporel, le nombre de pellets consommés, mais aussi la perte de poids quotidienne (au moins 1 g était fourni pour éviter d'éventuels problèmes de santé). Encore, les rongeurs ont été gardés dans des cages individuelles pour faciliter l'alimentation. De plus, durant les trois premiers jours de restriction calorique, trois pellets BioServ© ont été donnés à chaque souris pour éviter la néophobie lors du Shaping. Au cours de l'expérience, tous les animaux ont été pesés avant d'être testés et ont été nourris immédiatement après le test.

- **Mesures de prévention des biais**

Les mêmes mesures que dans la tâche SOL ont été prises pendant le transport. Une procédure de randomisation a été utilisée pour déterminer la chambre opérante sur laquelle chaque rongeur a été testé (*Annexe 3*).

- **Shaping**

Pendant l'entraînement, comme mentionné précédemment, un seul levier était présent dans la boîte opérante (celle de gauche) et les renforçateurs ont été obtenus dans un rapport fixe (FR ; un appui sur le levier = une récompense). Les rongeurs ont fait une session par jour jusqu'à ce que le critère de réussite soit atteint. Chaque session s'est terminée après 1 h dans la chambre opérante ou lorsque 60 renforçateurs ont été obtenus. Le critère de réussite a été atteint lorsque tous les rongeurs ont obtenu 60 renforçateurs en deux jours consécutifs. Un dernier programme FR a été réalisé avant le PR pour s'assurer que tous les rongeurs avaient appris l'association levier-pellet.

- **Progressive Ratio Schedule (PR)**

Le PR a commencé le jour suivant le FR et la tâche a été administrée pendant cinq jours consécutifs. Dans l'article d'Acosta et al. (2020), il n'y avait aucune information concernant les conditions d'illumination dans les chambres opérantes. Pour cette raison, je les ai contactés par mail pour leur demander ces informations. Ils m'ont informé que la lumière était éteinte pour tous les groupes expérimentaux et pendant toute la durée de l'expérience, c'est donc ce que nous avons également fait dans notre étude. Cet échange de courriels se trouve dans l'*Annexe 4*. Afin de préparer ce programme, plusieurs facteurs doivent être pris en compte, notamment : l'algorithme pour le nombre de réponses nécessaires, la quantité de renforcement donnée et les critères d'arrêt de la séance (Roane, 2008). Dans notre étude, nous avons utilisé le même algorithme qu'Acosta et al. (2020) : $P = [5 \times e^{(ix0,2)}] - 5$, avec « P » étant le nombre d'appuis

nécessaires pour obtenir une récompense et « i » étant le nombre d'essais. La session était finie une fois que les souris avaient passé 2 h dans la boîte opérante, ou quand 10 min sont passés sans appuis sur le levier.

5. Mesures comportementales

Comme dans l'étude d'Acosta et al. (2020), le nombre de pellets obtenus, le nombre d'appuis sur le levier, et le breakpoint (le dernier nombre de réponses demandé pour obtenir une récompense qui n'est pas atteint avant la fin de la session) ont été mesurés. Contrairement à ces chercheurs, nous n'avons pas mesuré le pourcentage de survie, car tous les animaux ont travaillé pendant les 2 h sans s'arrêter.

6. Analyse des données

Lors de l'analyse des 4 sessions PR, des ANOVA mixtes ont été utilisées. Les tests T de Student ont également été utilisés pour explorer les différences possibles entre les deux groupes expérimentaux lors de la première session de PR. Des tests non paramétriques ont été utilisés lorsque cela était nécessaire.

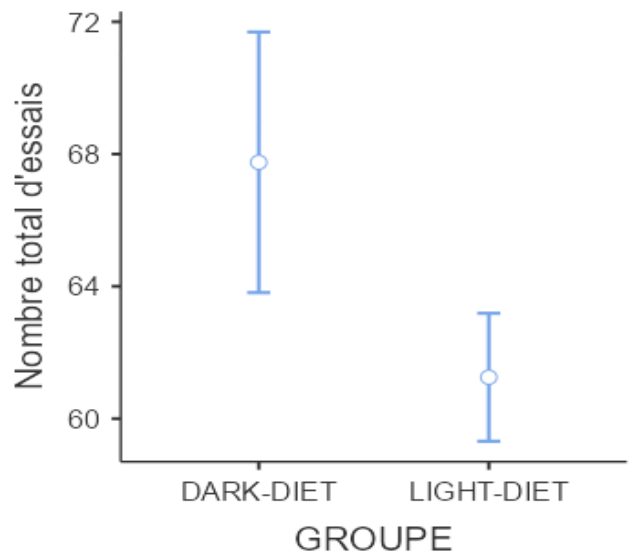
RESULTATS

Expérience 1

- Shaping

Pour explorer les différences intergroupes dans l'apprentissage de la réponse opérante, différentes analyses statistiques ont été menées. Considérant que certaines souris ont mis deux séances pour atteindre le critère de réussite et que d'autres ont mis trois séances, et qu'il manque donc des données, au lieu d'utiliser une ANOVA mixte pour tester l'effet du moment du test sur le nombre de renforçateurs obtenus, j'ai décidé de calculer le nombre total d'essais (somme des renforçateurs obtenus lors de toutes les séances de Shaping) et de réaliser un test T de Student. Les résultats statistiques ont montré une différence significative entre les deux groupes pour le nombre total d'essais ($t(14) = 3.50, p = .004, d = 1.75$; Graphique 1) avec plus d'essais pour le groupe DARK comparé au groupe LIGHT. Lors de l'analyse des données des appuis sur le levier pour la première session de Shaping, l'hypothèse de normalité a été violée (test de Shapiro-Wilk, $p = .026$) et il y avait une différence significative de variances entre les groupes

(test de Levene, $p < .001$), c'est pourquoi j'ai utilisé le test U de Mann-Whitney. Le test n'a révélé aucune différence significative entre les deux groupes ($U(14) = 18.0$, $p = .148$), mais il convient de mentionner que la corrélation bisériale des rangs indiquait une corrélation modérée ($r = .438$) entre le nombre d'appuis sur le levier et les groupes. Enfin, un test t de Welch a été effectué sur le taux de réponse pour la première session (nombre d'appuis sur le levier/temps) indiquant une différence significative entre les groupes avec une grande taille d'effet ($t(7.88) = -2.62$, $p = .031$, $d = -1.31$), le groupe DARK ayant un taux de réponse inférieur à celui du groupe LIGHT.

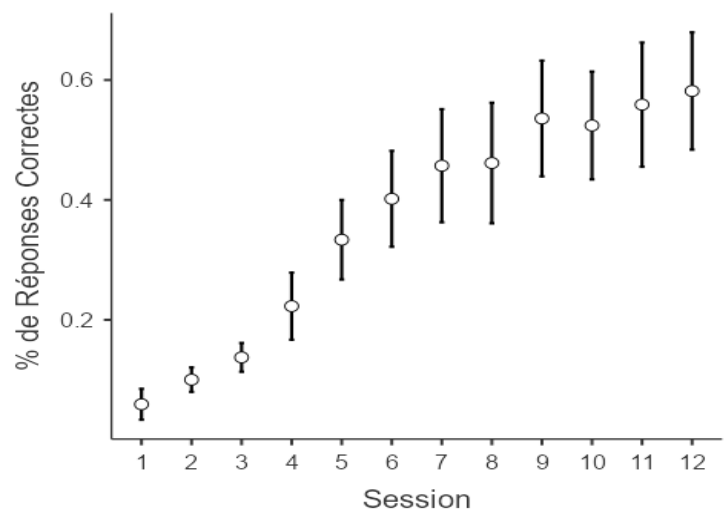


Graphique 1 : Représentation du nombre total d'essais pour atteindre le critère de réussite pour chaque groupe expérimental.

- SOL

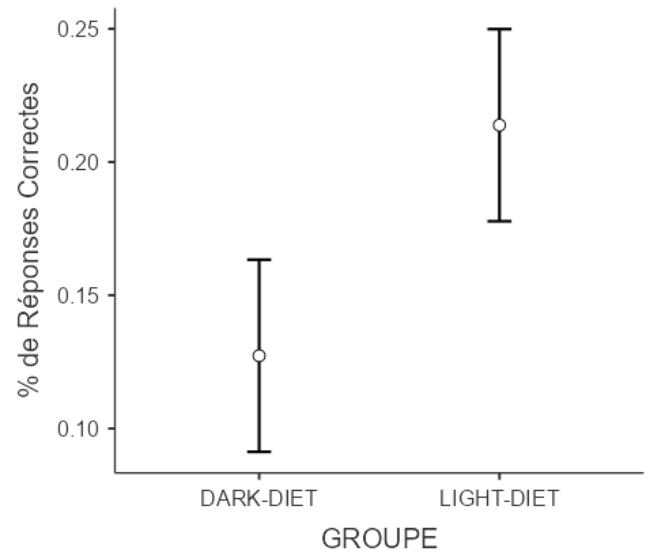
a. Pourcentage de réponses correctes

L'ANOVA mixte sur le pourcentage de réponses correctes pour les 12 sessions du SOL a montré un effet principal significatif de la session ($F(4.24,59.34) = 40.918$, $p < 0,001$, $\eta^2 = .745$; Graphique 2), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.49$, $p = .137$) ni une interaction session*groupe ($F(4.24,59.34) = 0.962$, $p = .438$).



Graphique 2 : Le pourcentage de réponses correctes pour les 12 sessions du SOL.

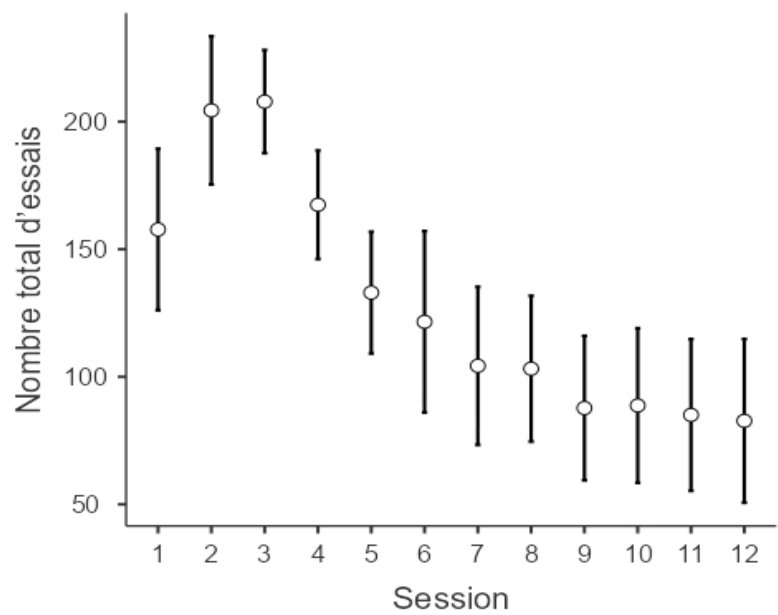
On a également décidé d'effectuer une ANOVA simple pour chaque session et l'analyse a montré un effet significatif uniquement pour la 3e ($p = .007$), la 4e ($p = .008$), et la 5e session ($p = .021$). Pour cette raison, une ANOVA mixte pour les 5 premières sessions du SOL (reflétant la *phase d'acquisition* de la réponse automatisée) a été menée. L'ANOVA a montré un effet principal de session ($F(2.66,37.23) = 37.07, p < .001, \eta^2 = .726$), un effet principal du groupe ($F(1,14) = 13.3, p = .003, \eta^2 = .486$; Graphique 3), et une interaction session*groupe significative ($F(2.66,37.23) = 4.33, p = .013, \eta^2 = .236$). L'analyse post-hoc de Tukey a confirmé la différence intergroupe ($t(14) = -3.64, p = .003$) avec le groupe DARK montrant un pourcentage inférieur de réponses correctes par rapport au groupe LIGHT.



Graphique 3 : Le pourcentage de réponses correctes pour chaque groupe pour les 5 sessions initiales du SOL.

b. Nombre total d'essais

L'ANOVA menée sur le nombre total d'essais pour les 12 sessions du SOL a montré un effet principal de la session ($F(3.60,50.43) = 19.74, p < .001, \eta^2 = .585$; Graphique 4), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.33, p = .149$) ni une interaction session*groupe ($F(3.60,50.43) = 2.44, p = .065$). De plus, les ANOVA simples réalisées sur chaque session ont révélé un effet principal de la variable « groupe » pour seulement la 4ème ($p = .003$) et la 5ème session ($p = .018$), avec les analyses post-hoc de Tukey (4ème session : $p = .002$; 5ème session : $p = .012$) montrant un nombre plus élevé d'essais pour le groupe qui a été testé pendant sa phase active par rapport au groupe testé pendant sa phase de repos.



Graphique 4 : Le nombre total d'appuis sur levier pour les 12 sessions SOL.

c. Types de séquences

c.1. Gauche - Droite (séquence correcte)

Pour cette mesure comportementale, seules les cinq premières sessions SOL ont été analysées, en raison d'un effet de plateau (presque toutes les souris ont commencé à obtenir 40 récompenses) pour le reste des sessions. L'ANOVA mixte pour les 5 sessions, a révélé un effet principal de session ($F(3.91,54.81) = 37.465, p < .001, \eta^2 = .728$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 4.22, p = .059$) ni d'effet d'interaction ($F(3.91,54.81) = 0.957, p = .437$).

c.2. Droite - Gauche

L'ANOVA menée sur l'effet de groupe sur les 12 sessions, a révélé un effet principal de la session ($F(5.45,76.31) = 5.01, p < .001, \eta^2 = .263$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.25, p = .155$) ni une interaction session*groupe ($F(5.45,76.31) = 1.64, p = .154$).

c.3. Gauche – Gauche

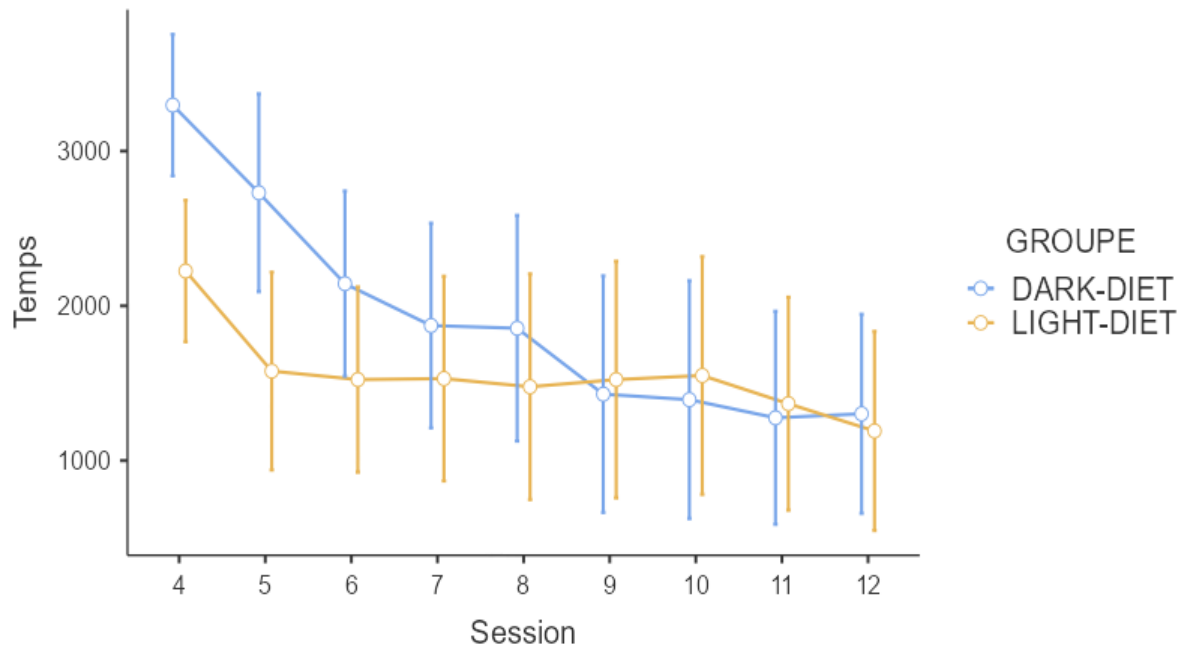
L'ANOVA mixte a de nouveau montré un effet principal de la session ($F(1.93,26.98) = 45.21, p < .001, \eta^2 = .726$), et aucun effet principal significatif du groupe ($F(1,14) = 1.32, p = .270$) ni d'interaction ($F(1.93,26.98) = 1.07, p = .355$).

c.4. Droite - Droite

Les analyses statistiques ont révélé un effet principal de la session ($F(4.32,60.53) = 20.62, p < .001, \eta^2 = .596$) et une interaction significative session*groupe ($F(4.32,60.53) = 2.76, p = .032, \eta^2 = .165$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 3.14, p = .098$).

d. Temps mis pour terminer la tâche

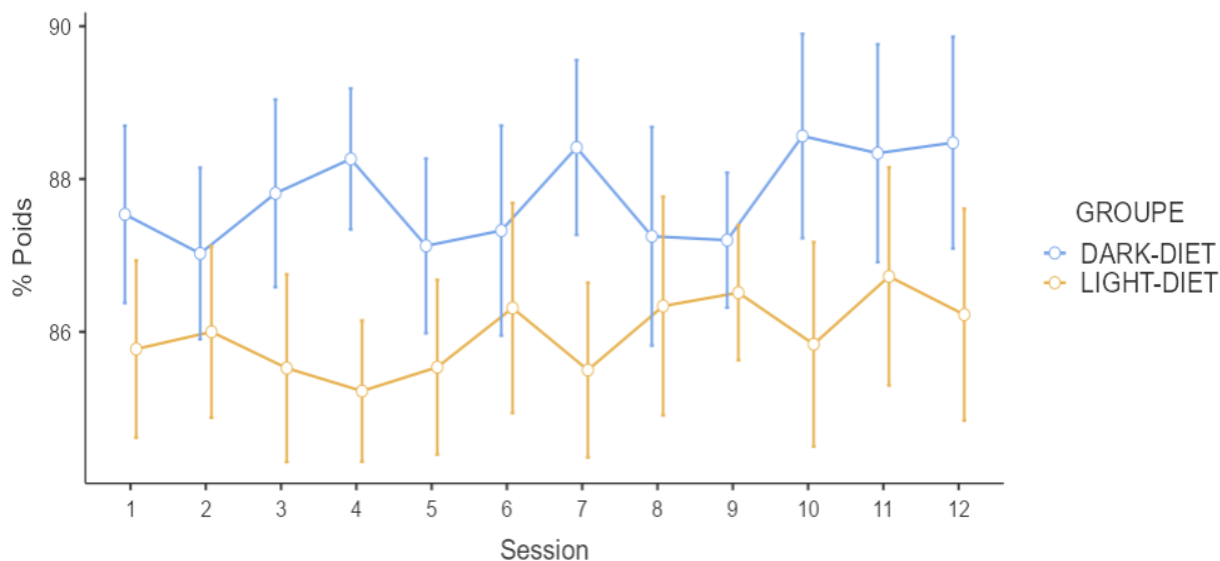
Au cours des trois premières sessions, presque tous les rongeurs ont pris une heure (3600 s) pour accomplir la tâche. C'est pourquoi on a décidé d'analyser les données pour cette variable à partir de la session quatre (après que la séquence correcte ait commencé à être comprise). Les analyses statistiques ont révélé un effet principal de la session ($F(3.22,45.02) = 10.75, p < .001, \eta^2 = .434$) et une interaction significative session*groupe ($F(3.22,45.02) = 2.77, p = .041, \eta^2 = .172$; Graphique 5), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 1.15, p = .302$).



Graphique 5 : Le temps pris par chaque groupe expérimental pour terminer la tâche pour les sessions 4-12 de la tâche SOL.

e. Restriction calorique : Différences de poids

L'ANOVA menée sur le poids des souris au cours des 12 sessions du SOL, n'a montré aucun effet principal significatif de la session ($F(11,154) = 1.27, p = .248$) ou du groupe ($F(1,14) = 0.300, p = .593$), mais une interaction groupe*session significative ($F(11,154) = 1.97, p = .035, \eta^2 = .123$), laquelle n'a pas été confirmée par les analyses post-hoc (toutes les $p > 0,05$). En revanche, lors de l'analyse des différences possibles dans le pourcentage de poids, il y avait un effet principal significatif du groupe ($F(1,14) = 9.66, p = .008, \eta^2 = .408$) et également une interaction significative session*groupe ($F(11,154) = 1.98, p = .034, \eta^2 = .124$; Graphique 6), mais pas d'effet principal de la variable intragroupe « session » ($F(11,154) = 1.41, p = .175$). La différence entre les deux groupes a été confirmée par l'analyse post-hoc de Tukey ($p = .008$), le groupe DARK pesant plus que le groupe LIGHT. Malgré cela, le tableau des moyennes marginales a montré une différence de seulement 1,8 g entre les deux groupes (LIGHT : $M = 86.0, SE = 0.414, 95\% CI [85.1, 86.8]$; DARK : $M = 87.8, SE = 0.414, 95\% CI [86.9, 88.7]$).

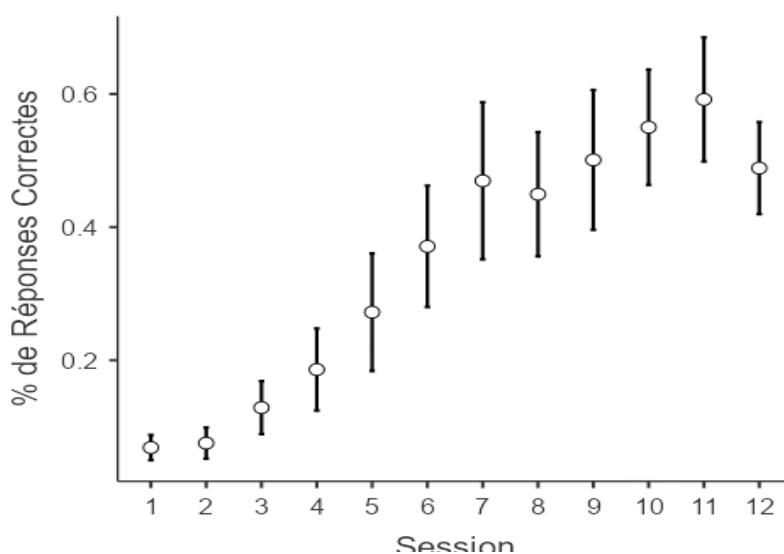


Graphique 6 : Le pourcentage de poids corporel pour chaque groupe expérimental (LIGHT = en orange ; DARK = en bleu) pour les 12 sessions SOL.

- *Reversal Learning (RV)*

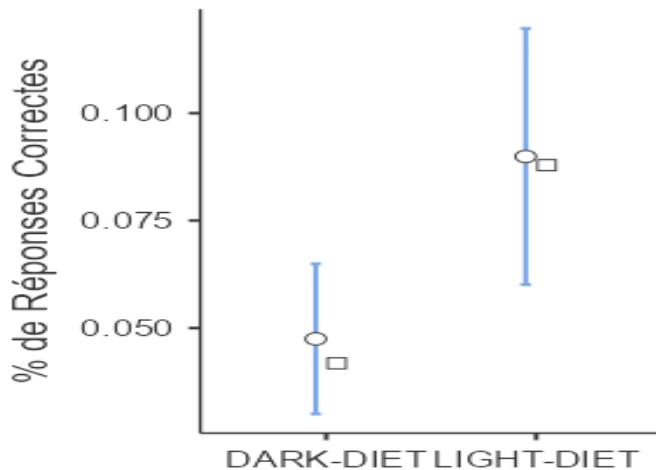
a. Pourcentage de réponses correctes

L'ANOVA mixte sur le pourcentage de réponses correctes pour les 12 sessions du RV a montré un effet principal de la session ($F(4.93,69.03) = 58.06, p < .001, \eta^2 = .806$; Graphique 7), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.76, p = .119$) ni une interaction session*groupe ($F(4.93,69.03) = 2.05, p = .083$). Considérant que par rapport au SOL, la règle de la séquence correcte pour obtenir une récompense a changé (de gauche-droite à droite-gauche), j'ai décidé d'analyser les données de la première session RV pour explorer d'éventuelles différences entre les deux groupes expérimentaux sur l'adaptation initiale à la nouvelle règle. Le test T de Student pour des échantillons indépendants a montré un effet significatif du groupe ($t(14) = -2.41, p = .030, d = -1.20$) avec un pourcentage plus élevé de réponses correctes



Graphique 7 : Le pourcentage de réponses correctes pour les 12 sessions RV.

pour les rongeurs testés pendant leur phase de repos par rapport à ceux testés pendant leur phase active (Graphique 8), une différence qui s'est immédiatement atténuée après cette première session (effet inter-sujet de l'ANOVA mixte sur les deux premières séances : $F(1,14) = 2.80, p = .116$).

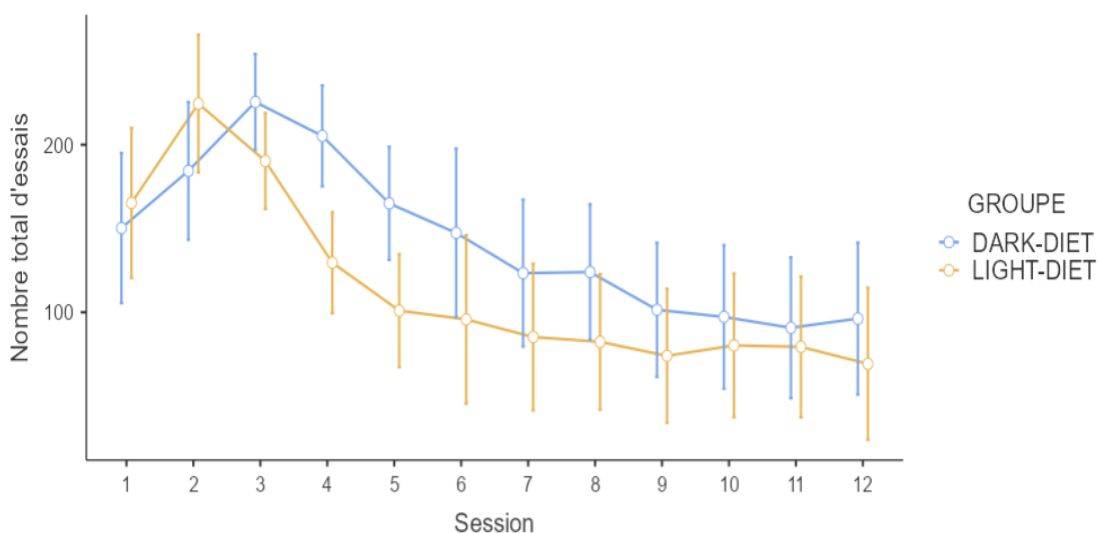


Graphique 8 : Pourcentage de réponses correctes pour les deux groupes expérimentaux lors de la première session du RV.

Remarque : il s'agit d'un graphique des moyennes marginales présentant les valeurs moyennes avec des barres d'erreur représentant les intervalles de confiance (IC) à 95% ; les deux carrés représentent les valeurs médianes.

b. Nombre total d'essais

L'ANOVA réalisée sur le nombre total d'essais pour les 12 séances de RV a révélé un effet principal significatif de la session ($F(5,70.06) = 19.74, p < .001, \eta^2 = .585$) et aucun effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.33, p = .149$). Concernant l'interaction session*groupe (Graphique 9) les résultats sont contradictoires. Lors de l'analyse des données en utilisant la correction de sphéricité de Huynh-Feldt, l'effet d'interaction est significatif ($p = .043$), mais lors de l'utilisation d'une correction plus sévère telle que Greenhouse-Geisser, l'effet d'interaction disparaît ($p = .065$). De plus, le test t de Student n'a montré aucune différence entre les deux groupes lors de la première session ($t(14) = -0.509, p = .619$).



Graphique 9 : Le nombre total d'essais pour chaque groupe sur les 12 sessions de RV.

c. Types de séquences

c.1. Droite- Gauche (séquence correcte)

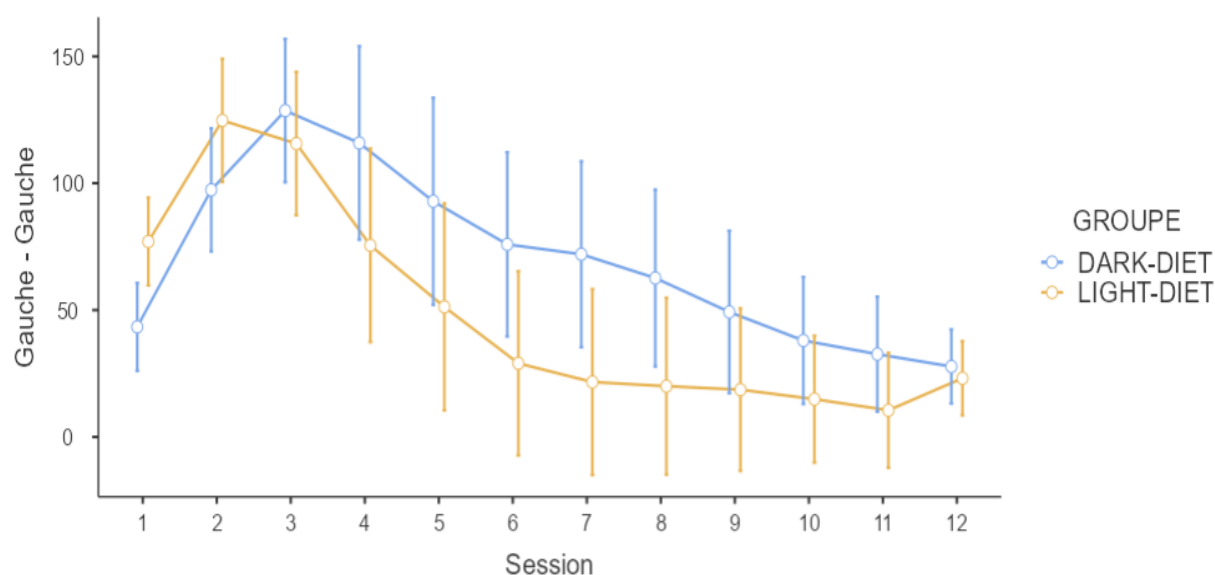
Encore une fois, comme pour la tâche de SOL, seules les cinq premières séances ont été analysées, en raison d'un effet plateau sur le reste des séances. L'ANOVA pour les cinq sessions, a révélé un effet principal significatif de la session ($F(2.14,30.01) = 23.36, p < .001, \eta^2 = .625$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 2.80, p = .116$) ni une interaction session*groupe ($F(2.14,30.01) = 1.07, p = .361$).

c.2. Gauche – Droite

L'ANOVA menée pour les 12 sessions, a révélé un effet principal de la session ($F(33.751,775) = 33.751, p < .001, \eta^2 = .707$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.224, p = .643$) ni une interaction session*groupe ($F(33.751,775) = 0.694, p = .612$).

c.3. Gauche – Gauche

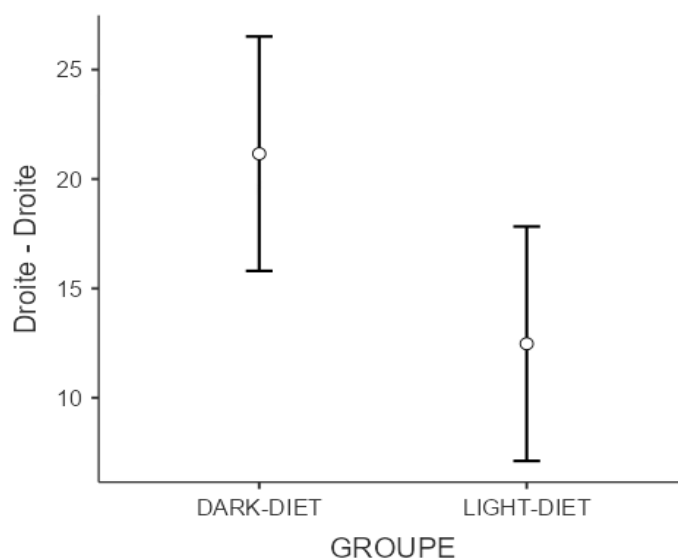
Les analyses statistiques sur les séquences gauche-gauche ont révélé un effet principal significatif de la session ($F(3.15,44.06) = 26.30, p < .001, \eta^2 = .653$) et une interaction significative session*groupe ($F(3.15,44.06) = 4.35, p = .008, \eta^2 = .237$; Graphique 10), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 1.90, p = .190$).



Graphique 10 : Les séquences gauche-gauche des deux groupes expérimentaux (LIGHT = orange ; DARK = bleu) pour les 12 sessions RV.

c.4. Droite – Droite

L'ANOVA mixte sur les 12 sessions du RV a montré un effet principal significatif de la session ($F(1.76,24.61) = 16.16, p < .001, \eta^2 = .536$) et un effet principal significatif du groupe ($F(1,14) = 6.05, p = .028, \eta^2 = .302$), mais pas d'interaction session*groupe ($F(1.76,24.61) = 1.92, p = .172$). L'analyse post-hoc de Tukey a confirmé la différence entre les deux groupes ($p = .028$) avec le groupe DARK effectuant plus de séquences droite-droite par rapport au groupe LIGHT (Graphique 11).



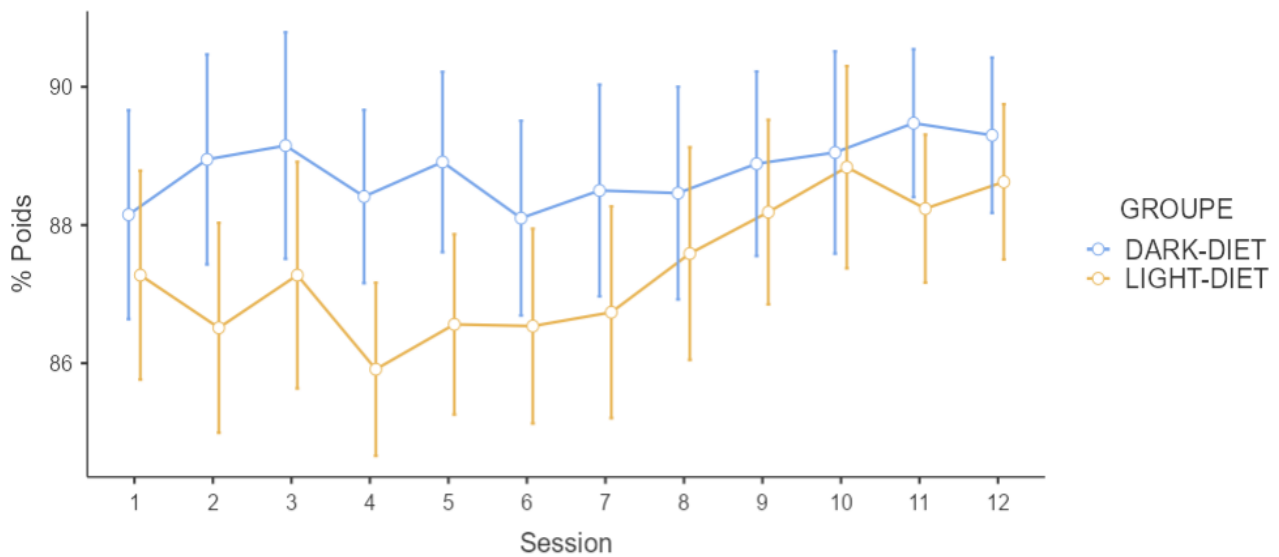
Graphique 11 : Les séquences droit - droit de chacun des groupes expérimentaux pendant toute la durée de la tâche.

d. Temps mis pour terminer la tâche

Encore une fois, pour cette mesure comportementale, les trois premières séances n'ont pas été analysées. Les analyses statistiques ont révélé un effet principal de la session ($F(3.32,46.49) = 11.12, p < .001, \eta^2 = .443$), mais pas d'effet de groupe ($F(1,14) = 0.447, p = .515$), ni une interaction groupe*session ($F(3.32,46.49) = 1.86, p = .144$).

e. Restriction calorique : Différences de poids

L'ANOVA réalisée sur le poids des souris lors des 12 sessions du RV, a montré un effet principal significatif de la session ($F(11,154) = 4.81, p < .001, \eta^2 = .021$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.590, p = .455$), ou une interaction groupe*session ($F(11,154) = 1.71, p = .075$). Cependant, lors de l'analyse des effets possibles dans le pourcentage de poids, les statistiques ont encore montré un effet principal significatif de la session ($F(11,154) = 5.18, p < .001, \eta^2 = .270$) mais aussi une interaction significative groupe*session ($F(11,154) = 1.95, p = .037, \eta^2 = .122$; Graphique 12). Encore, l'ANOVA n'a pas montré un effet principal de la variable "groupe" ($F(1,14) = 3.52, p = .082$).

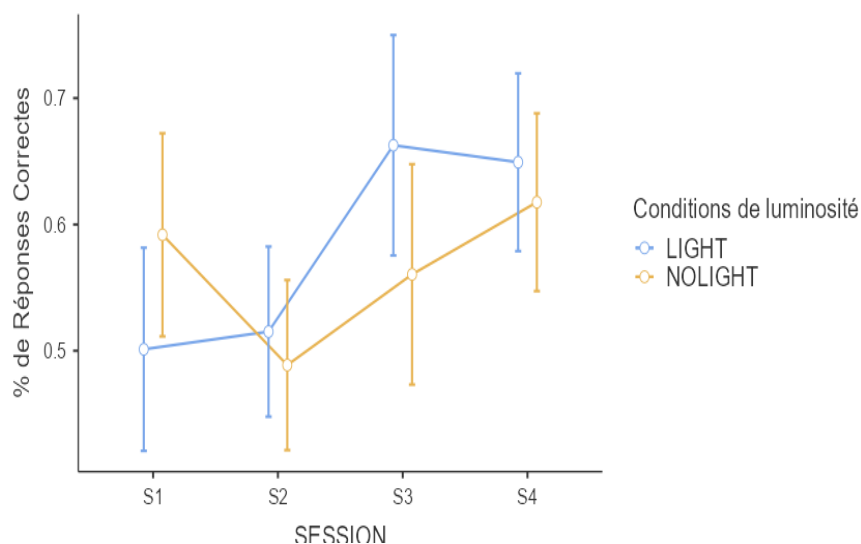


Graphique 12 : Le pourcentage de poids pour les deux groupes expérimentaux au cours des 12 séances du RV.

- *Conditions de luminosité*

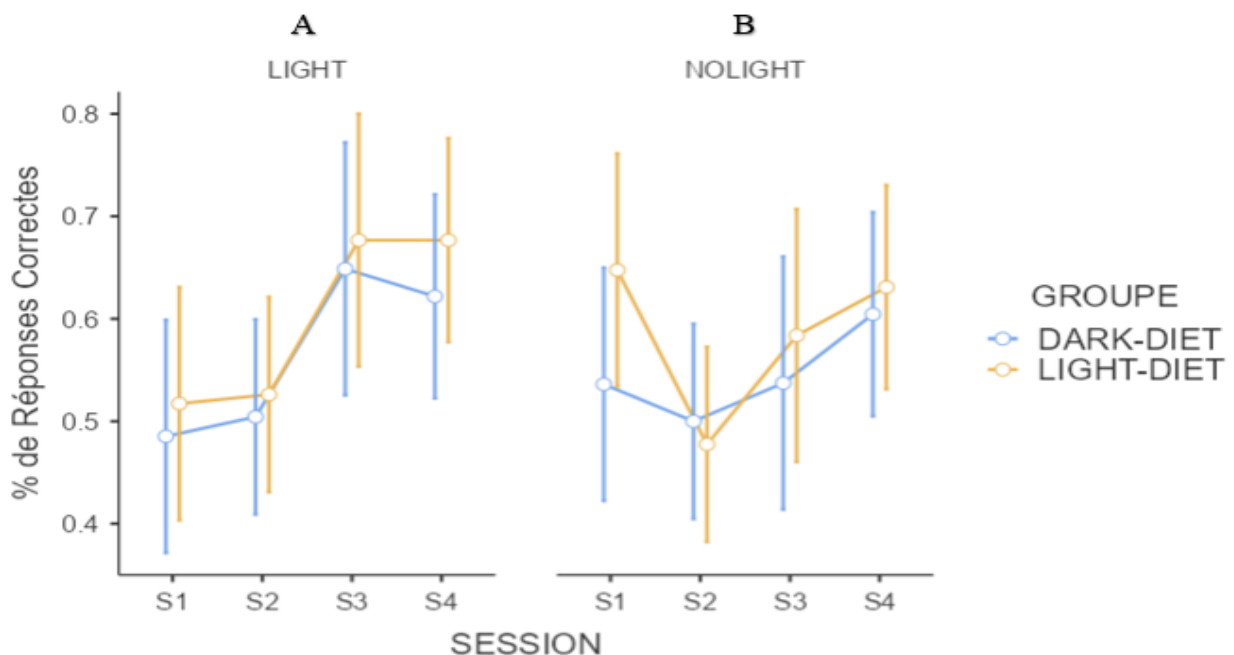
a. Pourcentage de réponses correctes

L'ANOVA menée sur les sessions de test (quatre sessions à la lumière et quatre sessions dans l'obscurité) a montré un effet principal significatif de la session ($F(1,91,53.55) = 10.275, p < .001, \eta^2 = .268$), mais pas d'effet principal des conditions de luminosité ($F(1,28) = 0.17379, p = .680$) ni du groupe ($F(1,28) = 0.79569, p = .380$). Concernant les interactions, le seul effet significatif a été trouvé dans l'interaction **session*conditions lumineuses** ($F(1,91,53.55) = 4.514, p = .017, \eta^2 = .139$; Graphique 13), tandis que les interactions suivantes n'étaient pas significatives : session*groupe ($p = .537$), conditions lumineuses*session*groupe ($p = .574$) et conditions lumineuses*groupe ($p = .940$).



Graphique 13 : Le pourcentage de réponses correctes au cours des 4 sessions de RV pour chaque condition de luminosité (LIGHT = lumières allumées; NOLIGHT = obscurité)

En observant ce graphique, une diminution du pourcentage de réponses correctes peut être remarquée dans la session deux, en particulier la 2ème session de la condition NOLIGHT (qui était la 12ème session de la précédente tâche de Reversal Learning (RV)). Les analyses post-hoc de Tukey ont montré une différence significative entre la 2ème et 3ème session ($p = .002$) et la 2ème et 4ème session ($p < .001$). En observant le *Graphique 14 A* (juste en dessous), on peut voir qu'en condition LIGHT (lumières allumées) les deux groupes montrent une performance plutôt stable lors des premières sessions puis augmentent progressivement leurs performances. Cependant, dans la condition NOLIGHT (Graphique 14 B), le groupe DARK semble montrer une légère diminution des performances entre les sessions 1 ($M = 0.536$, $ES = 0.0555$, $95\% IC [0.422, 0.650]$) et 2 ($M = 0.500$, $ES = 0.0465$, $95\% IC [0.405, 0.595]$), puis la performance augmente progressivement dans les séances 3 ($M = 0.537$, $ES = 0.0602$, $95\% IC [0.414, 0.661]$) et 4 ($M = 0.604$, $ES = 0.0486$, $95\% IC [0.5505, 0.704]$). Concernant le groupe LIGHT, on peut remarquer que les performances diminuent fortement entre la 1ère ($M = 0.648$, $ES = 0.0555$, $95\% IC [0.534, 0.761]$) et la 2ème session ($M = 0.477$, $ES = 0.0465$, $95\% IC [0.382, 0.573]$), puis augmente assez rapidement lors des deux dernières séances (session 3 : $M = 0.584$, $ES = 0.0602$, $95\% CI [0.460, 0.707]$; session 4 : $M = 0.631$, $ES = 0.0486$, $95\% CI [0.531, 0.730]$).



Graphique 14 : *A*. Le pourcentage de réponses correctes pour les deux groupes expérimentaux (LIGHT = orange ; DARK = bleu) au cours des 4 sessions de la condition LIGHT; *B*. Le pourcentage de réponses correctes pour les deux groupes expérimentaux pendant les 4 sessions de la condition NOLIGHT.

En analysant uniquement les deux premières sessions de cette tâche pour explorer les effets initiaux possibles du changement des conditions lumineuses, tous les effets intra-sujet étaient significatifs sauf l'interaction *session * conditions lumineuses * groupe* ($p = .087$).

- Effet principal de la **session** : $F(1,28) = 6.51, p = .016, \eta^2 = .189$
- Interaction **session*conditions lumineuses** : $F(1,28) = 11.23, p = .002, \eta^2 = .286$
- Interaction **session*groupe** : $F(1,28) = 4.25, p = .049, \eta^2 = .132$

Tous les effets inter-groupes n'étaient pas significatifs :

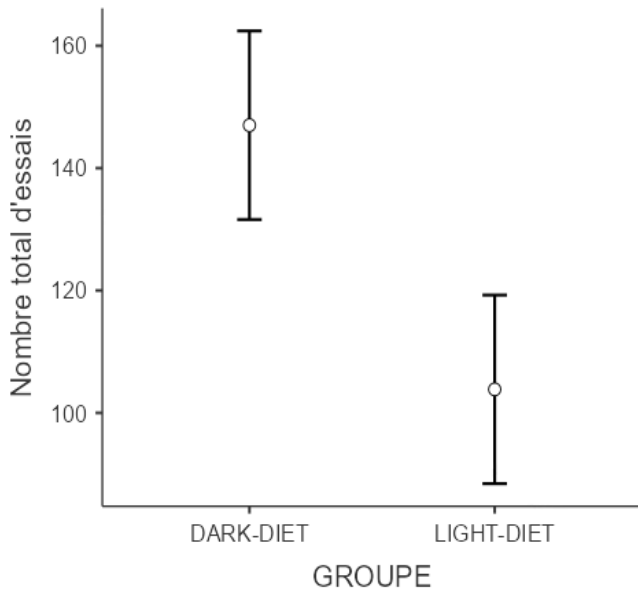
- **Conditions de luminosité** : $F(1,28) = 0.4442, p = .511$
- **Groupe** : $F(1,28) = 0.5496, p = .465$
- **Conditions lumineuses*Groupe** : $F(1,28) = 0.0337, p = .856$

Les tests post-hoc ont révélé une différence significative entre les sessions de la condition NOLIGHT ($p = .001$), les rongeurs ayant un pourcentage de réponses correctes plus faible lors de la deuxième session NOLIGHT par rapport à la première. Il a été aussi montré que le groupe LIGHT avait une performance inférieure à la deuxième session par rapport à la première session ($p = .015$). Ces résultats ont donc confirmé nos premières observations : le groupe LIGHT a réduit significativement ses performances dans la session deux de la condition NOLIGHT par rapport à la première session de la même condition lumineuse.

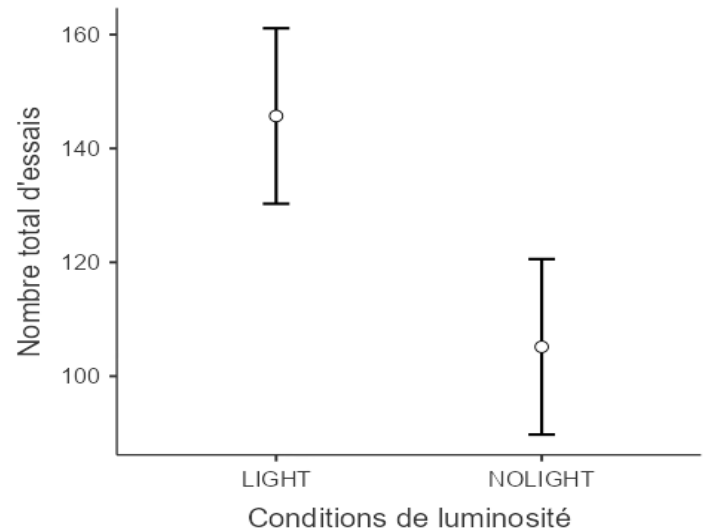
b. Nombre total d'essais

L'analyse statistique sur les quatre séances a montré un effet principal significatif du groupe ($F(1,28) = 16.459, p < .001, \eta^2 = .370$), un effet principal significatif des conditions de luminosité ($F(1,28) = 14.519, p < .001, \eta^2 = .341$), mais pas d'effet principal de la session ($F(1.65,46.16) = 2.870, p = .076$). L'interaction *session*conditions lumineuses* était également significative ($F(1.65,46.16) = 24.531, p < .001, \eta^2 = 0.467$), mais il n'y avait pas d'effet significatif pour les trois autres interactions : *session*groupe* ($p = .744$) ; *session*groupe*conditions lumineuses* ($p = .191$) ; *conditions lumineuses*groupe* ($p = .677$). L'analyse post-hoc a montré que le groupe DARK a réalisé un nombre global d'essais plus élevé que le groupe LIGHT ($p < .001$; Graphique 15), et que plus d'essais ont été effectués pendant la condition LIGHT par rapport à la condition NOLIGHT ($p < .001$; Graphique 16). Le *graphique 17* sur l'interaction *session*conditions lumineuses* montre une grande différence entre les deux conditions lumineuses lors des deux premières sessions, avec plus d'essais effectués pendant la condition LIGHT, puis la tendance s'inverse avec la condition NOLIGHT

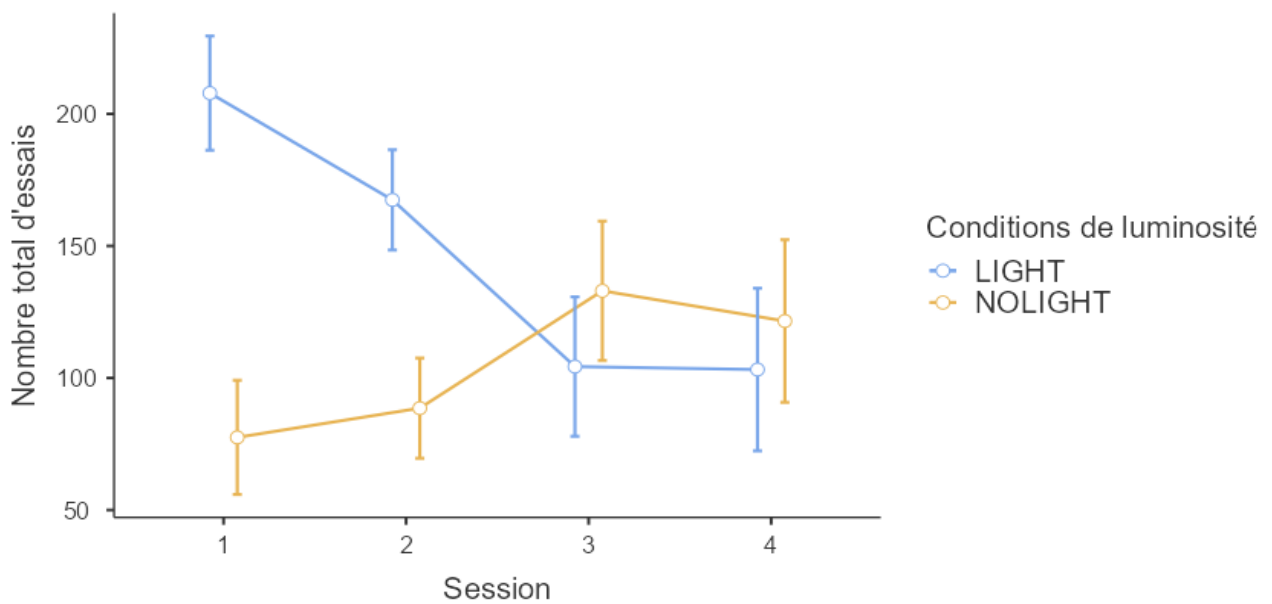
ayant un plus grand nombre d'essais, mais cette différence semble être moindre lors des deux dernières sessions. Les moyennes, l'erreur standard et les valeurs inférieures et supérieures de l'intervalle de confiance à 95% se trouvent dans *le tableau 1*.



Graphique 15 : Le nombre total d'essais pour chaque groupe expérimental.



Graphique 16 : Le nombre total d'essais pour chaque condition lumineuse.



Graphique 17 : Le nombre total d'essais pour les deux conditions lumineuses (LIGHT = bleu ; NOLIGHT = orange) pour chacune des 4 sessions du RV.

Tableau 1 : Un tableau récapitulatif de la moyenne (means), de l'erreur standard (standard error ; SE) et des valeurs inférieures (Lower) et supérieures (Upper) dans un intervalle de confiance de 95% au cours de chaque session de la tâche pour les conditions expérimentales LIGHT et NOLIGHT.

LIGHTS	Session	Mean	SE	95% Confidence Interval	
				Lower	Upper
LIGHT	1	207.9	10.56	186.2	229.5
	2	167.4	9.27	148.5	186.4
	3	104.3	12.88	77.9	130.7
	4	103.2	15.03	72.4	134.0
NOLIGHT	1	77.5	10.56	55.9	99.1
	2	88.6	9.27	69.6	107.5
	3	133.0	12.88	106.6	159.4
	4	121.6	15.03	90.8	152.4

c. Types de séquences

c.1. Droite- Gauche (séquence correcte)

Pour cette tâche, le nombre de séquences correctes n'a pas été analysé car au moment où cette tâche a été administrée, presque tous les rongeurs atteignaient constamment les 40 renforçateurs.

c.2. Gauche – Droite

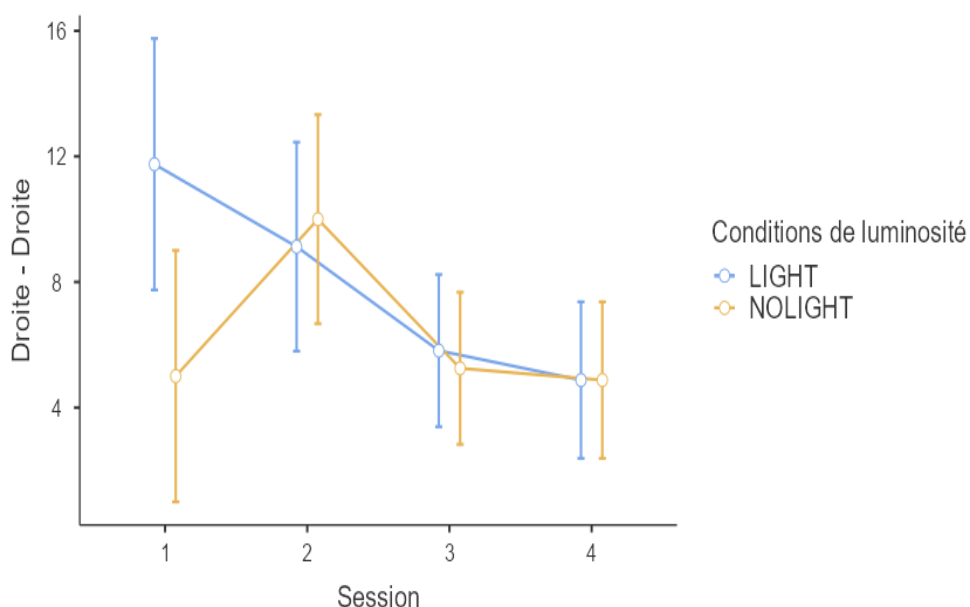
L'ANOVA menée sur l'effet du groupe et des conditions de luminosité pour les quatre sessions, a révélé un effet principal significatif de la session ($F(1.45,40.74) = 3.9040, p = .040, \eta^2 = .122$), mais aucun autre effet significatif : groupe ($p = .311$); conditions lumineuses ($p = .678$); groupe*session ($p = .422$), conditions lumineuses*session ($p = .893$) ; groupe*conditions lumineuses*session ($p = .497$) ; groupe*conditions lumineuses ($p = .436$). Cet effet principal de la session n'a pas été confirmé par l'analyse post-hoc de Tukey, avec toutes les valeurs de p étant supérieures à 0,05.

c.3. Gauche – Gauche

L'analyse n'a révélé aucun effet significatif : session ($p = .090$) ; session*conditions lumineuses ($p = .357$) ; session*groupe ($p = .350$) ; session*conditions lumineuses*groupe ($p = .254$) ; conditions lumineuses ($p = .301$); groupe ($p = .435$); et groupe*conditions lumineuses ($p = .538$).

c.4. Droite – Droite

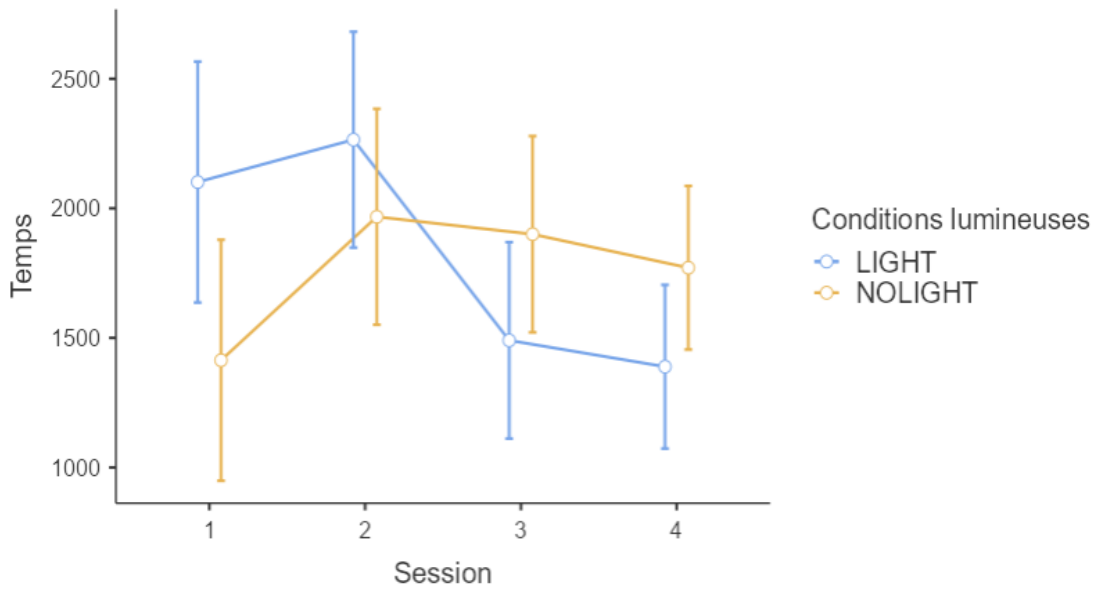
L'ANOVA mixte pour les quatre sessions a montré un effet principal significatif de la session ($F(2.18,61.04) = 7.6514, p < .001, \eta^2 = .215$) et une interaction significative session*conditions lumineuses ($F(2.18,61.04) = 4.5964, p = .012, \eta^2 = 0.141$), mais pas d'autres effets significatifs : session*groupe ($p = .943$; session*conditions lumineuses*groupe ($p = .839$) ; conditions lumineuses ($p = .336$) ; groupe ($p = .873$) ; et groupe*conditions lumineuses ($p = .858$). Le *graphique 18* indique une diminution progressive de ce type d'erreur dans la condition LIGHT, mais dans la condition NOLIGHT cette erreur double de la session 1 ($M = 5.00, ES = 1.96, 95\% IC[0.995, 9.00]$) à la session 2 ($M = 10.00, ES = 1.63, 95\% IC[6.670, 13.33]$) puis cette séquence commence à diminuer aux sessions 3 ($M = 5.25, ES = 1.18, 95\% IC[2.825, 7.68]$) et 4 ($M = 4.88, ES = 1.22, 95\% IC[2.382, 7.37]$).



Graphique 18 : Le nombre de séquences droit - droit pendant les quatre séances pour chacune des conditions lumineuses.

d. Temps mis pour terminer la tâche

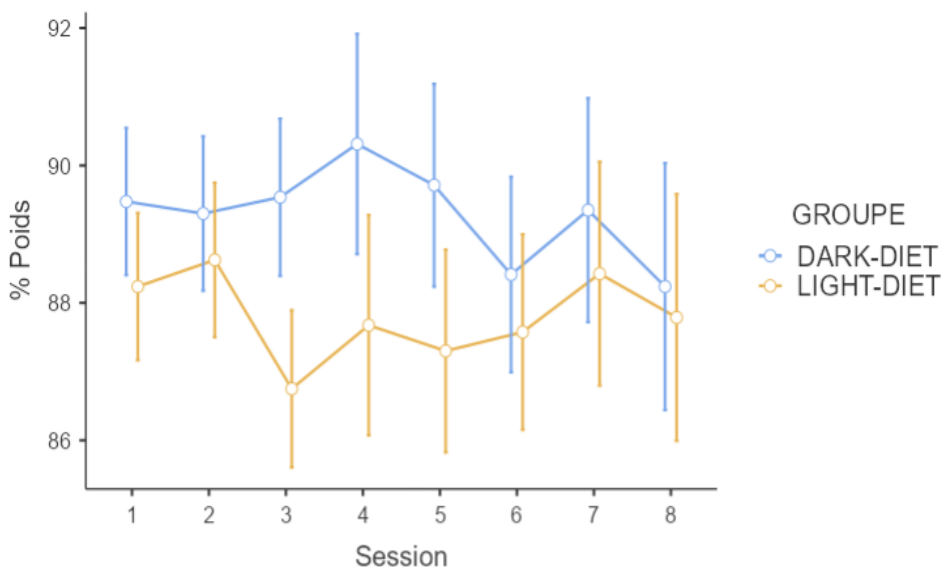
Les analyses statistiques ont révélé un effet principal significatif de la session ($F(1.67,46.80) = 4.49, p = .022, \eta^2 = .138$) et une interaction significative session*conditions lumineuses ($F(1.67,46.80) = 6.05, p = .007, \eta^2 = .178$; Graphique 19), mais pas d'autres effets significatifs : session*groupe ($p = .119$) ; session*conditions lumineuses*groupe ($p = .214$) ; conditions lumineuses ($p = .120$) ; groupe ($p = .809$) ; et groupe*conditions lumineuses ($p = .650$).



Graphique 19 : Le temps prise pour terminer la tâche pour les rongeurs dans chacune des conditions lumineuses (LIGHT = bleu ; NOLIGHT = orange).

e. Restriction calorique : Différences de poids

Les résultats statistiques sur le poids des souris au cours des huit sessions de cette tâche (quatre lumières éteintes et quatre lumières allumées), n'ont révélé aucun effet principal de la session ($F(7,98) = 1.70, p = .119$) ou du groupe ($F(1,14) = 0.443, p = .517$), mais une interaction groupe*session significative ($F(7,98) = 2.23, p = .038, \eta^2 = .137$). Les analyses du pourcentage de poids, ont montré le même pattern de résultats avec encore une fois aucun effet principal de la session ($F(7,89) = 1.85, p = .087$) ou de groupe ($F(1,14) = 4.25, p = .058$), et une interaction significative groupe*session ($F(7,89) = 2.21, p = .040, \eta^2 = .136$; Graphique 20). Les analyses post-hoc pour l'interaction groupe*session n'ont montré qu'une seule différence significative : une différence entre les sessions quatre et huit pour le groupe DARK ($p = .036$).



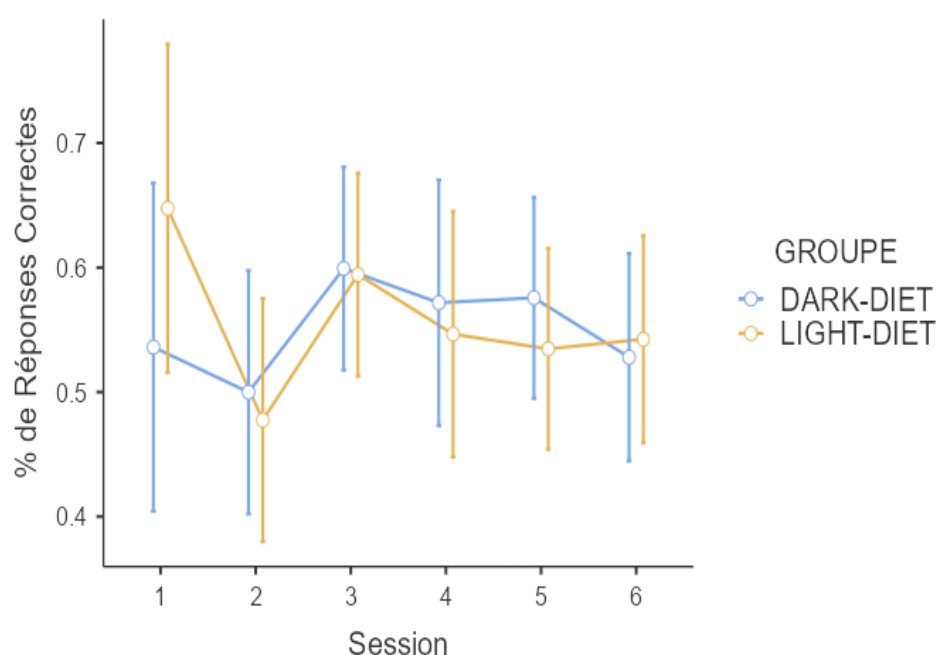
Graphique 20 : Le pourcentage de poids pour les deux groupes expérimentaux au cours des huit séances (session 1,2,5 et 6 = NOLIGHT; session 3,4,7 et 8 = LIGHT).

- *Changements de régime alimentaire*

Pour cette partie de l'étude, une ANOVA mixte est utilisée pour explorer les effets de la variable indépendante "groupe" sur chaque mesure comportementale. Les mesures répétées sont les suivantes : les deux dernières sessions du Reversal Learning (de la deuxième partie de l'étude), deux sessions où les rongeurs sont à 95% de leur poids corporel, et deux sessions où les rongeurs sont nourris ad libitum. Ainsi, *l'effet principal de la session* représente **les effets des changements de régime** sur les performances des souris.

a. Pourcentage de réponses correctes

Les résultats statistiques n'ont pas révélé un effet principal de la session ($F(3.54,49.52) = 1.792$, $p = .152$), ou un effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.0248$, $p = .877$), ni une interaction significative session*groupe ($F(3.54,49.52) = 0.868$, $p = .479$; Graphique 21).



Graphique 21 : Le pourcentage de réponses correctes pour les deux groupes expérimentaux (LIGHT = orange; DARK = bleu) pour chaque session des changements du régime alimentaire. Les deux premières sessions représentent les deux dernières sessions de RV (au cours desquelles les rongeurs étaient en restriction calorique). Lors des sessions 3 et 4, les souris étaient à 95% de leur poids corporel. Lors des deux dernières sessions, les animaux avaient un accès illimité à la nourriture.

b. Nombre total d'appuis sur le levier

Encore une fois, pour cette mesure comportementale, il n'y avait pas d'effet principal de session ($F(1.65,23.10) = 2.19$, $p = .142$), pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.00948$, $p = .924$), et pas d'interaction session*groupe ($F(1.65,23.10) = 2.03$, $p = .159$).

c. Types de séquences

c.1. Droite- Gauche (séquence correcte)

Pour cette tâche, le nombre de séquences correctes n'a pas été analysé car au moment où cette tâche a été administrée, presque tous les rongeurs obtenaient constamment les 40 renforçateurs.

c.2. Gauche – Droite

Pour le nombre de séquences gauche-droite, il n'y avait pas d'effet principal de la session ($F(1,42,18.44) = 2.18, p = .151$), pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.00712, p = .934$), et aucune interaction session*groupe ($F(1,42,18.44) = 1.23, p = .301$).

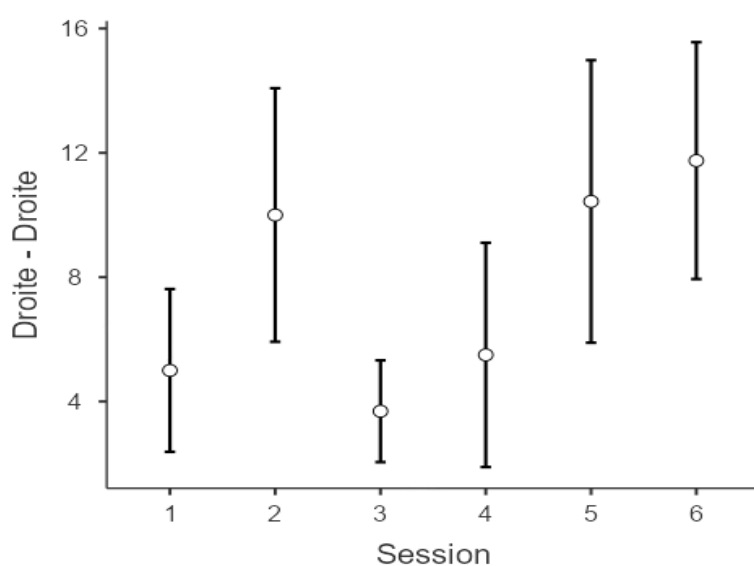
c.3. Gauche – Gauche

L'ANOVA mixte sur les 6 sessions n'a trouvé aucun effet principal de la session ($F(1,69,23.64) = 1.33, p = 0.279$), aucun effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.667, p = .428$), et aucune interaction session*groupe ($F(1,69,23.64) = 1.52, p = .238$).

c.4. Droite – Droite

L'analyse a montré un effet principal significatif de la session ($F(5,70) = 6.610, p < .001, \eta^2 = .321$; Graphique 22), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.335, p = .572$), et aucune interaction session*groupe ($F(5,70) = 0.414, p = .837$). Les analyses post hoc de Tukey sur la différence entre les sessions ont montré les différences significatives suivantes :

- Session 1 et 6 ($p = .037$)
- Session 2 et 3 ($p = .028$)
- Session 3 et 5 ($p = .034$)
- Session 3 et 6 ($p = .001$)



Graphique 22 : Les séquences droite-droite pour chaque session des changements du régime.

d. Temps mis pour terminer la tâche

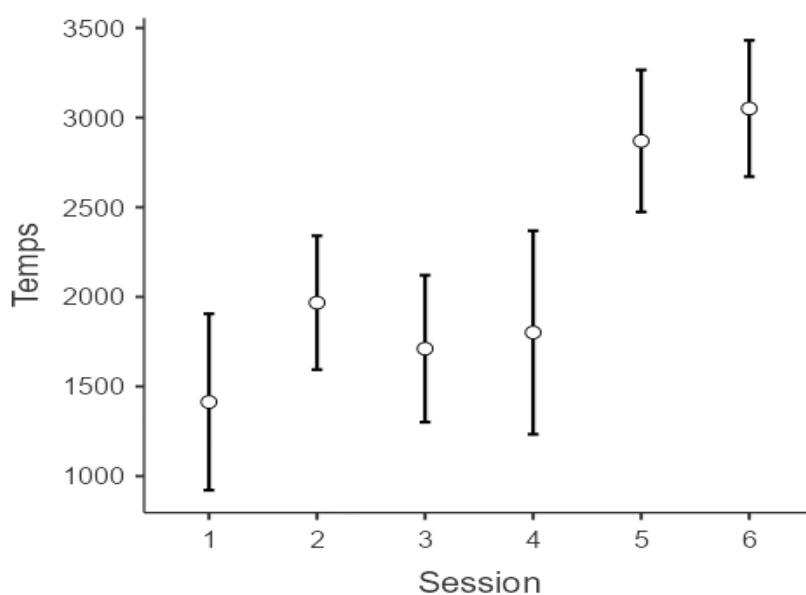
L'analyse sur le temps mis par les rongeurs pour terminer la tâche a montré un effet principal significatif de session ($F(2.68,37.51) = 10.83, p < .001, \eta^2 = .436$; Graphique 23), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,14) = 0.760, p = .398$), et aucune interaction session*groupe ($F(2.68,37.51) = 1.35, p = .272$). Les analyses post hoc de Tukey sur la différence entre les sessions ont montré les différences significatives suivantes :

- Session 1 et 2 ($p = .025$)
- Session 1 et 5 ($p = .007$)
- Session 1 et 6 ($p = .002$)
- Session 2 et 6 ($p = .024$)
- Session 3 et 5 ($p < .001$)
- Session 3 et 6 ($p = .001$)
- Session 4 et 5 ($p = .001$)
- Session 4 et 6 ($p = .009$)

Comme nous pouvons le voir, la plupart de ces différences se situent entre toutes les autres sessions et **les deux sessions** où les rongeurs sont nourris **ad libitum**, au cours desquelles ils prennent plus de temps pour terminer la tâche par rapport aux autres sessions/conditions expérimentales liées à l'alimentation.

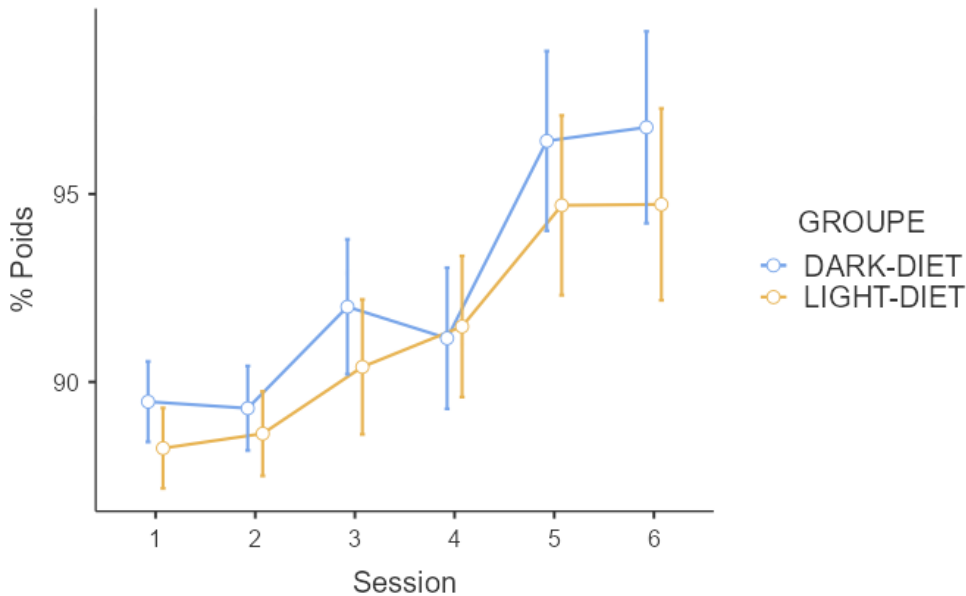
e. Restriction calorique : Différences de poids

Les résultats statistiques sur le poids des souris au cours des six sessions de cette tâche (deux sessions en restriction calorique, deux sessions à 95% de leur poids corporel, et deux sessions avec alimentation ad libitum), ont révélé un effet principal significatif de la session ($F(5,70) = 35.225, p < .001, \eta^2 = .716$; le poids augmentant progressivement), mais pas d'effet du groupe ($F(1,14) = 0.703, p = .416$) ou de l'interaction groupe*session ($F(5,70) = 0.697, p = .627$). Ces



Graphique 23 : Le temps nécessaire pour terminer chaque session des changements alimentaires.

résultats ont été confirmés lors de l'analyse du pourcentage de poids, montrant à nouveau un effet significatif de la session ($F(5,70) = 34.168, p < .001, \eta^2 = .709$), mais aucun effet du groupe ($F(1,14) = 2.12, p = .167$) ou d'interaction groupe*session ($F(5,70) = 0.674, p = .645$; Graphique 24). Le pourcentage de poids a augmenté progressivement au cours des sessions pour les deux groupes, montrant ainsi que cette tâche a été correctement menée (avec l'augmentation de l'accès à la nourriture, le poids a augmenté de manière similaire dans les deux groupes).



Graphique 24 : Le pourcentage de poids de chaque groupe pendant les 6 sessions de la tâche.

Expérience 2

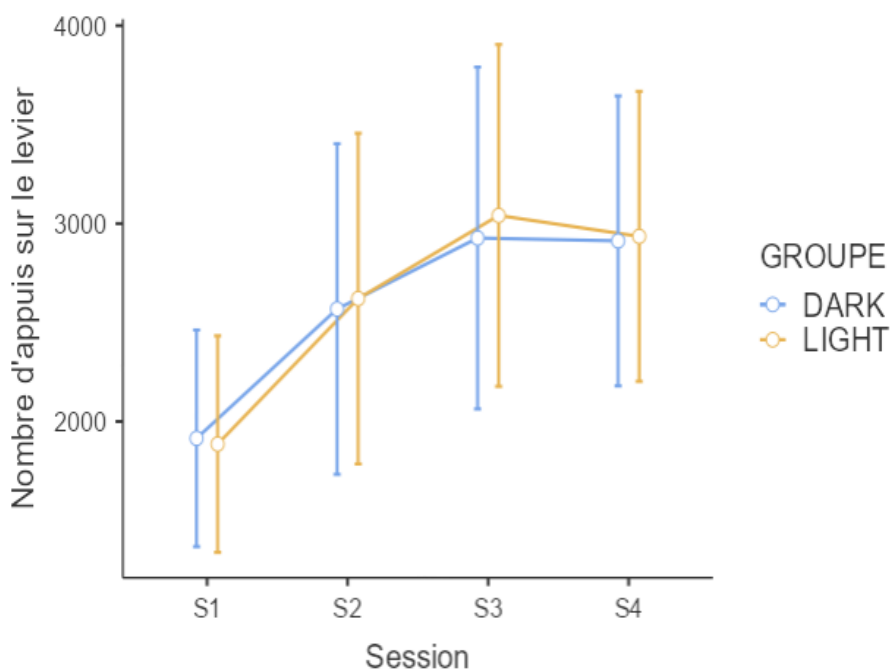
- Shaping

Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis mené sur le nombre total d'essais (nombre total d'appuis sur le levier pendant le Shaping) n'a montré aucun effet de groupe ($\chi^2(1) = 1.22, p = .270$). Aussi, l'ANOVA simple menée sur le taux de réponse pour la première session de Shaping n'a montré aucun effet de groupe ($F(1,28.6) = 1.94, p = .174$). Enfin, le test U de Mann-Whitney effectué sur le nombre total d'appuis sur le levier pour la première séance de Shaping n'a montré aucune différence entre les deux groupes expérimentaux ($U(34) = 130; p = .228$). Tous les tests ne signalent donc aucune différence de performance pendant le Shaping entre les rongeurs testés pendant leur phase de repos et ceux testés pendant leur phase active.

- PR

a. Appuis sur le levier

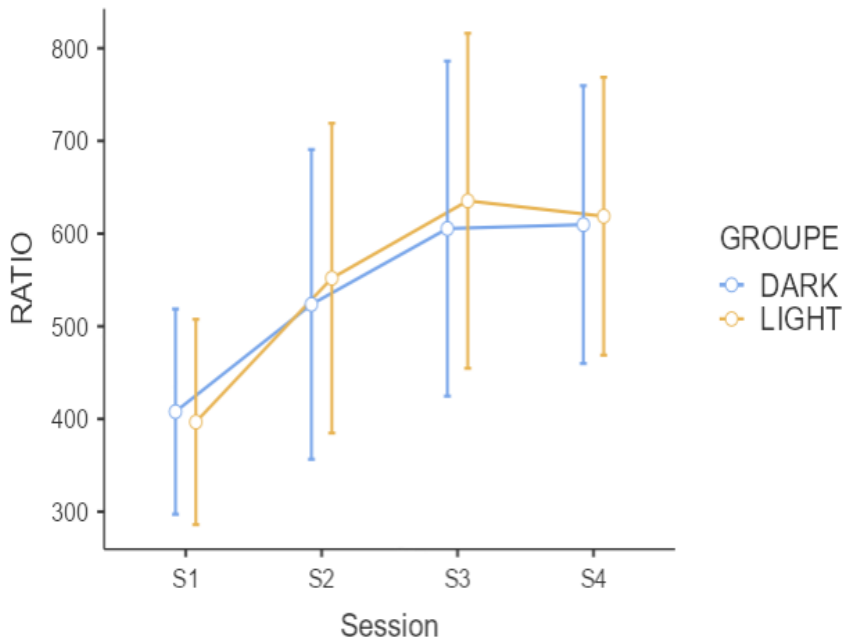
L'ANOVA mixte sur le nombre d'appuis sur le levier au cours des quatre séances du PR a montré un effet principal significatif de la session ($F(2.13,72.44) = 11.7658, p < .001, \eta p^2 = .257$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,34) = 0.00757, p = .931$), ni une interaction groupe*session ($F(2.13,72.44) = 0.0425, p = .965$; Graphique 25). De plus, le test U de Mann-Whitney effectué pour la première session de PR n'a également montré aucune différence entre les deux groupes ($U(34) = 151; p = .743$).



Graphique 25 : Le nombre d'appuis sur le levier au cours des quatre sessions du PR pour les souris testées pendant leur phase de repos (LIGHT = orange) et les rongeurs testés pendant leur phase active (DARK = bleu).

b. Breakpoint/Ratio

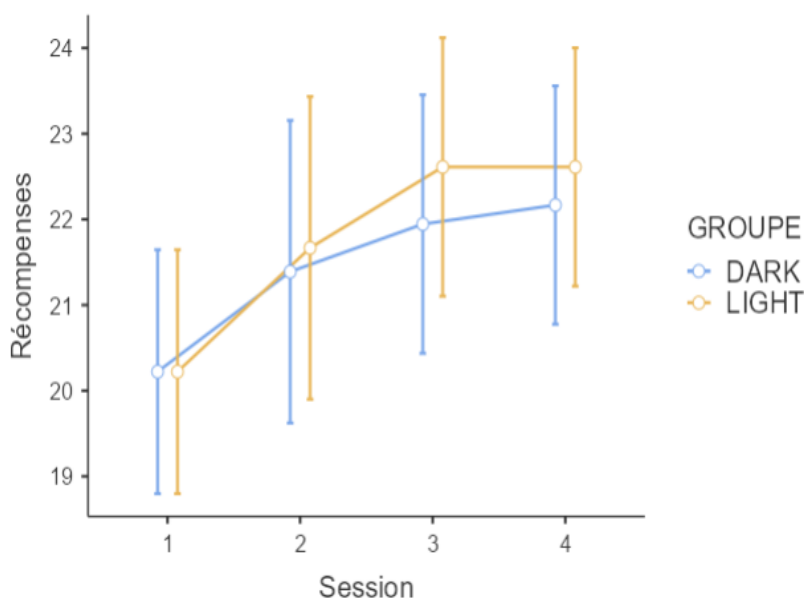
Les analyses statistiques pour les quatre séances de PR ont montré un effet principal de la session ($F(2.24,76.27) = 11.708, p < .001, \eta p^2 = .256$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,34) = 0.0221, p = .883$), ni une interaction groupe*session ($F(2.24,76.27) = 0.106, p = .919$; Graphique 26). Encore une fois, le test U de Mann-Whitney effectué pour la première séance de PR n'a également montré aucune différence entre les deux groupes ($U(34) = 150; p = .714$).



Graphique 26 : Le ratio au cours des 4 sessions PR pour les souris testées pendant leur phase de repos (LIGHT = orange) et les rongeurs testés pendant leur phase active (DARK = bleu).

c. Récompenses obtenues

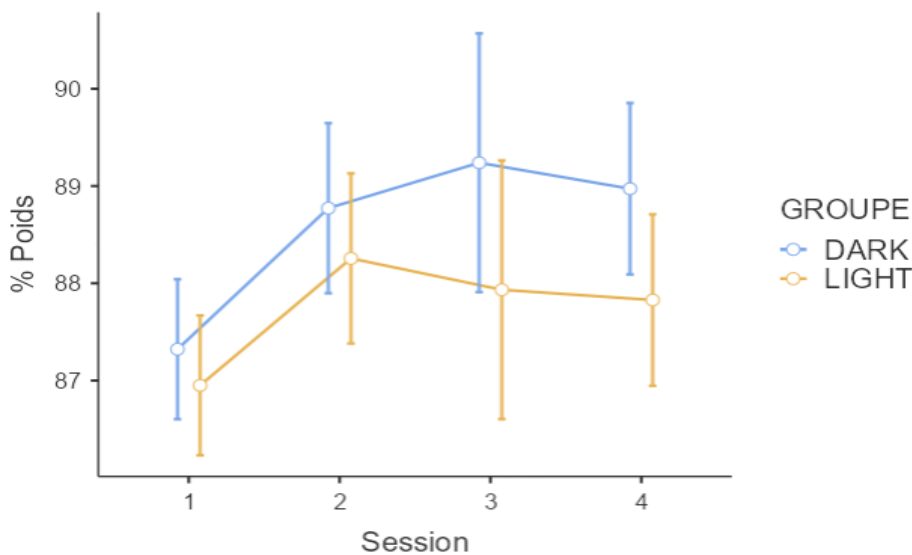
L'ANOVA sur le nombre total de renforçateurs obtenus lors des quatre séances PR a montré un effet principal de la session ($F(2.10,71.30) = 11.838, p < .001, \eta^2 = .258$), mais pas d'effet principal du groupe ($F(1,34) = 0.137, p = .714$) ni une interaction groupe*session ($F(2.10,71.30) = 0.235, p = .801$; Graphique 27). Le test t de Student pour échantillons indépendants n'a également montré aucune différence entre les deux groupes lors de la première séance de PR ($t(34) = 0.00; p = 1.000$).



Graphique 27 : Le nombre de récompenses obtenues au cours des 4 sessions PR pour les souris testées pendant leur phase de repos (LIGHT = orange) et les rongeurs testés pendant leur phase active (DARK = bleu).

d. Restriction calorique : Différences de poids

L'analyse sur le poids des souris pendant le PR a montré un effet principal de la session ($F(3,102) = 6.254, p < .001, \eta^2 = .155$), mais pas d'effet de groupe ($F(1,34) = 0.110, p = .742$) ou d'interaction groupe*session ($F(3,102) = 0.593, p = .621$). Le même pattern de résultats a été observé lors de l'analyse du pourcentage de poids, avec un effet significatif de la session ($F(3,102) = 6.087, p < .001, \eta^2 = .152$; Graphique 28), mais aucun effet du groupe ($F(1,34) = 3.02, p = .092$) ou d'interaction groupe*session ($F(3,102) = 0.682, p = .565$). Les analyses post-hoc pour les deux mesures (poids et pourcentage de poids) ont montré une différence significative entre la session 1 et chacune des autres sessions (toutes les valeurs de p étaient inférieures à 0.05).



Graphique 28 : Le pourcentage de poids de chaque groupe pendant le 4 sessions du PR.

DISCUSSION

Dans la première expérience, les effets du moment de testing sur les processus cognitifs tels que l'apprentissage d'une réponse automatisée et la flexibilité cognitive chez les souris jeunes femelles C57BL/6 ont été étudiés. En se basant sur la littérature existante, nous avons émis l'hypothèse que les rongeurs testés pendant leur phase active démontreraient une supériorité globale des capacités cognitives dans la tâche de Serial Order Learning (SOL) et de Reversal Learning (RV), particulièrement lors de la phase d'acquisition. Cependant, les analyses statistiques effectuées pour notre expérience ne semblaient pas soutenir notre hypothèse.

Les données ont révélé que le groupe LIGHT surpassait le groupe DARK lors du Shaping de la réponse opérante, le premier nécessitant moins d'essais pour atteindre le critère de réussite et montrant un taux de réponse plus élevé. Malgré l'absence de différences significatives dans

le nombre d'appuis sur le levier pour la première session, la corrélation bisériale de rang était modérée, indiquant une association entre la phase de testing et les appuis, de nouveau en faveur du groupe LIGHT. En plus, malgré l'absence de différences signalées dans le pourcentage de réponses correctes entre les moments de test, il a été observé que les rongeurs testés pendant leur phase inactive étaient plus précis que ceux testés pendant la phase dark lors des cinq premières sessions, témoignant ainsi d'une acquisition plus efficace de la réponse automatisée pour le groupe LIGHT. De façon similaire, lors de la première session de RV, le groupe LIGHT présentait un pourcentage significativement plus élevé de réponses correctes, suggérant une meilleure acquisition d'une nouvelle règle. Mais pourquoi ce groupe a-t-il surpassé l'autre lors de ces essais de notre expérience ?

En examinant le nombre total d'essais pour la tâche SOL lors de ces premières sessions, nous remarquons une tendance du groupe DARK à montrer des scores plus élevés par rapport aux animaux LIGHT lors des deux dernières séances (quatrième et cinquième). Ceci pourrait indiquer des niveaux d'activité plus élevés pour le groupe testé pendant sa phase dark. En effet, les souris commencent à être plus actives avant le début de la phase dark et atteignent leur pic d'activité au début de cette phase (Hawkins & Golledge, 2018). En outre, compte tenu de leur caractère nocturne, il est logique qu'elles soient plus actives pendant la phase sombre. Il est donc possible que le groupe en phase active soit moins précis dans leur réponse parce qu'ils étaient plus actifs à certains moments de la tâche. De plus, lors de la tâche RV, les souris DARK commettent plus d'erreurs de type droite-droite que les souris LIGHT. Cette observation pourrait laisser penser que la divergence entre les groupes provient de la difficulté rencontrée par les souris DARK à saisir et exécuter la séquence précise. Néanmoins, ce n'était pas le cas dans la tâche SOL. Cet obstacle cognitif présent pendant la phase active pourrait potentiellement être spécifique à l'adaptation à des règles modifiées. Enfin, une différence significative en termes de pourcentage de poids a également été constatée entre les groupes, les animaux testés pendant leur phase active présentant un poids supérieur à celui du groupe LIGHT. Par conséquent, même si la variation de poids corporel était de seulement 1,8 g, il est possible qu'elle ait influencé nos résultats. En revanche, aucune disparité de poids corporel n'a été relevée lors de la tâche RV, ce qui montre que le poids ne peut pas expliquer les variations observées lors de la première session de cette seconde tâche.

Ces résultats pourraient également être expliqués par le moment auquel les rongeurs ont été nourris lors de la période de test. Comme indiqué précédemment, les rongeurs consomment la majorité de leur nourriture au début et à la fin de leur phase active, présentant une

consommation minimale pendant la période de repos (Nelson et al., 2021). Mais dans les protocoles de restriction calorique, les animaux sont nourris pendant la phase light, ce qui ne correspond pas à leur comportement naturel (Rowland, 2007). Dans notre étude, nous avons fait le même choix. Notre objectif était de maintenir les conditions expérimentales aussi similaires que possible entre les groupes, mais en faisant cela, nous avons peut-être augmenté la sensation de faim chez les rongeurs LIGHT. Selon mes observations personnelles, les animaux testés pendant leur phase claire consommaient la majorité de leur nourriture peu après les tests (pendant leur phase de repos), ce qui signifie qu'il ne leur restait pas beaucoup de nourriture pendant la phase sombre. Une faim accrue peut augmenter la motivation à obtenir de la nourriture (cette logique explique pourquoi la restriction calorique est utilisée dans les tâches opérantes) et, par conséquent, améliorer la précision dans le choix de la séquence correcte. Le problème est que si cela est vrai, cela ne s'applique que pendant les périodes d'acquisition et d'apprentissage. En effet, la durée des tests n'a eu aucun effet sur le maintien de la réponse automatisée ou même sur le maintien d'une règle nouvellement apprise.

Pendant les tâches SOL et RV, les groupes ne différaient pas dans leur pourcentage global de réponses correctes, le nombre total d'essais (à l'exception de la différence mentionnée ci-dessus), les types de séquences complétées (correctes ou incorrectes), ni le temps nécessaire pour compléter la tâche. Les seuls effets observés étaient entre les sessions, démontrant que la tâche était correctement réalisée (par exemple, le pourcentage de réponses correctes augmentait progressivement, signifiant ainsi que les rongeurs appuyaient davantage sur la séquence correcte au fil du temps). Il y avait également des effets d'interaction significatifs, mais ils peuvent principalement être attribués aux performances quotidiennes interindividuelles, sans lien avec le moment du testing. Mugenast et Fox (2021) soutiennent également nos conclusions en démontrant que la phase de test n'a pas d'effet sur le comportement DD. Nous pourrions ainsi affirmer que le moment du test n'affecte pas les processus cognitifs mesurés dans notre étude. L'absence de différences entre nos groupes expérimentaux peut être attribuée à un phénomène appelé l'entraînement. L'entraînement est le processus par lequel les rythmes biologiques s'alignent sur de nouveaux indices externes après une modification de ceux-ci, aidant ainsi les horloges internes à prévoir et à s'adapter efficacement aux changements environnementaux (Vitamerna et al., 2001). Ce changement conserve la durée habituelle du rythme circadien malgré un démarrage plus tôt ou plus tard dans la journée de ce dernier (Vitamerna et al., 2001). La disponibilité de la nourriture est l'un des indices qui synchronisent les rythmes circadiens (Sharma & Chandrashekar, 2005), et peut agir donc comme un

stimulus externe provoquant ce changement. En d'autres termes, dans notre expérience, les rongeurs évalués pendant leur phase inactive ont ajusté leur cycle veille-sommeil pour exécuter correctement la tâche et obtenir de la nourriture.

D'un autre côté, Gritton et al. (2012) affirment non seulement que les rongeurs performant mieux pendant leur phase active, mais que leur formation initiale pendant cette phase leur confère un avantage cognitif s'ils sont testés ultérieurement pendant la phase claire. Cela met en évidence le rôle protecteur de tester les rongeurs pendant leur phase active dans l'acquisition d'une réponse opérante. Il est possible que la différence entre notre étude et celle de Gritton et al. (2012) découle des différents types de processus cognitifs mesurés dans notre étude par rapport aux leurs. Ces chercheurs utilisent le Sustained Attention Task (SAT) pour mesurer l'attention soutenue, tandis que nous évaluons l'apprentissage et le maintien d'une réponse automatisée. L'attention soutenue, également connue sous le nom de vigilance, est la capacité à détecter des événements peu fréquents et imprévisibles au fil du temps (Gritton et al., 2012 ; Wicks et al., 2017). L'apprentissage de l'ordre sériel est une forme d'apprentissage implicite, l'apprentissage procédural, dans lequel une séquence de comportements est acquise par la pratique et ne nécessite pas de rappel conscient (Brooks et al., 2011 ; Yin, 2010 ; Linden et al., 2016). Il est possible que l'apprentissage procédural soit moins influencé par le moment du test, ce qui pourrait expliquer pourquoi les deux groupes ont des performances similaires dans les tâches SOL et RV de notre étude.

En ce qui concerne les effets de l'exposition à la lumière, notre hypothèse initiale était que les deux groupes expérimentaux auraient une meilleure performance lorsqu'ils seraient testés dans l'obscurité (condition NOLIGHT) par rapport à la condition LIGHT. Nous pensions également que cet effet serait plus prononcé pour les souris DARK. Encore une fois, les résultats n'ont pas confirmé notre hypothèse initiale. Aucun effet de l'exposition à la lumière n'a été observé sur les paramètres comportementaux mesurés dans cette expérience, sauf sur le nombre total d'essais, où les rongeurs ont réalisé plus d'essais lorsqu'ils étaient testés avec de la lumière. D'autre part, des études rapportent que le comportement des rongeurs, comme la réponse à un environnement nouveau, peut être significativement influencé par des changements dans les conditions d'illumination (Valentinuzzi et al., 2000), et même un faible éclairage peut modifier divers comportements des animaux, comme l'activité locomotrice, les comportements dépressifs et les niveaux d'anxiété (Bedrosian et al., 2013). Une explication potentielle à cette divergence entre nos résultats et ceux trouvés dans la littérature pourrait être liée à la perception visuelle. Dans l'introduction, nous avons mentionné que l'amplitude des ondes b et la sensibilité

au contraste diminuent pendant la phase active, suggérant que la réalisation de tests impliquant des indices visuels pendant la phase sombre pourrait potentiellement conduire à une performance altérée (Peirson et al., 2018). Dans notre protocole, il n'y a pas de signaux lumineux indiquant les positions des leviers (il n'y en a qu'un au-dessus de la mangeoire). Malgré son caractère perturbateur, la présence de lumière aurait pu faciliter la localisation des leviers, atténuant ainsi son impact négatif sur la cognition et amenant à des résultats similaires entre les conditions lumineuses.

Il convient de considérer le fait qu'au cours de notre étude, lors de la 12^e session du RV, les groupes de rongeurs LIGHT et DARK ont montré une performance globale réduite. Étant donné la taille limitée de notre échantillon, cela aurait pu être dû à une performance faible d'un sous-groupe de rongeurs. Néanmoins, cela pourrait avoir un impact sur l'analyse statistique menée pour explorer les effets de l'exposition à la lumière. Cette 12^e session constitue la deuxième session NOLIGHT de notre étude. Enfin, dans notre étude, nous ne pouvons mesurer que l'effet de l'exposition à la lumière sur le maintien de la réponse automatisée, et pas l'acquisition. Cette limitation découle du fait que les rongeurs avaient déjà subi 24 sessions de tests avant que les lumières ne soient introduites pour la première fois.

Dans cette première expérience, l'effet du régime alimentaire des rongeurs sur leur capacité à effectuer la tâche opérante a été le dernier facteur examiné. En se basant sur les découvertes de Zaros (2018), nous avons initialement testé un groupe de souris alimentées à volonté (AL). On a prédit que les animaux AL seraient capables d'apprendre la réponse opérante, puis d'acquiescer et de maintenir un comportement séquencé. Toutefois, notre hypothèse a été réfutée car seules trois des huit souris de ce groupe ont réussi la phase de Shaping, et même dans ce cas, elles n'ont jamais obtenu des résultats comparables à ceux des deux autres groupes expérimentaux soumis à une restriction calorique. En conséquence, nous avons déduit que la restriction calorique est essentielle non seulement pour comprendre l'association levier-pellet, mais aussi pour pouvoir bien performer dans une tâche opérante. En fait, il est supposé que les niveaux de restriction alimentaire influencent davantage le comportement et prédisent mieux la sensibilité à la dévaluation des résultats que l'emploi du programme d'entraînement lui-même dans les tâches opérantes mesurant le comportement dirigé vers un but (Chevée et al., 2023). Malgré cela, de nouveaux modèles opérants ne dépendant pas du régime alimentaire pour motiver le comportement ont été proposés. Par exemple, dans un article de Rummel et al. (2016), les chercheurs suggèrent une nouvelle tâche automatisée qui évalue l'apprentissage de la discrimination de la réponse initiale ainsi que le Reversal Learning en seulement quatre jours

sans restriction alimentaire. Rummelink et al. (2016) affirment que cette nouvelle tâche démontre une bonne fidélité et validité, mais ils précisent que des recherches supplémentaires devraient être menées concernant l'aspect de la privation alimentaire.

Dans notre étude, nous avons décidé de réintroduire progressivement la nourriture et de mener deux séances d'ordre sériel au cours desquelles les rongeurs avaient un accès libre après avoir déjà effectué la tâche pendant un certain temps. Notre hypothèse initiale selon laquelle les souris seraient toujours capables de terminer la tâche de la même manière qu'elles l'ont fait sous restriction calorique a été confirmée. Les souris ont montré un pourcentage similaire de réponses correctes pendant la restriction calorique, lorsqu'elles étaient à 95 % de leur poids corporel initial et lorsqu'elles étaient alimentées ad libitum. En plus, la réintroduction de la nourriture n'a pas augmenté de manière significative le nombre d'essais accomplis. Malgré le fait que les rongeurs ne diffèrent pas pour d'autres types d'erreurs pendant tous les régimes alimentaires, ils ont commis plus d'erreurs droite-droite lorsqu'ils étaient nourris à volonté. En fait, ces erreurs étaient comparables à celles commises lors de la 12e session de RV, démontrant que même les souris sous restriction calorique peuvent connaître des "mauvaises journées". L'accès libre à la nourriture a également augmenté le temps nécessaire pour accomplir la tâche. Dans l'ensemble, nous arrivons à la conclusion que, malgré le fait de prendre plus de temps, un accès illimité à la nourriture permet toujours une performance adéquate après la consolidation de la réponse opérante correcte pour obtenir une récompense alimentaire.

Il est toutefois important de noter quelques limitations de notre étude. Premièrement, nos animaux ont été testés pendant 28 jours avant l'introduction de la nourriture, tandis que les tâches SOL durent généralement 12 jours (Linden et al., 2016) ou 14 jours (Yin, 2010). Cela suggère que les souris de notre étude ont peut-être reçu un entraînement excessif ; sinon, les résultats de l'alimentation ad libitum n'auraient peut-être pas été obtenus. De plus, les rongeurs de cette expérience ont été testés en ayant un accès illimité à la nourriture pendant seulement deux jours, et le temps nécessaire pour accomplir la tâche a déjà commencé à augmenter, suggérant un déclin potentiel de la motivation au fil du temps. En raison de cela, des recherches supplémentaires impliquant des tests d'une durée de plus de deux jours sont nécessaires pour soutenir nos conclusions.

Dans notre deuxième expérience, des jeunes souris mâles C57BL/6 ont été testées avec une tâche de Progressive Ratio (PR) pour explorer l'effet du moment du test sur le comportement motivé. Nos résultats ont montré que les groupes LIGHT et DARK ne différaient pas en termes

de quantité de pellets obtenus, d'appuis sur le levier, ni de breakpoint, confirmant notre hypothèse initiale d'une motivation similaire entre les phases de test. Ceci est un résultat intéressant car, dans notre première étude, les souris femelles testées pendant la phase lumineuse ont appris plus rapidement et plus efficacement que les souris de la phase sombre. En effet, on pense que la performance des rongeurs dans divers tests est influencée par le cycle œstral (Marcondes et al., 2001). Mais malgré cela, les études ne semblent pas démontrer de différences entre les sexes en termes de niveaux de motivation (Van Hest et al., 1988) ou d'apprentissage guidé par la récompense et de flexibilité cognitive (Chowdhury et al., 2019). Par conséquent, il est possible que le moment du test puisse avoir un impact différent sur le Shaping en fonction du sexe du sujet, les souris femelles testées pendant la phase inactive étant meilleures que celles testées pendant la phase active. Par contre, les récompenses attribuées aux deux groupes étaient différentes, les souris femelles recevant des pellets au chocolat tandis que les souris mâles recevaient des pellets normaux. Travailler pour obtenir des pellets plus appétissants, comme ceux au chocolat, est censé mesurer la motivation hédonique, selon Acosta et al. (2020). Effectivement, la recherche démontre que les pellets au chocolat ont un effet attractif si puissant que des animaux du groupe contrôle sont tout aussi motivés pour les chercher que les souris avec une hyperphagie induite (Rossetti et al., 2013).

Dans notre expérience, le moment du test n'a eu aucun impact sur la motivation des souris pour une récompense alimentaire. En effet, comme mentionné précédemment, lorsque la nourriture et le sommeil entrent en compétition, c'est la nourriture qui gagne toujours (Antle & Silver, 2015). Ce résultat pourrait être soutenu par les régions cérébrales liées à ces deux processus. Comme mentionné, l'oscillateur circadien principal est le noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus (Tosini et al., 2007). En ce qui concerne le comportement de recherche de nourriture, deux populations neuronales antagonistes existent dans le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus, détectant les informations caloriques et favorisant la satiété (Sotelo et al., 2020). Aussi, dans l'hypothalamus latéral, on trouve les neurones à hypocretine/orexine (Hcrt) qui intègrent des signaux physiologiques ainsi que d'autres signaux sensoriels, tels que les comportements motivés, la recherche de récompenses et les signaux liés à la prise alimentaire (Sotelo et al., 2020). Ainsi, l'hypothalamus est lié aux rythmes circadiens, aux comportements liés à la recherche de nourriture et aux comportements motivés. Alors, il est possible que cette structure cérébrale commune organise les comportements de manière à ce que celui qui est le plus nécessaire soit priorisé.

Pourtant, les résultats d'Acosta et al. (2020) ne concordent pas avec les nôtres, probablement en raison de lacunes méthodologiques. Ils omettent notamment de fournir une explication explicite sur le Shaping de la réponse opérante. Bien qu'ils mentionnent trois sessions de Shaping, les détails concernant l'acquisition de l'association levier-pellet par les rongeurs font défaut. Acosta et al. (2020) affirment que le groupe DARK a obtenu de meilleures performances lors de la séance de PR, mais des insuffisances dans le Shaping peuvent compliquer l'interprétation des résultats : Les groupes diffèrent au niveau de la motivation ou de l'apprentissage de la réponse opérante ? En outre, leur étude ne comporte qu'une seule session de PR. En général, les études PR s'étendent sur 3 jours (Finger et al., 2010), 5 jours (Fletcher et al., 2010), voire même 7 jours (Pratt et al., 2021). Également, notre étude révèle que les mesures comportementales augmentent avec le temps, ce qui signifie que la motivation évolue avec le temps et une session ne suffit pas pour explorer efficacement l'impact du moment du testing sur ce processus cognitif.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce mémoire a révélé que la performance aux tests opérants ne semble pas autant affectée par le moment du test que dans le cas des tests rapides. L'apprentissage d'une réponse automatisée, la flexibilité cognitive et la motivation pour une récompense alimentaire n'ont pas été impactés par la phase de testing. De plus, dans notre étude, l'exposition à la lumière n'a pas semblé affecter le comportement des animaux. Cependant, notre conception expérimentale n'a pas permis de voir comment la lumière influençait l'acquisition, limitant ainsi nos conclusions. Enfin, nous avons découvert que bien que la restriction calorique soit nécessaire pour apprendre et exécuter des tâches opérantes, un accès libre à la nourriture peut être rétabli lors des dernières sessions de test une fois que le comportement a été maîtrisé.

D'un point de vue procédural, ce travail nous amène à conclure que tester les rongeurs pendant leur phase inactive n'affectera pas les résultats. De l'autre côté, je pense que tester les rongeurs lorsqu'ils sont naturellement actifs serait plus approprié d'un point de vue éthique et éthologique. Il est vrai que tester les rongeurs pendant leur phase de repos ne semble pas avoir d'effet sur leur cognition ou leur comportement, mais nous ne pouvons pas être certains de son impact sur la santé physique, en particulier en sachant que les tests opérants durent généralement plusieurs séances.

BIBLIOGRAPHIE

1. Acosta, J., Bussi, I. L., Esquivel, M., Höcht, C., Golombek, D. A., & Agostino, P. V. (2020). Circadian modulation of motivation in mice. *Behavioural Brain Research*, 382, 112471. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112471>
2. Alvarez, B. D., Morales, C. A., Oliver, B., Cavazos, C., Amodeo, L. R., & Amodeo, D. A. (2023). Impairments in operant probabilistic reversal learning in BTBR T+tf/J male and female mice. *Behavioural Brain Research*, 437, 114111. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114111>
3. Andrade, M.M., Tome, M.F., Santiago, E.S., Lucia-Santos, A., de Andrade, T.G. (2003). Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, 78(1), 125-133. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00941-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00941-1)
4. Antle, M.C., Silver, R. (2015). Circadian Insights into Motivated Behavior. In: Simpson, E., Balsam, P. (eds) Behavioral Neuroscience of Motivation. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 27. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/7854_2015_384
5. Arias, N., Fidalgo, C., Mendez, M., & Arias, J. M. (2015). How demanding is the brain on a reversal task under day and night conditions ? *Neuroscience Letters*, 600, 153-157. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.06.014>
6. Augustsson, H., & Meyerson, B. J. (2004). Exploration and risk assessment : a comparative study of male house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiology & Behavior*, 81(4), 685-698. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.03.014>
7. Bedrosian, T. A., Vaughn, C. A., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Behaviour of laboratory mice is altered by light pollution within the housing environment. *Animal Welfare*, 22(4), 483-487. <https://doi.org/10.7120/09627286.22.4.483>
8. Beeler, J. A., Prendergast, B. J., & Zhuang, X. (2006). Low amplitude entrainment of mice and the impact of circadian phase on behavior tests. *Physiology & Behavior*, 87(5), 870-880. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.01.037>
9. Bilu, C., & Kronfeld-Schor, N. (2013). Effects of circadian phase and melatonin injection on anxiety-like behavior in nocturnal and diurnal rodents. *Chronobiology International*, 30(6), 828-836. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.773439>
10. Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The Mouse Light/Dark Box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55-65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01274-3)

11. Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 53. <https://doi.org/10.3791/2920>
12. Brooks, S. P., Jones, L., & Dunnett, S. B. (2012). Longitudinal analyses of operant performance on the serial implicit learning task (SILT) in the YAC128 Huntington's disease mouse line. *Brain Research Bulletin*, 88(2-3), 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.06.008>
13. Carobrez, A., & Bertoglio, L. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior : The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1193-1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>
14. Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, 134(1-2), 49-57. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00452-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1)
15. Challet, E. (2019). The circadian regulation of food intake. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(7), 393-405. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0210-x>
16. Chevée, M., Kim, C. J., Crow, N., Follman, E. G., & Calipari, E. S. (2023). Sensitivity to outcome devaluation in operant tasks is better predicted by food restriction level than reinforcement training schedule in mice. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2023.02.23.529699>
17. Craig, L. A., & McDonald, R. (2008). Chronic disruption of circadian rhythms impairs hippocampal memory in the rat. *Brain Research Bulletin*, 76(1-2), 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.02.013>
18. De Moura, F. B., & León, F. (2016). The contribution of $\alpha 4\beta 2$ and non- $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors to the discriminative stimulus effects of nicotine and varenicline in mice. *Psychopharmacology*, 234(5), 781-792. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4514-4>
19. Espejo, E. F. (1997). Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 86(1), 105-112. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)02245-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)02245-0)
20. Feige-Diller, J., Krakenberg, V., Bierbaum, L., Seifert, L., Palme, R., Kaiser, S., Sachser, N., & Richter, S. (2020). The Effects of Different Feeding Routines on Welfare in Laboratory Mice. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00479>

21. Finger, B. C., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2010). Progressive ratio responding in an obese mouse model : effects of fenfluramine. *Neuropharmacology*, *59*(7-8), 619-626. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.08.010>
22. Fisk, A. S., Tam, S. K. E., Brown, L. A., Vyazovskiy, V. V., Bannerman, D. M., & Peirson, S. N. (2018). Light and Cognition : Roles for Circadian Rhythms, Sleep, and Arousal. *Frontiers in Neurology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00056>
23. Fletcher, P., Sinyard, J., & Higgins, G. A. (2010). Genetic and pharmacological evidence that 5-HT_{2C} receptor activation, but not inhibition, affects motivation to feed under a progressive ratio schedule of reinforcement. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *97*(1), 170-178. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.07.002>
24. Gabloffsky, T., Gill, S., Staffeld, A., Salomon, R., Guerra, N. P., Joost, S., Hawlitschka, A., Kipp, M., & Frintrop, L. (2022). Food Restriction in Mice Induces Food-Anticipatory Activity and Circadian-Rhythm-Related Activity Changes. *Nutrients*, *14*(24), 5252. <https://doi.org/10.3390/nu14245252>
25. Gritton, H. J., Kantorowski, A., Sarter, M., & Lee, T. M. (2012). Bidirectional interactions between circadian entrainment and cognitive performance. *Learning & Memory*, 126-141. <https://doi.org/10.1101/lm.023499.111>
26. Hashimoto, T., & Watanabe, S. (2005). Chronic food restriction enhances memory in mice? Analysis with matched drive levels. *Neuroreport*, *16*(10), 1129-1133. <https://doi.org/10.1097/00001756-200507130-00019>
27. Hawkins, P., & Golledge, H. D. R. (2017). The 9 to 5 Rodent – Time for Change ? Scientific and animal welfare implications of circadian and light effects on laboratory mice and rats. *Journal of Neuroscience Methods*, *300*, 20-25. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.014>
28. Huynh, T. N., Krigbaum, A. M., Hanna, J. J., & Conrad, C. D. (2011). Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. *Behavioural Brain Research*, *222*(1), 212-222. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.038>
29. Jones, N., & King, S. M. (2001). Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology & Behavior*, *72*(1-2), 99-106. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00388-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00388-7)
30. Karatsoreos, I. N. (2012). Effects of Circadian Disruption on Mental and Physical Health. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, *12*(2), 218-225. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0252-0>

31. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal Research : Reporting In Vivo Experiments : The ARRIVE Guidelines. *The Journal of Gene Medicine*, 12(7), 561-563. <https://doi.org/10.1002/jgm.1473>
32. Leo, L. M., & Pamplona, F. A. (2014). Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse. *Bio-protocol*, 4(16). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.1211>
33. Linden, J., Van De Beeck, L., Plumier, J., & Ferrara, A. (2016). Procedural learning as a measure of functional impairment in a mouse model of ischemic stroke. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.032>
34. Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, 74(4-5), 435-440. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00593-5)
35. McClung, C. A. (2013). How Might Circadian Rhythms Control Mood ? Let Me Count the Ways. *Biological Psychiatry*, 74(4), 242-249. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.02.019>
36. McGill University, FOOD AND WATER RESTRICTION IN RODENTS (Standard Operating Procedure), 2023.
37. Mungenast, H. K. & Fox, A. E. (2021). Impact of Light–Dark Phase on Delay Discounting Behavior in Rats. *The Psychological Record*, 72(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s40732021-00462-1>
38. Nelson, R. J., Bumgarner, J. R., Walker, W. F., & DeVries, A. C. (2021). Time-of-day as a critical biological variable. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 127, 740-746. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.05.017>
39. Park, E., Cho, M., & Ki, C. (2009). Correct Use of Repeated Measures Analysis of Variance. *General laboratory medicine*, 29(1), 1-9. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.1.1>
40. Paul, K. N., Saafir, T., & Tosini, G. (2009). The role of retinal photoreceptors in the regulation of circadian rhythms. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*, 10(4), 271-278. <https://doi.org/10.1007/s11154-009-9120-x>
41. Peirson, S. N., Brown, L. M., Pothecary, C. A., Benson, L. A., & Fisk, A. S. (2018). Light and the laboratory mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 300, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.04.007>
42. Pinel, J. (2007). Sommeil, rêve et rythmes circadiens. In E. Siéroff (Trans.), *Biopsychologie* (6e éd., pp. 303-328). Pearson. (Original work published 2005)

43. Pratt, W. E., Vaca-Tricerri, R., Blanchard, A. C., Hopkins, T. R., Ilesanmi, A. O., Pierce-Messick, Z., Rosner, I., & Ying, R. (2021). Selective serotonin receptor stimulation of the ventral tegmentum differentially affects appetitive motivation for sugar on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Behavioural Brain Research*, 403, 113139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113139>
44. Rummelink, E., Smit, A. B., Verhage, M., & Loos, M. (2016). Measuring discrimination- and reversal learning in mouse models within 4 days and without prior food deprivation. *Learning & Memory*, 23(11), 660-667. <https://doi.org/10.1101/lm.042085.116>
45. Roane, H. S. (2008). ON THE APPLIED USE OF PROGRESSIVE-RATIO SCHEDULES OF REINFORCEMENT. *Journal of Applied Behavior Analysis*, 41(2), 155-161. <https://doi.org/10.1901/jaba.2008.41-155>
46. Roedel, A., Storch, C., Holsboer, F., & Ohl, F. (2005). Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. *Laboratory Animals*, 40(4), 371-381. <https://doi.org/10.1258/002367706778476343>
47. Rossetti, C., Spena, G., Halfon, O., & Boutrel, B. (2013). Evidence for a compulsive-like behavior in rats exposed to alternate access to highly preferred palatable food. *Addiction Biology*, 19(6), 975-985. <https://doi.org/10.1111/adb.12065>
48. Rowland, N. E. (2007). Food or fluid restriction in common laboratory animals : balancing welfare considerations with scientific inquiry. *PubMed*, 57(2), 149-160. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17536615>
49. Schneider, P., Ho, Y. J., Spanagel, R., & Pawlak, C. R. (2011). A Novel Elevated Plus-Maze Procedure to Avoid the One-Trial Tolerance Problem. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00043>
50. Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96. <https://doi.org/10.3791/52434>
51. Sharma, V. K., & Chandrashekar, M. K. (2005). Zeitgebers (time cues) for biological clocks. *Current Science*, 89(7), 1136-1146. <http://repository.ias.ac.in/30783/>
52. Sotelo, M. I., Tyan, J., Dzera, J., & Eban-Rothschild, A. (2020). Sleep and motivated behaviors, from physiology to pathology. *Current Opinion in Physiology*, 15, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.01.006>
53. Swindell, W. R. (2012). Dietary restriction in rats and mice : A meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Research Reviews*, 11(2), 254-270. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2011.12.006>

54. The jamovi project (2021). jamovi. (Version 2.2) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.
55. Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., & Castanon-Cervantes, O. (2007). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *The FASEB Journal*, 21(14), 3866-3871. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8371com>
56. Toth, L. A., & Gardiner, T. A. (2000a). Food and water restriction protocols : physiological and behavioral considerations. *PubMed*, 39(6), 9-17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11487246>
57. Tsao, C., Flint, J., & Huang, G. (2022). Influence of diurnal phase on behavioral tests of sensorimotor performance, anxiety, learning and memory in mice. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03155-5>
58. Valentinuzzi, V. S., Buxton, O. M., Chang, A. M., Scarbrough, K., Ferrari, E., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2000). Locomotor response to an open field during C57BL/6J active and inactive phases. *Physiology & Behavior*, 69(3), 269-275. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(00\)00219-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00219-5)
59. Van Hest, A., Van Haaren, F., & Van De Poll, N. E. (1988). The behavior of male and female Wistar rats pressing a lever for food is not affected by sex differences in food motivation. *Behavioural Brain Research*, 27(3), 215-221. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90118-0](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90118-0)
60. Verma, P., Hellems, K. G., Choi, F. Y., Yu, W., & Weinberg, J. (2010). Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiology & Behavior*, 99(3), 276-285. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.11.002>
61. Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (2001). Overview of circadian rhythms. *PubMed*, 25(2), 85-93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11584554>
62. Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, 2(2), 322-328. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>
63. Walker, W. H., Walton, J. C., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2020). Circadian rhythm disruption and mental health. *Translational Psychiatry*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0694-0>
64. Wicks, B., Waxler, D. E., White, K., Duncan, N., Bergmann, J., Cole, R. D., Parikh, V., & Bangasser, D. A. (2017). Method for testing sustained attention in touchscreen operant

chambers in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 277, 30-37.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.12.003>

65. Yin, H. H. (2010). The Sensorimotor Striatum Is Necessary for Serial Order Learning. *The Journal of Neuroscience*, 30(44), 14719-14723. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3989-10.2010>
66. Zaros, A. (2018). Effets de la manipulation de facteurs environnementaux sur les composantes comportementales et cognitives de souris [Mémoire de master, Université de Liège]. <http://hdl.handle.net/2268.2/5878>

ANNEXES

Annexe 1 : Mise en parallèle du guide ARRIVE (Kilkenny et al., 2010) et de l'article d'Acosta et al. (2020)

ITEM	RECOMMENDATION	Acosta et al. (2020)
Title	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Oui.
Abstract	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Oui.
Introduction: Background	a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale. b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.	Oui.
Objectives	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	L'effet de la restriction calorique n'est pas mentionné dans les différentes hypothèses, il apparaît simplement dans la méthodologie.
Methods: Ethical statement	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	Oui.
Study design	For each experiment, give brief details of the study design including: a. The number of experimental and control groups. b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when). c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals). A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out	a. Les groupes sont décrits mais le nombre de sujets dans chaque groupe n'est pas clairement indiqué. b. Non. c. Aucun schéma sur le design de l'étude même s'il y a plusieurs groupes expérimentaux.
Experimental procedures	For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example: a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s). b. When (e.g. time of day). c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze). d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).	Les conditions expérimentales sont expliquées clairement, mais il y a un manque d'explication concernant le shaping. La tâche opérante est brièvement décrite et il n'y a aucune information si les animaux ont réussi à apprendre l'association levier-aliment. L'heure de la journée est à nouveau donnée pour les conditions expérimentales et le programme PR mais pas pour la tâche opérante, ce qui laisse supposer que les animaux ont été soumis à la tâche opérante à la même heure de la journée que le programme PR.
Experimental animals	a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).	a. l'âge, la souche et le sexe sont les seules informations données. Le poids n'est pas donné, ce qui est crucial pour cette étude.

	b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.	Oui.
Housing and Husbandry	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc. for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	a. Non. b. Le cycle light/dark, la température ambiante et l'accès à la nourriture et à l'eau sont les seules informations fournies. c. Non
Sample size	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	Aucune information explicite n'est donnée.
Allocating animals to experimental groups	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	Aucune information explicite n'est donnée.
Experimental outcomes	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	Oui.
Statistical methods	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	Oui.
Results: Baseline data	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing (this information can often be tabulated).	Non.
Numbers analysed	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why	Non.
Outcomes and estimation	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	Seule la probabilité de dépassement (p) est donnée.
Adverse events	a. Give details of all important adverse events in each experimental group.	Non.
	b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	
Discussion: Interpretation/ Scientific implications	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results.	a. Oui. b. Deux limites ont été évoquées : 1. L'incapacité de définir différents moments dans la condition LL. 2. Méthode utilisée pour mesurer les niveaux de DA dans le NAc.
Generalisability/ translation	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	Seulement deux phrases : 1. Les comportements motivés sont particulièrement pertinents pour les maladies humaines. 2. Il y a un rôle pour l'horloge circadienne dans la régulation de la motivation de le récompense humaine et de la toxicomanie et de la dépendance.
Funding	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	Oui.

Annexe 2 : Tableau de randomisation comprenant le numéro attribué à chaque souris, le temps de test (ZT0 et ZT12 = 8h30; ZT1 et ZT13 = 9h30), le groupe expérimental auquel chaque souris appartient, et la boîte opérante sur laquelle chaque rongeur a été testé. Les codes couleurs sont choisis uniquement pour faciliter la lecture.

Nombre de souris	Moment du test	Groupe	Chambre opérante
1	ZT0	LD	1
2	ZT0	LD	2
3	ZT0	LD	3
4	ZT0	LD	4
5	ZT1	LD	5
6	ZT1	LD	6
7	ZT1	LD	7
8	ZT1	LD	8
45	ZT12	DD	5
46	ZT12	DD	6
47	ZT12	DD	7
48	ZT12	DD	8
49	ZT13	DD	9
50	ZT13	DD	10
51	ZT13	DD	11
52	ZT13	DD	12
53	ZT12	DA	9
54	ZT12	DA	10
55	ZT12	DA	11
56	ZT12	DA	12
57	ZT13	DA	1
58	ZT13	DA	2
59	ZT13	DA	3
60	ZT13	DA	4

Annexe 3 : Procédure de randomisation comprenant le numéro de sous-groupe, le temps de test (ZT0 pour les LIGHT/ZT12 pour les DARK étant à 13h), et les boîte opérantes sur lesquelles chaque groupe a été testé.

- **Sous-groupe 1 (ZT01/ZT13)** : Groupe Light (Box une à six) ; Groupe Dark (Box sept à 12).
- **Sous-groupe 2 (ZT03/ZT15)** : Groupe Light (Box sept à 12) ; Groupe Dark (Box une à six).
- **Sous-groupe 3 (ZT05/ZT17)** : Groupe Light (Box une à six) ; Groupe Dark (Box sept à 12).

Annexe 4 : Les courriels échangés avec Acosta sur les conditions d'illumination dans les chambres opérantes

Dear Dr. Acosta,

I am contacting you to ask you a methodological question concerning your research article on the circadian modulation of motivation in mice :
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112471>

I am a Neuroscience student studying at the University of Liege in Belgium. I am currently working with Mr. Andre Ferrara on the effect of circadian rhythms on different aspects of the rodent behavior, one of these being motivation. One of our goals is to replicate your study as best as we can and this is why I am writing you this email. In the article it is mentioned that the PR apparatus contains a house light. I wanted to know whether this light is turned on during shaping and the PR task for each experimental condition, or not. After some research I have noticed that a vast majority of the researchers leave the light on, but I just wanted to make sure that I am following the same steps as you.

Looking forward to your reply.

Respectfully,
Marianthi Terpini



Re: Research question

5 Mai 2022 3:01

Expéditeur : Julieta Acosta

À : m terpini

Cc: Diego Golombek Patricia Agostino

Dear Marianthu Terpini,

Thank you for your interest in our work. Regarding your question, we performed all of our behavioral experiments with the house light OFF (during the shaping and the PR task). This is because we didn't want the mice that were tested during the dark phases (i.e, night groups or constant dark DD groups) to receive a light pulse, so we set the same conditions (always the house light off) for all the experimental groups. The lights in the experimental room (where the behavioral chambers are located) were also turned off during the experiments performed with the night and DD groups, but were turned on during the experiments conducted in the light phases (i.e, the day groups and the constant light LL groups). In the cases where the lights in the experimental room were turned off, we used a red dim light in order to be able to see when we entered the room to place or remove the mice from the behavioral chambers.

I hope my answer was helpful and feel free to contact me again if you have any further questions or concerns.

Kind regards,

Julieta Acosta.