



Institut de Neurosciences Cognitives  
et Intégratives d'Aquitaine

INCIA  
UMR 5287- CNRS  
Université de Bordeaux  
Responsable : Yoon CHO



ENSEA  
6 avenue du Ponceau  
95000 Cergy  
Responsable : Myriam ARIAUDO

## Étude des vocalisations ultrasonores chez des souris modèles de maladies neuro-dégénératives

*Stage deuxième année*

Vincent MARTIN <sup>1</sup>

3 juillet 2017 - 18 août 2017

<sup>1</sup>[vincent.martin@ensea.fr](mailto:vincent.martin@ensea.fr)

Je tiens particulièrement à remercier Yoon CHO, Yannick JEANTET, Magalie CABANAS ainsi que Loïc BORDES pour leur patience et leur accueil chaleureux au sein du laboratoire.

# Sommaire

<b>1 Présentation du laboratoire et objectifs</b>	<b>3</b>
1.1 Présentation générale . . . . .	3
1.2 Expérimentation animale . . . . .	3
1.3 Tests et expériences . . . . .	3
1.4 Étude des vocalisations de la souris . . . . .	4
<b>2 Enregistrement de souris</b>	<b>5</b>
2.1 Élaboration d'un protocole . . . . .	5
2.2 Animaux et matériel . . . . .	5
2.2.1 Animaux . . . . .	5
2.2.2 Matériel . . . . .	5
2.3 Premiers résultats . . . . .	6
2.4 Améliorations de la qualité . . . . .	6
2.5 Résultats . . . . .	6
<b>3 Étude de fichiers wav déjà enregistrés et mise en place d'une chaîne de traitement</b>	<b>7</b>
3.1 État des lieux . . . . .	7
3.2 Pitch Shifting . . . . .	8
<b>4 Documentation scientifique (fichiers en annexes)</b>	<b>9</b>
4.1 Résumé de lectures . . . . .	9
4.2 Rédaction de rapports de résultats . . . . .	9
4.3 Rédaction de notices pour l'équipe . . . . .	9
<b>5 Mise en perspective</b>	<b>10</b>

# Partie 1

## Présentation du laboratoire et objectifs

### 1.1 Présentation générale

L'INCIA, et plus particulièrement l'équipe de neurobiologie du comportement au sein duquel ce stage a été effectué, étudie le comportement et la neurobiologie de souris transgéniques dont les gènes ont été modifiés afin de déclencher certains symptômes de maladies humaines telles que la maladie d'Alzheimer, la chorée de Huntington ou encore certaines formes d'autisme. L'unité est composée de chercheurs, étudiants en thèses, de techniciens en biochimie, de deux animalières et d'un assistant technique.

### 1.2 Expérimentation animale

Le laboratoire est équipé de sa propre animalerie, dans laquelle les animaux de sexes différents sont stockés dans des pièces différentes, avec une lumière sur minuterie (12h jour/12h nuit) et une hygrométrie constante. Toutes les expérimentations procédées sur les animaux font l'objet de saisines dans lesquelles toutes les expérimentations des animaux sont indiquées, depuis leur naissance jusqu'à leur mort. Ces saisines sont validées par un comité d'éthique, qui encadre strictement les différentes opérations et test réalisables sur les animaux. Ces expérimentations nécessitent toutes divers degrés de formations. Heureusement, enregistrer des animaux ne rentre pas dans le cadre d'une expérimentation : le stress développé par le fait d'enregistrer les animaux est très faible, même comparé à une simple injection. Je vais donc pouvoir enregistrer les souris sans problème.

### 1.3 Tests et expériences

Les tests auquel j'ai pu assister au sein de l'INCIA sont des tests comportementaux mais aussi des mesures d'activités cérébrales grâce à des têtes fabriquées sur place et installées lors d'une opération (auquel j'ai pu assister) sur l'animal. Tous les tests sont effectués avec des animaux transgéniques dont le gène étudié est Knock Out (KO), hétérozygotes ou normal (Wild Type). Les WT servent d'animaux de contrôle, tous les animaux étudiés vivant dans les mêmes conditions. Les tests comportementaux auquel j'ai pu assister sont les suivants :

- Interaction sociale : deux individus de même sexe sont mis en contact et leurs interactions sont classifiées et comptées.
- Le Y-maze : la souris est placée au centre d'un labyrinthe en forme de Y et on étudie son déplacement pendant 5min. Ce test est utilisé pour évaluer la mémoire à court terme des animaux.



Figure 1.1: Les différents tests : Ymaze, plus-maze, Bounce

- Le plus-maze : un labyrinthe dont les bras opposés sont soit ouverts (simple plateforme), soit fermés, qui sert à mesurer l'anxiété.
- Le bounce : on place la souris au milieu d'une table contenant 18 trous. Un trou est le "bon" et contient de la litière; c'est l'objectif à atteindre. Un ventilateur est placé face à ce trou et un indice (bouteille d'eau) est placé à une distance de quelques trous de celui à atteindre. On mesure le temps passé autour de chaque trou et le temps nécessaire pour atteindre le bon trou. Ce test a pour objectif de mesurer l'apprentissage des souris : elle réalisent le test six fois lors de la première journée et six fois le lendemain. La présence d'un indice sert à mesurer la stratégie développée par la souris (repérage spatial ou indiciel).

Assister à ces différents tests m'a sensibilisé à la rigueur nécessaire lors de l'expérimentation animale : les souris étant des animaux sujets au stress, de nombreux protocoles nécessitent des périodes d'habituation dans la pièce dans laquelle se pratique le test avant de l'effectuer. De plus, toutes les surfaces en contact avec les animaux doivent être lavées avec de l'alcool afin d'éliminer les odeurs des précédents passages, et ne pas biaiser l'expérience. Les biais sont nombreux et une grande rigueur est nécessaire afin d'étudier les facteurs que l'on souhaite en essayant de garder les autres facteurs constants.

Le laboratoire possédant sa propre salle d'opération, il m'a été, par ailleurs, possible d'assister à une opération conduisant à la pose d'une tête contenant des électrodes permettant la mesure d'activité cérébrale.

## 1.4 Étude des vocalisations de la souris

Les souris émettent des vocalisations ultra-sonores dans trois situations :

- Les sourceaux entre 3 et 15 semaines émettent des vocalisations ultra-sonores lorsqu'ils sont éloignés de leur nid. Il est supposé que cela sert à avertir la mère qu'il a froid.
- Deux femelles mises en contact vocalisent, afin d'établir une relation hiérarchique entre elles.
- Un mâle vocalise lorsqu'il courtise une femelle : c'est cette situation que nous allons étudier.

Si l'équipe qui m'a accueilli possède de nombreux protocoles permettant d'évaluer le comportement des souris et leur apprentissage, l'étude des vocalisations ultrasonores a été réduite à la seule étude du nombre de vocalisations et à quelques caractéristiques fréquentielles élémentaires. De plus, le matériel utilisé précédemment n'est plus disponible et un nouvel équipement est à ma disposition.

Les objectifs sont donc les suivants:

- Mettre en place un protocole d'enregistrement avec le matériel à ma disposition
- Exploiter les enregistrements au sein d'une étude plus approfondie que les études précédentes
- Laisser à l'équipe des outils leur permettant par la suite d'effectuer ces analyses

## Partie 2

# Enregistrement de souris

### 2.1 Élaboration d'un protocole

Après avoir lu de nombreux articles présentant leur méthode (cf "Documentation scientifique"), la méthode suivante à été retenue :

1. Un mâle est placé dans sa cage en habituation pour 20 min dans la salle d'enregistrement (salle d'expérimentation inutilisée)
2. Une femelle est introduite dans la cage. On enregistre pour une durée de cinq minutes.
3. Au bout des cinq minutes, la femelle est retirée et le mâle laissé en repos pour 20 min. La femelle est ramenée à l'animalerie dans sa cage.
4. Une fois les 20 minutes écoulées, on introduit une nouvelle femelle dans la cage et on ré-enregistre.
5. Une fois le deuxième enregistrement terminé, la mâle et la femelle sont ramenés à l'animalerie.

### 2.2 Animaux et matériel

#### 2.2.1 Animaux

Les souris à ma disposition sont des mâles modèles d'une forme d'autisme (Shank3), KO, hétérozygotes et WT, et des souris femelles juvéniles. Les mâles sont en cages individuelles, sevrés d'interaction sociale. Ce procédé semble augmenter le nombre de vocalisations émises. Les souris femelles sont en cages collectives.

#### 2.2.2 Matériel

Le micro mis à ma disposition, le Ultramic384K de l'entreprise Dodotronic<sup>1</sup> intègre un convertisseur analogique-numérique et enregistre directement des fichiers wav sur une carte micro-SD. La capsule semble adaptées pour enregistrer des fréquences ultrasonores, domaine dans lequel les vocalisations sont émises.

Afin de pouvoir corrélérer l'étude des vocalisations ultrasonores et le comportement des animaux, une caméra est placée au dessus de la cage, enregistrant les interactions entre les animaux.

---

<sup>1</sup><http://www.dodotronic.com/>



Figure 2.1: Box acoustique et set-up de l'expérience

### 2.3 Premiers résultats

Les premiers enregistrements sont inexploitables : malgré l'absence de bruit dans l'audible, une grande quantité de bruit dans le domaine ultrasonore est présente. Les motifs réguliers apparaissant sur les spectrogrammes suggèrent que ceux-ci sont dûs à la ventilation, présente dans toutes les salles de test.

### 2.4 Améliorations de la qualité

La qualité des enregistrements est donc à améliorer. Pour cela, j'ai cherché l'endroit dans la pièce où le bruit était le moins présent et confectionné un box acoustique avec un box en bois et de la mousse : le niveau de bruit dû à la ventilation devient acceptable. Le bruit résiduel restant est du bruit électronique, contre lequel il nous est malheureusement pas possible de lutter.

### 2.5 Résultats

Même si les spectrogrammes pourraient être exploités "à la main", un traitement automatique de ceux-ci est impossible : le signal est trop faible.

En revanche, après un test sur la faisabilité d'un prochaine expérience sur les bébés pour laquelle le microphone n'était pas accroché à une pince mais tenu à la main au plus près de l'animal, les résultats sont, après filtrage, exploitables.

## Partie 3

# Étude de fichiers wav déjà enregistrés et mise en place d'une chaîne de traitement

### 3.1 État des lieux

Des enregistrements sous la forme de fichiers *.wav* ont déjà été enregistrés auparavant. Ceux-ci sont échantillonnés à 250kHz afin de conserver les harmoniques allant jusqu'à 125kHz : les souris vocalisent dans une gamme de fréquences allant d'environ 50 kHz à environ 100 kHz (ultrasons).

Deux groupes sont étudiés : un groupe de souris dites APP (modèle de la maladie Alzheimer) et des souris dites R6/1 (modèle de la maladie de Huntington).

La partie qui nous intéresse de ces enregistrements est leur spectrogramme, qui laisse déjà apparaître quelques motifs (figures 3.1 et 3.2). Les fréquences inférieures à 40 kHz avaient déjà été coupées pour des analyses précédentes : cela n'aura aucune influence sur l'étude menée.

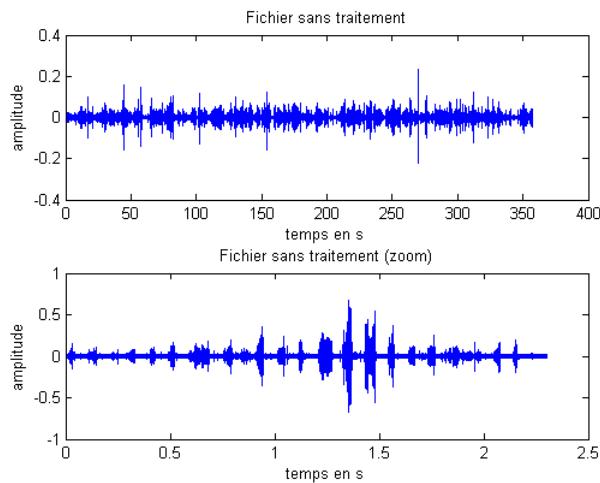


Figure 3.1: Allure temporelle des fichiers sans traitement

Les objectifs de cette partie sont les suivants :

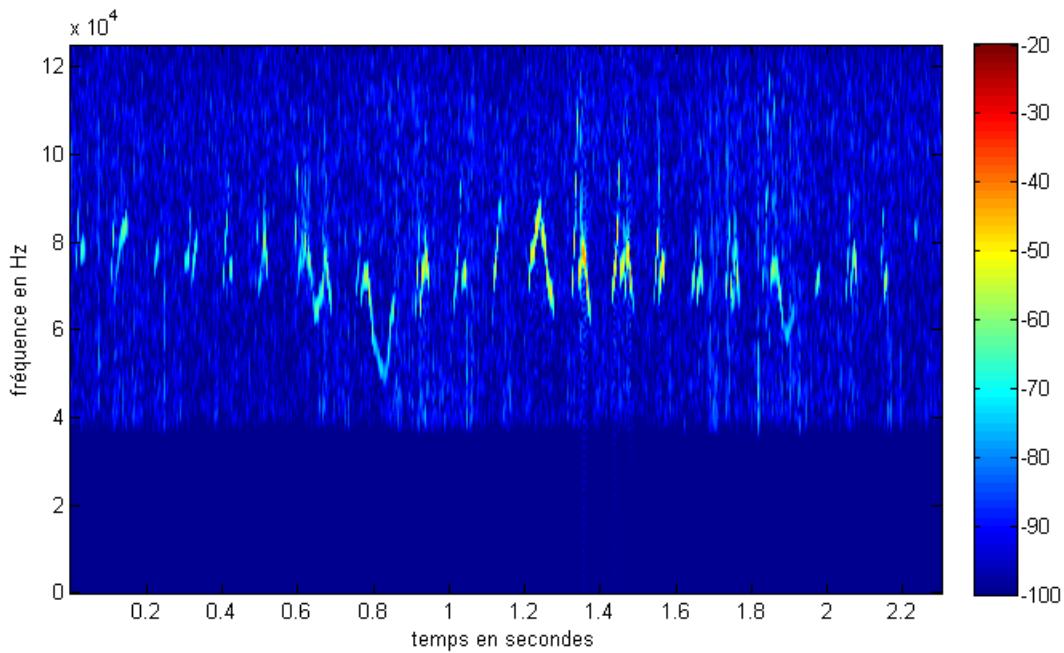


Figure 3.2: Spectrogramme de l'extrait sans traitement

- Découper les syllabes et les classifier
- Analyser les enregistrements selon des critères plus poussés que les publications lues : de nombreuses publications ont étudié les vocalisations ultrasonores des souris utilisant souvent des critères différents. L'objectif est donc de regrouper tous ces critères en une seule étude pour mesurer s'il existe des différences entre les souris WT et celle étudiées.

Les procédures de traitement du signal et les statistiques sont présentées dans les rapports en Annexe.

### 3.2 Pitch Shifting

Afin d'avoir une idée de ce que donnerai ces cris s'il étaient transposés dans l'audible, j'ai utilisé un script matlab permettant de transposer les vocalisations : les cris ressemblent fortement à des vocalisations d'oiseaux.

## **Partie 4**

# **Documentation scientifique (fichiers en annexes)**

### **4.1 Résumé de lectures**

Le document joint appelé "Résumé de lecture : Mice USV" synthétise et résume différentes lectures sur le sujet : ce document, réalisé au deux tiers du stage, n'est évidemment pas exhaustif et de nombreux autres documents, notamment cités dans les rapports de résultats, ont été lus et cités entre temps.

### **4.2 Rédaction de rapports de résultats**

Les deux documents "USV modifications in APP mice" et "USV modifications in R6/1 mice" reprennent l'ensemble des méthodes utilisées et les résultats obtenus. Ceux-ci serviront de support à la rédaction d'un article de portée plus général sur les génotypes considérés.

Les résultats contenus dans ces documents ont été présenté à l'équipe lors de la réunion hebdomadaire du laboratoire.

### **4.3 Rédaction de notices pour l'équipe**

Le document joint "Notice technique" est la notice technique laissée à l'équipe afin d'utiliser les outils d'analyse des vocalisations.

## Partie 5

# Mise en perspective

Ce stage m'a permis de découvrir le monde de la recherche et son fonctionnement.

Il a été l'occasion de mettre à profit de nombreuses compétences apprises à l'ENSEA parmi lesquelles :

- le traitement numérique du signal
- la maîtrise de Matlab
- l'acoustique
- les statistiques

De plus, cela m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences :

- rédaction d'un compte rendu scientifique semblable au articles publiés dans les revues
- manipulation d'animaux hors du cadre d'expérimentation
- travail au sein d'une équipe de recherche
- comparaison de résultats avec la littérature
- rigueur lors de l'expérimentation scientifique

Plus que les quelques compétences citées ci-dessus, ce stage a surtout montré qu'un ingénieur issu de l'ENSEA, quelque soit sa spécialité, est capable de s'adapter à son environnement de travail, quel qu'il soit, et de trouver des solutions aux problématiques qui lui sont posés.