



UNAMUR - UCLouvain

Variabilité dans les capacités d'apprentissage, et lien avec la personnalité et les mécanismes épigénétiques chez le rivulus des mangroves (*Kryptolebias marmoratus*)

DELACOUX Mathilde

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Promoteur:
SILVESTRE Frédéric

Encadrante:
CHAPELLE Valentine

URBE - Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive
LEAP - Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology

Année académique 2019-2020

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier du fond du coeur mon promoteur Frédéric Silvestre et mon encadrante Valentine Chapelle, pour le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de cette année, malgré les circonstances compliquées, pour leur précieux conseils et les idées/pensées qu'ils m'ont partagées.

Je voudrais également dire merci à tous les membres de l'équipe LEAP de m'avoir accueillie dans le labo, pour leur bonne humeur en tout circonstance, et pour avoir donné des réponses à certaines de mes questions. Je voulais tout particulièrement remercier Jérôme, qui a passé beaucoup de temps à courir partout, et m'a bien épaulée lors des manip moléculaires.

Je remercie également toute ma famille et mes amis, de m'avoir soutenue durant ce mémoire, malgré qu'ils n'aient pas toujours trop bien compris ce que je faisais :p. Et je voulais particulièrement remercier Simon d'être là.

Enfin, un tout grand merci à *Kryptolebias marmoratus* pour toutes les énigmes, résolues et non résolues, qu'ils m'ont posées, à la beauté fascinante de leur complexité, et de s'être (plus ou moins) laissés étudier dans le cadre de ce mémoire.

Liste des abréviations

A = adénine (nucléotide)
A_{Habituation} = apprentissage lors du test d'habituation
A_{SpatialChoix} = apprentissage spatial se basant sur le choix de la chambre
A_{SpatialTemps} = apprentissage spatial se basant sur les pentes de temps passé dans chaque chambre
ACP = analyse en composantes principales
ADN = acide désoxyribonucléique (=DNA)
ARN = acide ribonucléique (=RNA)
ARNm = ARN messenger
Bdnf = brain derived neurotrophic factor (gène)
B[a]P = Benzo[a]pyrène
BPS = bisphénol S (perturbateur endocrinien)
C = cytosine (nucléotide)
cAMP = adénosine monophosphate cyclique
Cbp = CREB binding protein (gène)
Cfp1 = CXXC finger protein 1 (gène)
CpG = cytosine-phosphate-guanine
Creb1 = cAMP responsive element binding protein (gène)
Crh = corticotropin releasing hormone (gène)
DNMT = DNA méthyltransférase (famille d'enzymes impliquées dans l'épigénétique)
Dph = days post-hatching (nombre de jours après éclosion)
Egr1 = early growth response 1 (gène)
Erk = extracellular-signal regulated kinase (gène)
G = guanine (nucléotide)
Gabrb2 = gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor $\beta 2$ (gène)
Gadd45b = growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (gène)
Glr1 = glutamate receptor (gène)
Grin1b = Glutamate [NMDA] receptor subunit zeta-1 (gène)
HAT = histone acétyltransférase (famille d'enzymes impliquées dans l'épigénétique)
HDAC = histone désacétylase (famille d'enzymes impliquées dans l'épigénétique)
K⁺ = ion potassium
Mecp2 = methyl-CpG-binding protein (gène)
miRNAs = microARNs, ARN non codant
NCBI = National Center for Biotechnology Information
NMDA = acide N-méthyl-D-aspartate
Nmr1 = NMDA glutamate receptor (gène)
PCR = Polymerase chain reaction
Pp1 = protein phosphatase 1 (gène)
Ppt = partie par trillion (nombre de gramme de sel par litre)
Setd5 = SET domain containing 5 (gène)
T = thymine (nucléotide)
TET = Ten-eleven-translocation (famille d'enzymes impliquées dans l'épigénétique)
URBE = unité de recherche en biologie environnementale et évolutive

Résumé

Chez de plus en plus d'espèces, on observe des variations de comportement entre les individus répétables au cours du temps, appelées personnalités animales. Ces personnalités peuvent parfois être corrélées en ce qu'on appelle des syndromes comportementaux. Mais on remarque également que ces traits de personnalités peuvent également être corrélés à de la variation dans les capacités d'apprentissage chez les individus. De plus, il existe plusieurs types d'apprentissage et de mémoire, qui ne sont pas nécessairement tous affectés de la même manière par la personnalité, et ces types pourraient même également être corrélés entre eux. Ces corrélations entre personnalité et cognition et entre les types de cognition forment les syndromes cognitifs.

Des traits de personnalité et de cognition, ainsi que leur variabilité et de potentiels syndromes ont été recherchés lors de cette étude chez *Kryptolebias marmoratus*. Cela a permis de montrer une corrélation positive entre l'audace, l'activité, une plus faible attirance envers un abri, ainsi que l'utilisation de défenses dites "actives" en cas de menace. Cependant, aucune corrélation n'a été observée entre les mesures d'apprentissage et les traits de personnalité. Cela est important dans un contexte écologique et évolutif, car les comportements ont une influence sur l'adaptation d'un individu à son environnement, et ces syndromes peuvent corréler des traits qui ont des valeurs adaptatives possiblement opposées. Ces observations peuvent être reliée à l'autécologie du rivulus des mangroves. En effet, il s'agit d'une espèce vivant dans le milieu très changeant des mangroves, et les individus doivent être capables de résister à de grandes variations dans les conditions environnementales. Il est donc possible que certains syndromes aient été décorrélés par pression de sélection.

Une autre caractéristique importante chez cette espèce est qu'elle se reproduit principalement par autofécondation, permettant la création de lignées isogéniques dont la variabilité génétique est presque nulle. Cela permet de vérifier si la variabilité dans le taux de méthylation des CpG certains gènes pourrait être corrélée à la variabilité dans les capacités d'apprentissage, sans une possible interaction avec la génétique. Les résultats ne montrent aucune corrélation ayant un impact biologique pour les CpG des séquences étudiées de *bdnf*, *egr1*, *grin1b* et *mecp2*. Cependant, on observe une très grande variation interindividuelle dans la méthylation des CpG pour la séquence étudiée de *mecp2*, qui ne semble liée à aucun des traits de comportement mesurés. Ce gène étant lié à des dysfonctionnements neurologiques chez l'homme, il serait intéressant d'investiguer le rôle de *mecp2* chez le rivulus, afin de mieux comprendre son fonctionnement chez les êtres humains.

Abstract

In more and more species, we observe behavioural variations between individuals, that can be repeated over time, called animal personalities. These personalities can sometimes be correlated into what are called behavioural syndromes. But we recently noted that these personality traits can also be correlated with variation in individuals' learning abilities. In addition, there are several types of learning and memory, which are not necessarily all affected in the same way by personality, and these types may even be correlated with each other. These correlations between personality and cognition and between types of cognition form cognitive syndromes.

Personality and cognition traits, as well as their variability and potential syndromes were investigated in this study in *Kryptolebias marmoratus*. In this species, we could find a positive correlation between boldness, activity, lower attraction to shelter, and the use of so-called "active" defenses when threatened. However, no correlation was observed between the measures of learning and personality traits. This is important in an ecological and evolutionary context, as behaviours influence an individual's adaptation to its environment, and these syndromes may correlate traits that have possibly opposite adaptive values. These observations can be related to the autecology of the mangrove rivulus. Indeed, this species is living in mangroves, a highly changing environment, and individuals must be able to withstand wide variations in environmental conditions. It is therefore possible that some syndromes may have been decorrelated by selection pressure.

Another important characteristic of this species is that it reproduces mainly by self-fertilization, allowing the creation of isogenic lines with almost no genetic variability. This makes it possible to verify whether the variability in the rate of CpG methylation of certain genes could be correlated with variability in learning abilities, without any possible interaction with genetics. The results show no correlation with biological impact for the CpG of the studied sequences of *bdnf*, *egr1*, *grin1b* and *mecp2*. However, a very large inter-individual variation in CpG methylation is observed for the studied sequence of *mecp2*, which does not seem to be related to any of the measured behavioural traits. As this gene is linked to neurological disorders in humans, it would be interesting to investigate the role of *mecp2* in the rivulus, in order to better understand how it works in humans.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Mémoire et apprentissage	1
1.1.1	Types d'apprentissages et de mémoires	1
1.1.1.1	Types d'apprentissages	1
1.1.1.2	Types de mémoires	4
1.1.2	Processus d'apprentissage et mémorisation	6
1.1.2.1	Acquisition de l'information et apprentissage	8
1.1.2.2	Mémoire à court et long terme et consolidation	10
1.1.3	Syndromes cognitifs	12
1.1.4	Apprentissage, mémoire et environnement	15
1.2	Epigénétique et rôle dans la cognition	19
1.2.1	Méthylation, déméthylation et hydroxyméthylation de l'ADN	19
1.2.1.1	Mécanismes	19
1.2.1.2	Rôles dans la cognition	20
1.2.1.3	Etat des connaissances chez les poissons	23
1.2.2	Modification des histones	24
1.2.3	MicroARNs interférents	25
1.2.4	Gènes d'intérêts	26
1.3	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	28
1.3.1	Présentation de l'espèce	28
1.3.2	Intérêt de l'espèce	28
2	Objectifs du mémoire	31
3	Matériel et méthodes	32
3.1	Design expérimental	32
3.2	Elevage	33
3.3	Tests cognitifs	33
3.3.1	Test 1: habituation	33
3.3.2	Test 2: apprentissage spatial	34
3.3.3	Analyses avec Ethovision	35
3.3.4	Calcul de l'apprentissage	36
3.3.4.1	Mesure de l'habituation	36
3.3.4.2	Mesure de l'apprentissage spatial	37
3.3.4.3	Mesures de traits de personnalité	38
3.4	Tests épigénétiques	40
3.4.1	Euthanasie et dissection	40
3.4.2	Extraction d'ADN	41
3.4.3	Gènes étudiés et design des primers	42
3.4.4	Traitement bisulfite	43
3.4.5	PCR	43
3.4.6	Pyroséquençage	44
3.5	Analyse statistique	45
3.5.1	Conditions d'application	45
3.5.2	Tests statistiques	45
4	Résultats	47
4.1	Tests cognitifs	47
4.1.1	Habituation	47

4.1.2	Apprentissage spatial	47
4.1.2.1	Contrôles de fiabilité du test	47
4.1.2.2	Résultats d'apprentissage	48
4.1.3	Syndromes comportementaux et cognitifs	49
4.1.3.1	Constance des traits de personnalité	49
4.1.3.2	Analyse en composante principale sur l'ensemble des comportements à valeur numérique et corrélations entre comportements	50
4.1.3.3	Modèles expliquant l'apprentissage par l'ensemble des comportements	54
4.2	Tests épigénétiques	55
4.2.1	Contrôles	55
4.2.2	Résultats du pyroséquençage	56
4.2.3	MeCP2	58
4.2.3.1	ACP comprenant le taux de méthylation moyen de <i>mecp2</i>	58
4.2.3.2	Corrélations entre le taux moyen de méthylation de <i>mecp2</i> et la réponse à un stress	60
5	Discussion	62
5.1	Comportement durant les tests, variabilité entre individus et syndromes cognitifs	62
5.1.1	Interprétations des résultats d'apprentissage	62
5.1.2	Constance dans les traits de personnalité observés	64
5.1.3	Variabilité entre les individus: intérêt écologique et évolutif	66
5.1.4	Syndromes comportementaux et cognitifs: importance écologique et évolutive	69
5.1.4.1	Syndromes observés	69
5.1.4.2	Impact des syndromes sur l'écologie et l'évolution	72
5.1.4.3	Comportement, personnalité et syndromes chez le rivulus	73
5.2	Corrélations avec l'épigénétique	75
5.2.1	Variation de méthylation observée pour les CpG des séquences étudiées entre les individus à apprentissage rapide et lent	75
5.2.2	Variation dans la méthylation des CpG de la séquence de <i>mecp2</i> étudiée et corrélation aux comportements	78
6	Conclusion et perspectives	82
	Bibliographie	84
	Annexes	97
	Annexe 1 - Types et processus de cognition: compléments	97
	Annexe 2 - Protocole extraction ADN.	99
	Annexe 3 - Séquences étudiées et primers utilisés	100
	Annexe 4 - Protocole traitement bisulfite	102
	Annexe 5 - Protocole PCR	103
	Annexe 6 - Protocole pyroséquençage	104
	Annexe 7 - Résultats Nanodrop.	107
	Annexe 8 - Gels contrôles: protocole et vérification de l'extraction et de l'amplification d'ADN	109
	Annexe 9 - Valeurs de méthylation des CpG de <i>mecp2</i>	112
	Annexe 10 - Résumé des limitations.	113

1 Introduction

1.1 Mémoire et apprentissage

L'apprentissage (acquisition d'information) et la mémoire (stockage d'information), à l'image du cerveau, sont des traits très complexes, encore assez mal connus. Ils fascinent beaucoup, on peut notamment le constater de par l'intérêt porté à certaines maladies liées à la cognition, comme Alzheimer, ou aux troubles d'apprentissages. D'un point de vue biologique, ils ont de plus une grande valeur adaptative: ils peuvent permettre à un organisme de modifier son comportement à une échelle de temps nettement plus petite qu'une génération. On comprend donc qu'elle ne soit pas limitée au monde animal, les plantes et les champignons, même sans systèmes nerveux, ont aussi développé certaines formes simples d'apprentissage (Duijn 2017). La cognition est même probablement arrivée assez tôt dans l'évolution car les protistes (Duijn 2017), voire les bactéries (Lyon 2015) en sont peut-être également dotés. Cette ancienneté d'un point de vue évolutif et sa valeur adaptative a permis une grande diversité des formes de cognition.

1.1.1 Types d'apprentissages et de mémoires

Cette large gamme de fonctions et de mécanismes complique d'autant plus l'étude de l'apprentissage et de la mémoire. Pour cela, l'Homme a tenté de les classer en différents types et catégories. Cependant, ces classements se font sur de nombreux niveaux dont la définition varie parfois d'un chercheur à l'autre, et peuvent amener à des confusions et des erreurs. Il faut pour cela définir au mieux ces différents types d'apprentissages et de mémoires.

1.1.1.1 Types d'apprentissages

Il existe deux principaux types d'apprentissage : l'apprentissage social et celui via l'environnement. Concernant l'apprentissage social, l'individu apprend de ses congénères, souvent en regardant comment ceux-ci agissent face à une situation donnée (Duboscq et al. 2016). Il existe plusieurs sous-catégories d'apprentissages sociaux, qui ne seront cependant pas détaillés ici car cela ne fait pas l'objet de ce mémoire. Concernant le second type d'apprentissage, l'information provient de l'environnement non-social. L'individu apprend à reconnaître des objets qui l'entourent ainsi qu'à faire des liens, etc. Ces deux exemples correspondent à deux catégories décrites ci-dessous.

La reconnaissance d'objets correspond à de l'apprentissage non-associatif. Dans ce genre de cognition, il n'est pas nécessaire de faire des liens entre plusieurs objets ou concepts. Il se manifeste

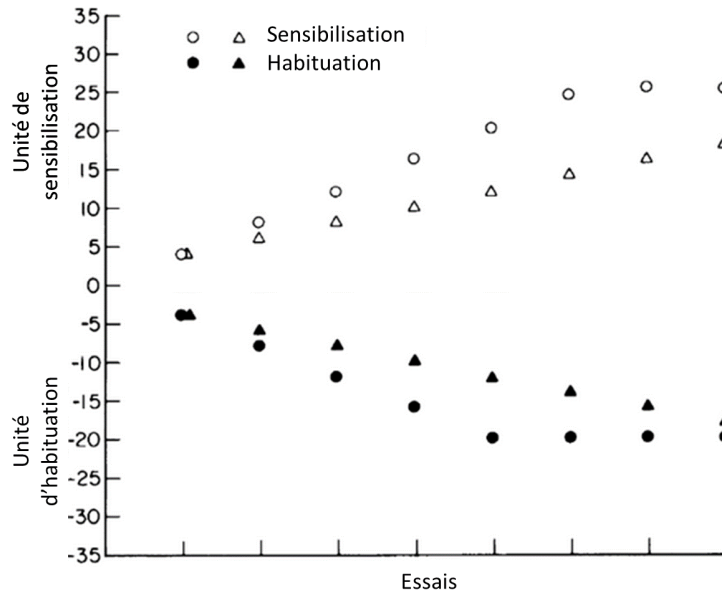


Figure 1: Représentation théoriques de l'habituation et de la sensibilisation en fonction de l'essai. Les formes noires correspondent à de l'habituation et les formes blanches à de la sensibilisation. Les ronds représentent la courbe attendue en cas de stimulus particulièrement nocif/inoffensif, et les triangles une nocivité/inoffensivité intermédiaire (modifié depuis Peeke 2012).

sous plusieurs formes : il peut s'agir, comme dans l'exemple, de reconnaissance d'objets, d'individus, d'une localisation (Naderi et al. 2020). Cela peut aussi être des processus d'habituation, qui correspondent à une diminution de la réponse d'un individu à un stimulus suite à une exposition répétée à ce stimulus (Best et al. 2008). Il existe aussi la forme opposée de l'habituation, qui est la sensibilisation. Dans ce cas, l'exposition répétée au stimulus, au lieu d'amoindrir la réponse, l'accroît (G. Kim, K.-S. Kim, and Lee 2018). Ces deux types d'apprentissages sont représentés sur la figure 1. Un stimulus va induire l'un ou l'autre, ainsi que moduler ces apprentissages en fonction du danger qu'il représente. S'il est nocif ou douloureux pour l'individu, la sensibilisation va l'emporter pour que l'individu évite ce désagrément à tout prix, alors que si au contraire, il n'induit aucun danger, une réponse est inutile, et elle sera au fur et à mesure annulée (G. Kim, K.-S. Kim, and Lee 2018).

La création de liens entre objets (le deuxième type) correspond à l'apprentissage associatif, qui, comme son nom l'indique, permet de faire des liens entre des situations, des objets et/ou des concepts. Lors d'expériences sur les animaux, on lie souvent une motivation, appelée stimulus inconditionnel à un signal ou à une action (J.-H. Wang 2019). Ce stimulus inconditionnel peut-être positif (apport de nourriture, contacts sociaux avec des congénères,...), ou négatif (arrivée d'un prédateur fictif, léger choc électrique,...) (Meshalkina et al. 2017). Il est divisé en deux types.

Lors du premier type, le conditionnement classique, ce stimulus inconditionnel est lié à un stimulus conditionnel (qui n'induit pas automatiquement une réponse (J.-H. Wang 2019)). Ce type d'apprentissage n'est pas étudié dans le cadre de ce mémoire, mais plus d'informations sont disponibles dans l'Annexe 1.

L'autre type d'apprentissage associatif, le conditionnement opérant, consiste en lier l'action d'un individu à un stimulus inconditionnel. Ici, le stimulus inconditionnel a un rôle de récompense ou de punition destiné à favoriser ou supprimer un certain comportement chez l'animal (J.-H. Wang 2019). Un exemple est l'apprentissage émotionnel, où l'on retrouve notamment la préférence et l'évitement de lieu conditionné (conditioned place preference/avoidance). Lors de ce genre de tests, à chaque fois que l'organisme va à un endroit précis de la zone de test, il est récompensé ou puni. L'individu modifie alors son comportement pour aller et rester à cet endroit, ou à l'inverse l'éviter. Un autre exemple de conditionnement opérant est l'apprentissage spatial, comprenant les labyrinthes, les tâches d'alternance spatial, etc. (N. J. Cohen, Poldrack, and Howard Eichenbaum 1997; Meshalkina et al. 2017). Ces tâches spatiales sont des sortes d'apprentissages relationnels complexes (Sison and Gerlai 2010), qui sont des apprentissages qui permettent par exemple de déterminer qu'A est plus grand que B (Dusek and Howard Eichenbaum 1997). Dans le cas des labyrinthes, il est plutôt question de relations spatiales entre les objets, de leur localisation et leur position relatives les uns par rapport aux autres. Il existe deux types d'apprentissages spatiaux. La navigation égocentrique est le processus par lequel l'acquisition des données spatiales est basée sur l'individu et sa localisation, alors que la navigation allocentrique se base sur la création d'une carte mentale, et est par conséquent plus flexible, mais aussi plus complexe (McAroe, Craig, and Holland 2016). Ces deux catégories d'apprentissages spatiaux sont représentés par la figure 2. Une grande différence entre le conditionnement classique et opérant est la notion de volonté. Dans le conditionnement classique, l'individu "subit" un signal, qui le prévient d'un événement à venir, alors que dans le conditionnement opérant, c'est le choix d'action de l'animal qui lui apportera la récompense ou la punition (J.-H. Wang 2019).

Déjà à ce niveau, la définition des termes utilisés varie en fonction des différents chercheurs. En effet, Meshalkina et al. 2017, article intitulé "Understanding zebrafish cognition", parlent de conditionnement classique sous le nom d'apprentissage associatif, qu'ils distinguent de l'apprentissage non-associatif et du conditionnement opérant. Ils n'incluent donc pas ce dernier dans les apprentissages associatifs.

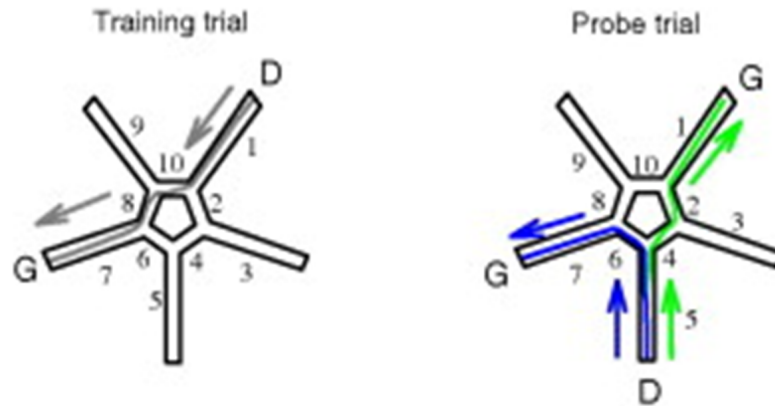


Figure 2: Différences entre apprentissage spatial égocentrique et allocentrique. A gauche, dans un labyrinthe en étoile, des individus apprennent lors de séances d’entraînement à trouver le point G (goal) à partir du point D (departure) selon le parcours gris. Lors du test, sur l’image de droite, ils sont placé sur un nouveau point D qu’ils ne connaissent pas. Les individus utilisant principalement une navigation allocentrique suivront le parcours bleu, et ceux utilisant une navigation égocentrique le parcours vert (issu de Bullens et al. 2010).

Il est également possible d’ajouter d’autres classes, comme la généralisation et la discrimination, qui consiste en l’association (ou non) de deux stimuli conditionnels similaires. Ceux-ci sont également détaillés dans l’Annexe 1.

1.1.1.2 Types de mémoires

La première distinction à faire est la mémoire à court et à long terme. La mémoire à court terme permet de retenir à l’identique une quantité limitée d’informations (Cowan 2001), sur une courte période de temps, probablement de l’ordre des secondes (Lynn Nadel and Hardt 2011). Il s’agit par exemple chez l’Homme de retenir une certaine séquence de nombres, de formes, de couleurs, pour ensuite la retranscrire quelques secondes plus tard (Swanson, Zheng, and Jerman 2009). Elle est similaire, mais pas identique, à la mémoire de travail, qui elle, ajoute une notion de discrimination des informations (Swanson, Zheng, and Jerman 2009), et fonctionne plus comme un ”espace de travail” dans lequel on choisirait ce qui est sélectionné ou non (Norris 2017). La mémoire à court terme est donc passive et la mémoire de travail active (Norris 2017). Cependant, certains scientifiques les considèrent équivalentes, comme J.-H. Wang 2019 ou Nee and Jonides 2013. La mémoire à long terme permettrait, à l’inverse, de se souvenir pendant plus longtemps de quelque chose (Lynn Nadel and Hardt 2011) et de stocker beaucoup plus d’informations (Cowan 2001). C’est cette mémoire qui nous permet de retenir des prénoms, des souvenirs d’enfance, des émotions, etc.

La mémoire peut également se diviser en mémoire associative et non-associative sur base des mêmes critères que ceux mentionnés ci-dessus pour l'apprentissage. Par exemple, la mémoire non-associative s'occupe du stockage des informations liées aux apprentissages non-associatifs (habituation, reconnaissance, etc.). Dans la mémoire à long terme associative, il est alors possible d'ajouter une nouvelle classification en mémoire explicite et implicite. La mémoire explicite, aussi appelée mémoire déclarative, est la mémoire consciente d'un organisme (Hampstead et al. 2011). Elle lui permet de se souvenir consciemment de faits ou de savoirs. A l'inverse la mémoire implicite, ou procédurale, est inconsciente (Schacter 1987). Elle permet d'utiliser l'expérience passée sans avoir besoin de s'en souvenir. Il s'agit de la mémoire qui nous rend capable de faire du vélo ou de lacer ses chaussures par exemple, sans devoir réfléchir consciemment à comment le faire.

Il est également possibles d'ajouter des classes dans les types de mémoire. J.-H. Wang 2019, par exemple, propose une organisation légèrement différente et ajoute de nombreuses autres catégories. Cependant, puisque celles-ci concernent principalement l'étude de la mémoire chez l'homme, et sont plus difficilement étudiable chez les animaux, celles-ci sont détaillées dans l'Annexe 1. Il est cependant intéressant de constater qu'il parle de notamment de mémoire spatiale parmi les différents types qu'il ajoute.

On constate de nombreux parallèles entre les types de mémoires et d'apprentissages. Le lien entre mémoire et apprentissage associatif/non-associatif a été mis en évidence ci-dessus. Mais il existe d'autres similitudes et connections au sein des classes : le phénomène de reconnaissance a un lien étroit entre l'apprentissage et la mémoire. L'apprentissage spatial peut également être mis en lien avec la mémoire spatiale. La figure 3 représente tous les types de mémoire et d'apprentissage ainsi que les principaux liens qu'il est possible de réaliser entre eux. Mais plus généralement, tout ce qui fait l'objet d'un processus de mémorisation a évidemment nécessité un apprentissage auparavant, et les concepts acquis par apprentissage doivent être stockés sous une forme de mémoire pour pouvoir être réutilisés ultérieurement. Il est donc logique que les deux concepts soient fortement liés.

Ces nombreux types d'apprentissage et de mémoire montrent que l'Homme a une forte tendance à classer ce qu'il observe dans des catégories afin de pouvoir les nommer. Mais ces catégories ont-elles un sens d'un point de vue biologique ? Représentent-elles des mécanismes réels, ou sont-elles totalement subjectives ?

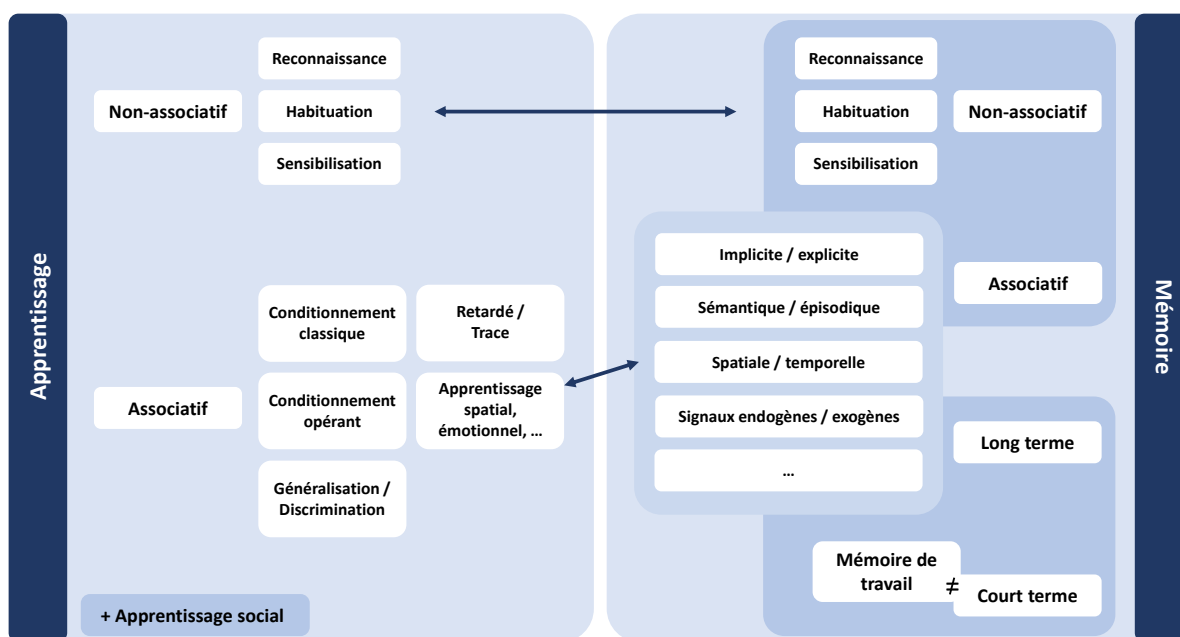


Figure 3: Différents types d'apprentissages et de mémoire et leurs interactions possibles. Pour plus de détails sur des types d'apprentissages et de mémoire non détaillés dans le texte, se référer à l'Annexe 1

1.1.2 Processus d'apprentissage et mémorisation

En comparaison à la moyenne des vertébrés, les poissons ont un cerveau relativement petit par rapport à leur taille (G. Roth 2013). De plus, étant à la base de l'arbre phylogénétique des vertébrés, on a longtemps pensé qu'ils ne possédaient qu'un cerveau assez simple et peu développé, que les structures complexes présentes chez les mammifères ne se seraient développées que longtemps plus tard dans l'évolution (Brown, Krause, and Laland 2011). On remarque en effet de nombreuses différences morphologiques et cytologiques entre les poissons et les amniotes, mais on retrouve cependant les mêmes zones principales. Le cerveau des téléostéens se divise en cinq grandes zones : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélencéphale (figure 4), aussi présents chez les vertébrés terrestres (Bshary, Gingins, and Vail 2014). Bien que l'organisation au sein de ces structures soient différentes, on retrouve souvent les mêmes origines développementales. Par exemple chez les actinoptérygiens, le tube neural au niveau du télencéphale subit au court du développement une éversion, alors que celui des non-actinoptérygiens, comme la grenouille subit une invagination, comme montré sur la figure 5 (Brown, Krause, and Laland 2011). Cela induit que les structures situées au cœur du cerveau chez la grenouille (la zone colorée en noir par exemple), auront possiblement un homologue situé en périphérie chez les poissons.

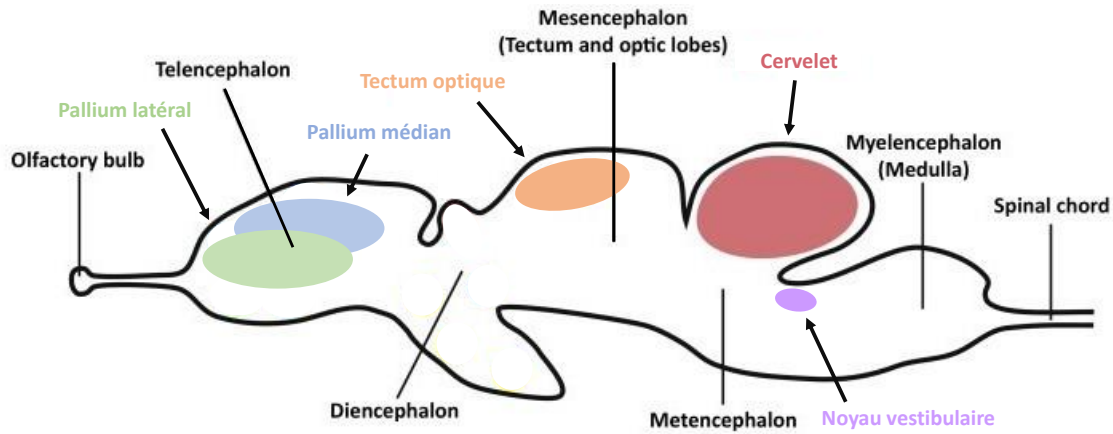


Figure 4: Schéma de cerveau de téléostéen (modifiée depuis Bshary, Gingins, and Vail 2014)

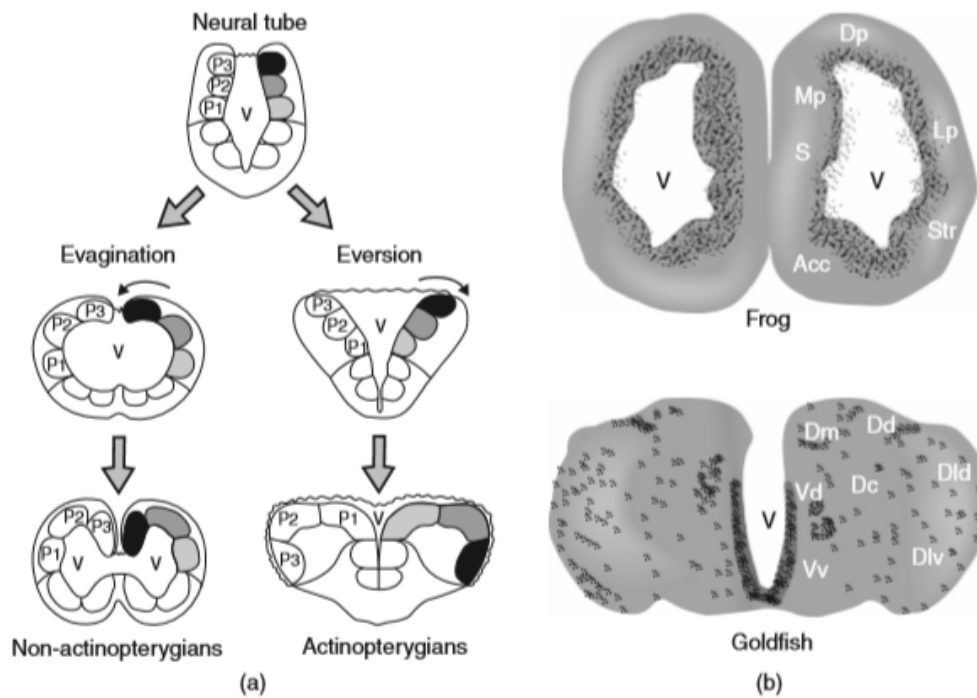


Figure 5: Schéma du développement du tube neural au niveau du télencéphale. (a) Comparaison du développement chez les actinoptérygiens et les non-actinoptérygiens. (b) Section coronale du télencéphale une fois développé chez la grenouille (non-actinoptérygien) et chez le poisson rouge (actinoptérygien), (Brown, Krause, and Laland 2011). Détail des abréviations: Acc, noyau accum-bens; Dc, division centrale de l'aire dorsale; Dd, division dorsale de l'aire dorsale; Dld, subdivision dorsale de la division latérale de l'aire dorsale; Dlv, subdivision ventrale de la division latérale de l'aire dorsale; Dm, division médiane de l'aire dorsale; Dp, zone postérieure de l'aire dorsale; Lp, pallium latéral; Mp, pallium médian; P1,P2,P3, trois subdivisions principales du pallium; S, noyaux septaux; Str, striatum; v, ventricule; Vd, noyau dorsal de l'aire ventrale; Vv, noyau ventral de l'aire ventrale.

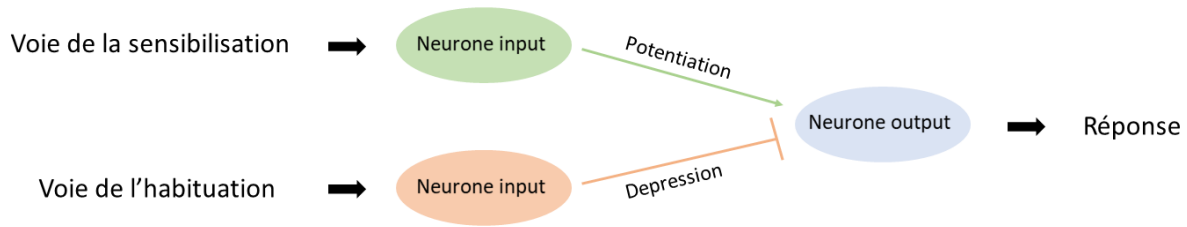


Figure 6: Schématisation de la théorie "dual process". Deux voies parallèles débouchent sur un neurone output. D'une part, la voie de la sensibilisation, qui va induire une potentiation à court terme sur ce neurone output, et d'autre part, la voie de l'habituation va induire une dépression à court terme. Le neurone output va intégrer l'ensemble des messages cellulaires, qui va induire une réponse plus ou moins forte de l'individu.

Les structures qui seront développées ici sont le télencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélencéphale car ce sont les principales zones impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. Le télencéphale comprend le pallium latéral et médian, le mésencéphale le tectum optique, le métencéphale le cervelet, et le myélencéphale le noyau vestibulaire (figure 4), qui sont tous impliqués dans des processus cognitifs.

1.1.2.1 Acquisition de l'information et apprentissage

La première étape de la formation de la mémoire est l'acquisition. Lorsqu'un événement se produit, il est alors directement encodé par le cerveau dans des zones différentes en fonction de l'information.

L'apprentissage non-associatif, comme l'habituation, implique le noyau vestibulaire chez le cochon d'Inde (G. Kim, K.-S. Kim, and Lee 2018), structure aussi présente chez les poissons (Ibsch, Anken, and Rahmann 2000). La théorie "dual process" (figure 6) décrit les mécanismes qui entrent alors en jeu. On y distingue deux voies parallèles de traitement de l'information. La première, celle de l'habituation, va impliquer une dépression à court-terme (short-term depression) sur un neurone cible, ce qui va diminuer la réponse de l'individu. La seconde va au contraire induire une potentialisation à court terme (short-term potentiation) sur ce même neurone cible, ce qui augmentera la réaction de l'organisme (sensibilisation) (Poon and D. L. Young 2006). Ces deux voies entrent donc en compétition directe pour induire ou non une réponse. L'intégration de l'information diffusée par les 2 voies sera modulée par des canaux K^+ voltage dépendants, qui contrôleront le niveau d'excitation du neurone, et donc le niveau de réponse de l'individu (Cai et al. 2009; Cotella and Sesti 2011).

De nombreuses zones différentes du cerveau sont impliquées dans l'apprentissage associatif. Le conditionnement classique nécessite par exemple des structures comme le cervelet et l'hippocampe (Woodruff-Pak and Disterhoft 2008; Brown, Krause, and Laland 2011) (dont les équivalents chez les poissons sont respectivement le cervelet et le pallium latéral (Brown, Krause, and Laland 2011)), ainsi que des voies différentes (Christian and Richard F. Thompson 2003; R. F. Thompson and Steinmetz 2009). Celles-ci sont détaillées dans l'Annexe 1.

L'hippocampe, ou le pallium latéral des poissons, est également une structure importante dans le conditionnement opérant. Il occupe en effet un grand rôle dans l'apprentissage spatial et relationnel (Sison and Gerlai 2010). H. Eichenbaum et al. 1994 suggèrent par exemple qu'une lésion grave au niveau de l'hippocampe est suffisante pour empêcher la formation de relations. L'apprentissage spatial, faisant partie des tâches relationnelles, est donc souvent très impacté par un hippocampe défectueux. Il est cependant important de différencier les deux types de cognition spatiale : la navigation égocentrique et allocentrique. La navigation allocentrique ne peut se faire sans hippocampe chez les vertébrés terrestres (Squire, Stark, and Clark 2004). Chez les poissons également, la lésion du pallium latéral ventral suffit à supprimer toute capacité de création de carte mentale (Rodríguez et al. 2002). Mais pour la navigation égocentrique, l'hippocampe n'est pas primordial. Ce sont plutôt le cervelet et le tectum optique (homologue du colliculus supérieur des mammifères) qui sont impliqués (B. Torres et al. 2005). L'ablation du tectum optique a d'ailleurs également d'autres effets: il change les patterns et diminue l'exploration chez les poissons touchés (Brown, Krause, and Laland 2011). Mais il est important de signaler qu'un individu n'utilise souvent pas soit l'un, soit l'autre, mais une combinaison des deux, et qu'il suffit donc qu'une seule des structures citées ci-dessus soit touchée pour affecter de manière plus ou moins forte l'apprentissage spatial et sa flexibilité (Brown, Krause, and Laland 2011). Pour l'apprentissage émotionnel, c'est une autre partie du télencéphale qui entre en jeu, le pallium médian (équivalent de l'amygdale des mammifères) (Johansen et al. 2011; Brown, Krause, and Laland 2011). Il s'agit probablement de la seule structure du télencéphale qui joue un rôle, car l'ablation du télencéphale complet a le même effet que des lésions au pallium médian seul (Portavella, Blas Torres, and Salas 2004). Il semblerait cependant que les corps cérébelleux des poissons, qui sont les probables homologues du vermis du cervelet, pourrait également jouer un rôle dans l'apprentissage émotionnel (Rodríguez et al. 2005).

Dans le cas de la généralisation et de la discrimination, à l'instar de l'habituation/sensibilisation, plusieurs voies sont intégrée par un neurone cible qui déclenchera la réponse apprise par apprentis-

sage associatif ou non (Barak, Rigotti, and Fusi 2013). Pour plus de détails, voir l’Annexe 1.

1.1.2.2 Mémoire à court et long terme et consolidation

Après avoir acquis les informations, il est nécessaire de les stocker. Cette étape, appelée consolidation de la mémoire, va déterminer ce qui est stocké et combien de temps prendra le processus (L. Nadel et al. 2012). Au niveau cellulaire, la formation de la mémoire se base principalement sur le postulat de Hebb. Celui-ci dit que lorsqu’un neurone excite un autre neurone de manière répétée ou persistante, des changements métaboliques se mettent en place dans l’un ou les deux neurones, qui permettent un déclenchement ultérieur plus efficace du neurone en aval (Hebb 1949). Cette première étape, appelée potentialisation à long terme et découverte par Bliss and Lømo 1973, va ensuite mener à une cascade de kinases et à la transcription de gènes impliqués dans la mémoire (Adams and Sweatt 2002; Johansen et al. 2011).

Il est cependant tout d’abord important de distinguer mémoire à court et long terme. En effet, il est parfois supposé que la mémoire à court terme ne soit qu’une forme d’activation temporaire de la mémoire à long terme. Mais dans certaines situations, une forme activée de mémoire à long terme ne peut faire seule le travail d’une mémoire à court terme différenciée (Norris 2017). Une autre preuve est le fait que certaines personnes ont une mémoire à court terme altérée, mais que leur mémoire à long terme fonctionne encore parfaitement (et inversement) (Norris 2017). Il y aurait donc un stockage d’information à court terme différent de celui à long terme (Atkinson and Shiffrin 1968). Cependant, cela ne signifie pas que ces deux stockages ne peuvent pas être tous les deux nécessaires lors d’une tâche et interagir (Atkinson and Shiffrin 1968). Par exemple, lors d’un apprentissage (qu’il soit implicite ou explicite), la répétition de l’activation de la mémoire à court terme peut mener à la formation d’une mémoire à long terme (Norris 2017). Les zones impliquées dans la formation et le stockage de ces deux types de mémoires sont probablement les mêmes, ce qui a contribué à leur confusion. En effet, le cortex préfrontal est impliqué dans le stockage des deux types de mémoire (Lewis-Peacock and Postle 2008; Cameron et al. 2005). Le cas du lobe temporal médian, qui comprends l’hippocampe, est plus compliqué, car certains auteurs affirment qu’il intervient dans les deux types de mémoires (Öztekin, Davachi, and McElree 2010), alors que d’autres pensent qu’il ne sert qu’à la mémoire à long terme (Lynn Nadel and Hardt 2011).

Il est connu que le cortex préfrontal joue un rôle fondamental dans le stockage de la mémoire à court terme (Bancroft et al. 2014). On pense que des neurones et des voies différentes sont em-

pruntées en fonction de la tâche demandée (Warden and E. K. Miller 2010), mais les mécanismes de stockage ne sont pas très bien connus. Il se pourrait que la mémoire à court terme agisse comme un "tampon" qui garde en mémoire pendant quelques temps les informations (Atkinson and Shiffrin 1968). La forme sous laquelle elles sont stockée pourrait être des copies de toutes les informations, mais une autre hypothèse de Norris 2017 propose que ce soit plutôt des "pointeurs" qui font chacun référence à une partie de la mémoire à long terme et ne nécessite donc pas de copier toute l'information qui y est associée. Il est cependant nécessaire que l'information soit déjà présente dans la mémoire à long terme.

Les zones du cerveau impliquées dans la mémorisation à long terme ont chacune un rôle différent dans les processus de mémorisation. Le lobe temporal médian aurait plutôt pour but d'intégrer les données récoltées par des différentes zones du cerveau impliquées dans la perception, pour ensuite les redistribuer, et servirait de liaisons entre les différentes parties. C'est ce que Lynn Nadel and Hardt 2011 appellent l'hypothèse du système de mémoire du lobe temporal médian. Elle sert donc de lien entre la perception et la mémoire, dans un sens (de la perception à la mémorisation), mais aussi possiblement dans l'autre (comment la mémoire influe sur la perception) (Lynn Nadel and Hardt 2011). L'hippocampe (et le pallium latéral des poissons) a un rôle particulièrement important dans ce système cérébral. Il est par exemple primordial pour la mémoire relationnelle (N. J. Cohen, Poldrack, and Howard Eichenbaum 1997; Dusek and Howard Eichenbaum 1997). Plus précisément, il semble très important dans la formation de la mémoire déclarative, comme pourrait le prouver le célèbre patient H.M., qui a perdu toute capacité de formation de mémoire explicite après une lésion de l'hippocampe et des structures environnantes (Scoville and Milner 1957). Ce rôle est cependant temporaire (Genzel and Wixted 2017) et ce n'est pas la seule structure impliquée dans ce processus. D'autres régions du néocortex sont sans doute associées au stockage de cette mémoire, et l'hippocampe ne servirait que d'intermédiaire entre les différentes régions et pour l'apport de nouvelles informations (Genzel and Wixted 2017). Bien que le néocortex soit absent chez les poissons, certaines régions du pallium pourraient remplacer cette structure (Saban et al. 2017) et avoir un rôle dans le stockage de cette mémoire déclarative. Le cortex préfrontal aurait plutôt comme objectif de stocker l'information et de faire la connexion entre la mémoire à court et long terme (Ghazizadeh, Hong, and Hikosaka 2018; Blumenfeld and Ranganath 2006). A l'inverse, l'hippocampe n'est pas impliqué dans la mémoire implicite (Barco, Bailey, and Kandel 2006; Kandel, Dudai, and Mayford 2014). Ce sont plutôt d'autres zones du cerveau, comme le cervelet, le striatum (l'aire ventrale du télencéphale chez les téléostéens (Wullimann and Mueller 2004)) et l'amygdale qui entrent alors

en jeu (Kandel, Dudai, and Mayford 2014). Une autre différence entre les deux, dans le cadre du système de la mémoire moteur, est que la mémoire implicite nécessiterait le cortex moteur primaire, alors que pour la mémoire explicite, ce serait plutôt le cortex prémoteur dorsal qui serait important (Kantak, Mummidisetty, and Stinear 2012). Les cascades de signallement, en revanche, semblent communes entre les mémoires implicite et explicite et sont très conservées au cours de l'évolution, depuis certains invertébrés aux mammifères (Barco, Bailey, and Kandel 2006). Cela laisse supposer que c'est également le cas chez le poisson.

Il existe donc bien plusieurs types de mémoires et d'apprentissages du point de vue de l'anatomie et/ou mécanisme. Des apprentissages comme les apprentissages spatiaux égocentrique et allocentrique, qui semblent très proches d'un point de vue comportement, nécessitent en fait des structures très différentes. Cependant, il existe des points communs, par exemple du point de vue moléculaire, entre mémoire implicite et explicite. On constate également que certaines régions, comme l'hippocampe, sont impliquées dans de nombreux types de mémoire et d'apprentissages, parfois très différents. Christian and Richard F. Thompson 2003 affirment même que certaines formes simples de conditionnement classique trace présentent des régions communes à celle de la formation de la mémoire explicite (hippocampe) et implicite (cervelet) en même temps. C'est ce qui fait toute la complexité de la création de classes dans la cognition.

1.1.3 Syndromes cognitifs

La présence de types de mémoires et apprentissages ayant une valeur d'un point de vue biologique suggère une chose importante. Les mécanismes qui les rassemblent en classes ont des différences et des points communs. Cela induit que ce qui peut affecter un certain type d'apprentissage ou de mémoire pourrait ou non également avoir un effet sur un autre. Il pourrait donc exister des liens entre certaines classes, mais pas entre d'autres.

Pour comprendre ce point, il est possible de faire un lien avec un autre aspect assez connu de l'éthologie : le concept de personnalité et de syndromes comportementaux. La personnalité animale consiste en des différences comportementales entre individus qui sont reproductibles dans le temps et dans des contextes différents (Sih, Bell, et al. 2004). Certains individus sont en effet naturellement plus explorateurs que d'autres, et cette différence est maintenue dans tous types de situations. En ce qui concerne les syndromes comportementaux, il s'agit d'une série de comportements corrélés qui sont exprimés soit au sein d'un même contexte comportemental (comme la prise de nourriture

dans des endroits différents) ou dans des contextes différents (corrélations entre des comportements de dispersion et des comportements de reproduction, par exemple) (Sih, Bell, et al. 2004). Pour certains types de comportements, il y a donc de la reproductibilité au sein des individus et des corrélations entre ceux-ci. Or, il serait possible de retrouver le même genre de corrélation pour l'aspect de l'éthologie qui nous intéresse, c'est-à-dire la cognition. Il se pourrait en effet que des individus aient de meilleures capacités d'apprentissage et de mémoire dans certains domaines. Cela permettrait de définir différents types "d'intelligence animale", qui seraient reproductibles au sein des individus, à l'instar de la personnalité pour les comportements. Cela a déjà été observé par Sommer-Trembo and Plath 2018, lors d'une étude sur un poisson, le molly (*Poecilia mexicana*). Ils parlent en effet dans cet article de différences interindividuelles constantes dans le temps pour un trait de cognition: l'apprentissage associatif. On pourrait également trouver des syndromes cognitifs qui corréleraient entre eux des traits de différents types d'intelligences. Guenther and Brust 2017 ont déjà montré ce phénomène chez le cochon d'inde, où l'on observe, dans leur expérience, non seulement des corrélation entre types de personnalité, mais aussi entre personnalité et cognition, et même entre types d'apprentissage (figure 7). Des relations semblables ont été retrouvées chez certains poissons: chez le bar *Micropterus salmoides*, il a été observé que les individus qui se faisaient capturés par des filets, c'est-à-dire les plus audacieux, étaient également ceux qui apprenaient le plus vite lors d'une tâche d'apprentissage associatif (Louison et al. 2019) (figure 8a). Une autre étude de Naderi et al. 2020 sur des zebrafish pourrait également suggérer l'existence de liens entre différents types de cognition chez les poissons. Dans cette étude, les poissons ont été mis en contact avec différentes concentrations en BPS, un perturbateur endocrinien, afin de voir les effets que la molécule pouvait avoir sur leur mémoire à long terme. Les résultats obtenus montrent que les effets de la molécule sont les mêmes pour la reconnaissance d'objets et la reconnaissance sociale (reconnaissance d'individus de la même espèce), mais que cet effet est différent pour un troisième type de mémoire: la reconnaissance de la localisation des objets (figure 8b). Ils ne donnent cependant pas de nom à ce phénomène. Ils suggèrent toutefois que cet effet pourrait être dû à un mécanisme similaire pour la reconnaissance d'objet et sociale mais que ce mécanisme est différent de celui de la reconnaissance de l'emplacement des objets.

On voit grâce à cela que si on peut relier les différents types de mémoires et apprentissages à certaines catégories grâce aux mécanismes dans le cerveau, cela pourrait également être le cas pour les liens qu'il y a entre eux. On peut observer pour deux types de mémoire différents des régions communes dans le cerveau, certaines molécules incluses dans plusieurs voies, voire des voies en partie

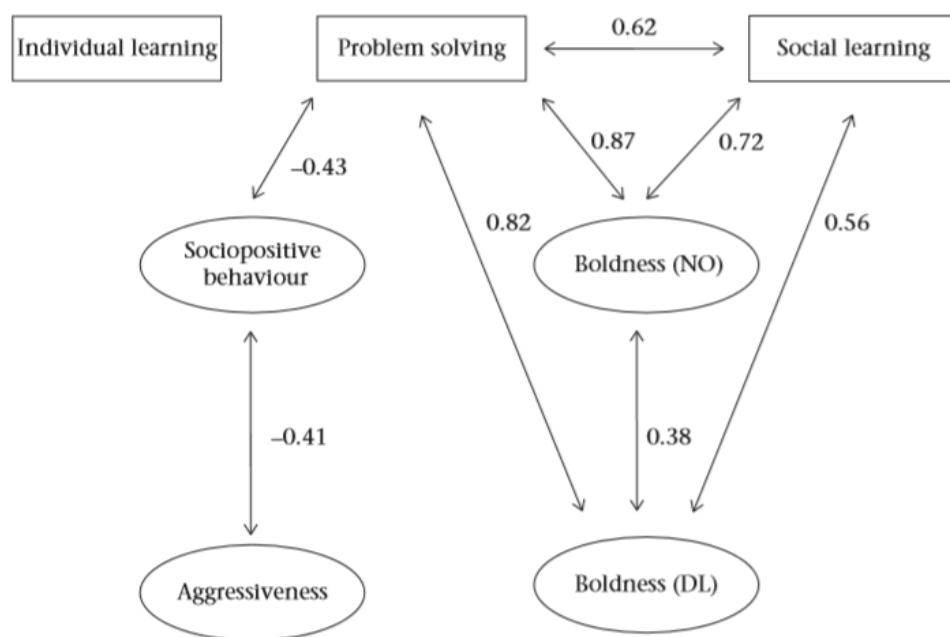


Figure 7: Corrélations entre traits de personnalité (ovales) et cognitifs (rectangles) chez le cochon d'inde. La présence d'une double flèche indique une corrélation significative et le chiffre à côté le coefficient de corrélation. (NO = novel object et DL = dark-light, noms de tests utilisés) (Guenther et Brust, 2017)

identiques. Une modification pour une des voies ou dans la partie du cerveau en question, pourrait alors avoir des conséquences sur les différents traits de cognition associés et donc, possiblement, les corrélés. C'est d'ailleurs ce qui se passe dans le cas des syndromes comportementaux, si un gène contrôle plusieurs traits (pléiotropie), les traits en question seront tous les deux affectés en cas de modification du gène ou de son expression. On peut également retrouver cette corrélation pour des hormones qui contrôlent plusieurs comportements ou une expérience dans la vie de l'individu qui affecte plusieurs traits du phénotype. Cela nous donne les trois principaux axes qui sont capables de créer des corrélations entre les différents traits comportementaux : la génétique, les effets neuroendocrines et les expériences environnementales. Il est également important de noter que ces 3 axes peuvent interagir entre eux (Sih, Bell, et al. 2004). Des mécanismes similaires pourraient intervenir dans la cognition et être responsables de potentielles corrélations entre les différents "types d'intelligence". C'est ce qu'on peut observer dans l'expérience de Naderi et al. 2020 : on se trouve dans la situation où un facteur de l'environnement (le BPS) affecte de la même manière certaines catégories de mémoire (ici de la reconnaissance), mais pas toutes.

Cependant, assez peu d'études ont été réalisées sur le sujet des syndromes cognitifs (seulement 176 résultats sur Scopus avec les mots clés "cognitive syndrome", contre 1898 pour "behavioral syn-

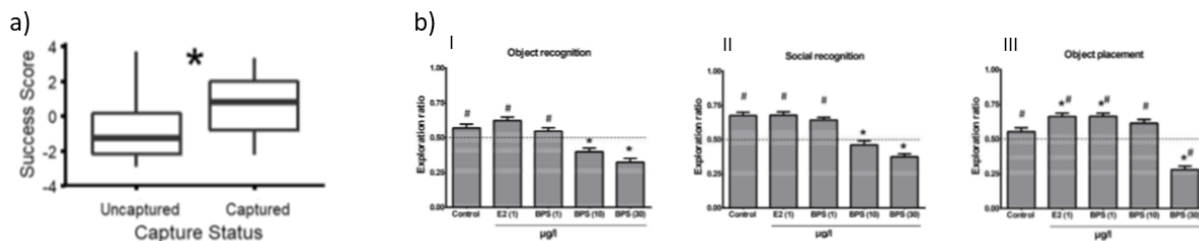


Figure 8: Résultats suggérant l'existence de syndromes cognitifs chez les poissons. a) Expérience sur *Micropterus salmoides* montrant que les individus capturés (audacieux) ont un score moyen de succès lors d'un test d'apprentissage associatif supérieur à ceux qui n'ont pas été capturés (timides). b) Résultats à des tests de reconnaissance sur *Danio rerio* en fonction de l'exposition à différentes concentrations en BPS. On observe que bI et bII (reconnaissance d'objet et reconnaissance sociale) suivent la même tendance en fonction de la concentration, alors que bIII (reconnaissance de placement d'objet) suit une tendance différente. Issus de a) Louison et al. 2019, et b) Naderi et al. 2020.

drome", le 25/04/2020), et la grande majorité porte sur l'étude de pathologies cognitives humaines, comme Alzheimer, Parkinson ou la démence (96%). L'étude de ce phénomène sur les animaux n'a commencé que très récemment (2014, pour la première source trouvée sur scopus). Pourtant, cette corrélation entre plusieurs traits est d'une importance capitale d'un point de vue écologique et évolutif. Pour donner un exemple dans les syndromes comportementaux, on peut imaginer une espèce pour laquelle l'agressivité et l'activité seraient corrélés positivement. Dans ce cas, l'agressivité pourrait être un trait avantageux, car il permettrait un meilleur accès à de la nourriture et à la reproduction. A l'inverse, l'activité peut réduire la survie des individus car les exposerait plus aux prédateurs. Nous nous retrouvons donc face à un trade-off, où un trait apparemment avantageux (ici l'agressivité) pourrait être contre-sélectionné à cause de sa corrélation avec l'activité, qui, elle, diminue nettement la fitness. Il en va de même pour la cognition. En effet, il pourrait exister une corrélation négative entre deux types d'apprentissage importants pour l'espèce, ce qui pourraient induire des phénotypes sous-optimaux individuellement, mais un trade-off optimal. On ne peut donc pas comprendre l'entière du mécanisme évolutif ou écologique sans tenir compte des possibles corrélations et trade-offs qui relient ces traits.

1.1.4 Apprentissage, mémoire et environnement

En plus de l'apprentissage et la mémoire développés précédemment, il existe également un troisième type de cognition situé plus en amont: la perception (Shettleworth 2009). Il s'agit de la détection et de l'internalisation des informations qui nous entourent via les sens. Il a déjà été mentionné que les sens et la perception étaient très liés à la formation de la mémoire. L'hippocampe, et plus

généralement le lobe temporal médian, a en effet un rôle probablement très important dans la connexion de ces deux types de cognition. Un premier rôle de l'environnement dans la mémoire est donc qu'il s'agit de la source même de l'information impliquée dans tout processus cognitif. Mais il peut également modifier plus en profondeur l'apprentissage et la mémoire en modifiant directement les mécanismes et les structures qui les composent.

Il est déjà mentionné plus haut que les syndromes comportementaux étaient influencés par l'environnement. Cela peut se faire de deux manières différentes. Si c'est assez tôt dans la vie de l'individu, l'environnement peut influencer directement son développement, ce qui aura plutôt tendance à créer des syndromes comportementaux (Sih, Bell, et al. 2004). Edenbrow and D. P. Croft 2013 montrent par exemple que des jeunes *Kryptolebias marmoratus* qui se sont développés en présence de congénères développent des comportements en moyenne nettement moins agressifs, téméraires et explorateurs, et forme donc une corrélation positive entre ces trois traits. Mais l'environnement peut également, par l'intermédiaire de l'expérience, renforcer, modifier ou diminuer les corrélations entre traits comportementaux, en fonction des situations auxquelles l'individu est exposé (Sih, Bell, et al. 2004). Une expérience de Suomi, Novak, and Well 1996 montre en effet que malgré une certaine constance dans le comportement de singes rhésus, on retrouve toutefois certains changements au cours de la vie des individus. On voit donc que l'environnement influence le comportement. Or, il a été trouvé chez le poisson *Micropterus salmoides* que le comportement et la personnalité pouvait être corrélé à la cognition (Louison et al. 2019). On y distingue dans cette étude les individus avec un tempérament très téméraires et qui apprennent vite, et des individus plus timides, dont les capacités d'apprentissages sont moins bonnes. La personnalité est donc chez ces animaux directement corrélée avec les capacités d'apprentissage. L'environnement pourrait donc influencer indirectement la cognition, par l'intermédiaire des syndromes comportementaux et de la personnalité.

Mais il serait possible, qu'à l'instar des syndromes comportementaux, l'environnement puisse modifier directement les traits cognitifs. En effet, chez l'épinoche *Gasterosteus aculeatus*, il a été trouvé que les individus vivant dans les rivières utilisaient majoritairement la navigation égocentrique pour s'orienter, alors que chez les individus vivant dans les étangs, c'était plutôt la navigation allocentrique qui primait (Girvan and Braithwaite 1998). Cela est probablement dû au fait que les rivières sont des milieux instables et changeants, dans lesquels la navigation allocentrique sera désavantagée, puisqu'elle se base sur les nombreux petits indices de l'environnement. Le poisson

va donc utiliser la stratégie d'apprentissage et de mémoire qui correspond le mieux au milieu dans lequel il vit. D'un point de vue neural, l'environnement va déterminer les zones du cerveau qui auront le plus de prolifération cellulaire (Ebbesson and Braithwaite 2012). Par exemple, S. S. Costa et al. 2011 montrent que les femelles blennies, ayant un territoire plus grand et donc un environnement spatial plus complexe, ont également un pallium latéral plus grand que celui des mâles. Plus globalement, on constate qu'en milieu artificiel, lorsque les poissons sont élevés dans un milieu plus complexe, présentant par exemple des enrichissements, ils développent de meilleures capacités d'apprentissage et de mémoire (Ebbesson and Braithwaite 2012). En effet, même chez l'Homme, il est important de stimuler le cerveau pour garder de bonnes capacités cognitives. Une hypostimulation, comme c'est souvent le cas dans les milieux artificiels, a pour résultat de diminuer la taille globale du cerveau, par exemple, chez la morue *Gadus morhua* (Mayer et al. 2011). Les expériences vécues par l'individu peuvent également modifier les capacités d'apprentissage. Des événements traumatiques, provoquant des problèmes de cognition chez l'Homme (Ahmed, Alzoubi, and Khabour 2020), pourraient avoir également un effet chez certains animaux. Une expérience de Chang et al. 2012 chez *Kryptolebias marmoratus* montre par exemple que le fait de gagner un combat peut améliorer les capacités d'apprentissages en comparaison avec un individu qui aurait perdu.

Ensuite, l'environnement peut même être la cause directe de la corrélation entre les différents traits de cognition. L'expérience de Naderi et al. 2020 sur l'effet du BPS sur le zebrafish le montre déjà, mais ce n'est pas la seule. Le cannabidiol, par exemple, est connu pour augmenter les capacités de reconnaissance, mais aussi de mémoire de travail chez le rat, grâce à des effets neuroprotecteurs (Fagherazzi et al. 2012; Osborne et al. 2017). Mais il peut également être responsable de dysfonctionnements cognitifs comme la schizophrénie chez les individus qui en consomment (Manseau and Compton 2018). Il est probable que ces expériences traduisent des effets différents d'une molécule sur les différents traits d'apprentissage et de mémoire, corrélant certains. On pourrait d'ailleurs également imaginer que, comme pour les syndromes comportementaux, l'environnement puisse avoir des effets sur le développement et provoque des corrélations entre différents types de mémoire et d'apprentissage. Par exemple, il pourrait favoriser le développement d'une zone du cerveau qui serait utile à plusieurs types de cognition.

Cet effet du milieu sur la cognition de l'organisme peut se faire à plusieurs niveaux. Tout d'abord, il peut agir directement par la sélection, car les individus dont les traits cognitifs ne

sont pas adaptés auront une chance de survie plus faible. L'effet de sélection influera sur le pool génétique de la population. Mais le génome n'est pas la seule chose qui déterminera les traits d'un individu, grâce à la plasticité phénotypique. L'environnement joue alors un second rôle. A l'instar des syndromes comportementaux, il pourrait agir sur le développement du cerveau, si l'évènement arrive suffisamment tôt dans la vie de l'individu. Mais même sur un animal entièrement développé, il pourrait influencer via l'expérience. Une piste qui pourrait aider à comprendre par quel moyen l'environnement influence le phénotype est l'épigénétique. Par exemple, McClelland et al. 2011 montrent que des stress répétés pouvaient augmenter l'expression de CRH (corticotropin releasing hormone) par ces mécanismes, ce qui déclenche la sécrétion de corticotropine. Celle-ci va ensuite induire la sécrétion de glucocorticoïdes, qui préparent au stress, mais peuvent également affecter le cerveau, et surtout la cognition. Dans un autre article de Takaki et al. 2020 montrent que la saison de naissance chez les souris pouvait influencer de nombreux traits, et notamment les capacités cognitives. Ils expliquent ce phénomène par le fait que la photopériode influence le taux de méthylation et d'hydroxyméthylation lors du développement, et que ceux-ci ont alors un effet sur les traits de l'individu.

De plus, d'autres mécanismes, comme la stochasticité, peuvent induire de la variation interindividuelle. Le hasard peut en effet modifier l'histoire de vie des individus, en affectant leur reproduction ou leur mort, ou impacter la population, par des fluctuations environnementales (Lenormand, Roze, and Rousset 2009). Ces deux caractéristiques vont permettre de conserver de la variabilité. Mais la stochasticité peut également être responsable de la variabilité elle-même par les mutations (Lenormand, Roze, and Rousset 2009) et les épimutations (Biewer et al. 2020). Ces épimutations peuvent avoir lieu lors de la gamétogenèse (pendant la méiose), de l'embryogenèse (lors du reprogramming) ou lors de la réplication cellulaire (si la méthylation existante est mal retranscrite), donc à tous les stades de la vie de l'individu (Biewer et al. 2020).

En conclusion, l'environnement et le hasard peuvent avoir de nombreux effets sur les mécanismes d'apprentissage et de mémoire, que ce soit par la perception, de manière indirecte et de manière directe. Cela peut se faire à plusieurs stades de la vie de l'individu, comme le développement ou plus tard, par l'expérience. Il n'y a donc pas uniquement les gènes qui détermineront les traits d'apprentissage et de mémoire d'un individu, et certains mécanismes comme l'épigénétique peuvent avoir une grande importance dans cette plasticité dans la cognition.

1.2 Épigénétique et rôle dans la cognition

L'épigénétique est l'étude des changements héréditaires dans l'expression des gènes qui ne sont pas dus à l'altération de la séquence d'ADN (Eccleston et al. 2007). Il s'agit du mécanisme qui permet, par exemple, à des cellules ayant le même génome d'avoir des fonctions et morphologies très différentes. L'environnement de la cellule va en effet pouvoir modifier à long terme l'expression de ses gènes et permettre la différenciation (Levenson and Sweatt 2005). Mais l'épigénétique peut également avoir des impacts importants sur d'autres traits, et notamment sur la fonction neurale. Elle joue un grand rôle dans le cadre du développement du système nerveux, du rythme circadien, des crises d'épilepsies, mais également dans la formation de la mémoire et la plasticité synaptique (Levenson and Sweatt 2005). Cela implique une chose importante: puisque ces changements épigénétiques peuvent être stables dans le temps, l'environnement peut influencer sur tous ces traits à long terme chez l'individu. Ils pourraient même dans certains cas être transmis aux générations suivantes, via l'hérédité épigénétique transgénérationnelle (Rassoulzadegan and Cuzin 2015). Une étude de Benito et al. 2018 montre en effet que l'amélioration de la cognition chez les souris par la présence d'enrichissements peut se transmettre à la descendance par le sperme grâce à l'épigénétique. Les effets épigénétiques de l'environnement sur la cognition semblent donc particulièrement importants d'un point de vue évolutif. Cependant, l'épigénétique n'aurait un rôle que dans la mémoire à long terme (Stilling and Fischer 2011). En effet, il semblerait que la synthèse de protéines n'ait lieu qu'assez tard dans la potentialisation à long terme (Frey and Morris 1998), et donc que la modification de l'expression de gènes n'ait effet que lors de processus plus long. Il existe trois types de mécanismes épigénétiques mais le plus étudié et le mieux connu est la méthylation de l'ADN.

1.2.1 Méthylation, déméthylation et hydroxyméthylation de l'ADN

1.2.1.1 Mécanismes

La méthylation de l'ADN est une modification covalente de l'ADN pendant laquelle une DNA méthyltransférase (DNMT) ajoute un groupement méthyle sur une cytosine (C. A. Miller and Sweatt 2007). Cela se produit souvent dans des îlots CpG (zones riches en cytosines suivies de guanines), mais il est aussi possible de trouver de la méthylation sur des cytosines isolées (Monti et al. 2020). De manière générale, cette méthylation va diminuer l'expression du gène sur, ou à proximité duquel elle est localisée, en empêchant la fixation de l'ARN polymérase II à l'ADN (Bird 2002; C. A. Miller and Sweatt 2007). Chez les mammifères, il existe trois familles de DNMTs, qui ont toutes au moins un orthologue reconnu ayant les mêmes fonctions chez les poissons (Mary G.

Goll and Halpern 2011; Shimoda et al. 2005). Parmi elles, deux ont un rôle dans la méthylation de l'ADN, les DNMT3, qui ajoutent *de novo* des groupements méthyles sur l'ADN, et les DNMT1, qui ont pour rôle de maintenir cette méthylation lors de la réplication (Siedlecki and Zielenkiewicz 2006). Les DNMT2 ont un rôle de protection des ARNs de transfert (Mary Grace Goll et al. 2006). Elles ne sont donc pas directement impliquées dans les modifications épigénétiques de l'ADN, mais il semblerait qu'elles aient tout de même une importance dans le développement des poissons, et notamment du cerveau (Rai, Chidester, et al. 2007). Il est important de noter que certaines régions de l'ADN peuvent être protégées de la méthylation par la fixation de la protéine Cfp1 (CXXC finger protein 1, dont il existe un homologue fonctionnel chez le zebrafish (S. R. L. Young et al. 2006)) sur les histones (Thomson et al. 2010).

Des gènes méthylés peuvent par la suite être déméthylés pour être à nouveau exprimés. Deux enzymes sont connues jusqu'à présent pour jouer ce rôle chez les mammifères: les protéines TETs (Ten-eleven-translocation) (Kaas et al. 2013) et GADD45b (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein 45) (Jeremy J. Day and Sweatt 2010). Ces protéines se retrouvent également chez le zebrafish (Chen et al. 2016; Ge et al. 2014), et ont bien un rôle dans la déméthylation (Y. Liu et al. 2016; Rai, Huggins, et al. 2008). Cependant, le processus de déméthylation par les protéines TETs s'arrête parfois avant la fin, donnant une cytosine hydroxyméthylé. Ces hydroxyméthylcytosines sont présentes chez de nombreux organismes, dont les mammifères (Kriaucionis and Heintz 2009; Tahiliani et al. 2009), les oiseaux (Ciccone et al. 2017) et les reptiles (Venegas et al. 2016), mais aussi les amphibiens, les poissons (Diotel et al. 2017) et même chez la drosophile (Shen et al. 2018). L'hydroxyméthylation aurait aussi un rôle dans la régulation des gènes, mais contrairement à la méthylation de l'ADN, elle aurait tendance à en favoriser l'expression (Uribe-Lewis et al. 2020; Lio et al. 2020). Cela se ferait en modifiant la compaction de la chromatine et en aidant à la fixation de facteurs de transcription chez les mammifères (Iurlaro et al. 2013; Lio et al. 2020). En plus d'un possible rôle dans les cancers (Kroeze, Reijden, and Jansen 2015; Salgado et al. 2020), elle aurait également une importance dans le développement et la plasticité neural ainsi que dans la cognition (Fan, Sun, and L. Liu 2018; Antunes et al. 2019), et jouit donc d'un intérêt grandissant dans la communauté scientifique.

1.2.1.2 Rôles dans la cognition

La méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN sont particulièrement importantes dans la cognition. En effet, on sait que ces modifications épigénétiques jouent un très grand rôle dans le

développement embryonnaire et dans la différenciation cellulaire, notamment lors du développement neural (Santiago et al. 2014). On sait par exemple qu’une exposition à certains composés pendant le développement peut entraîner la méthylation de certains gènes importants à la formation du cerveau, comme *bdnf* (Brain Derived Neurotrophic Factor), ce qui va modifier le comportement et la cognition de l’individu touché (Lester et al. 2011).

On sait aussi qu’il y a synthèse de protéines lors de la formation de la mémoire à long terme et de sa consolidation (Frey and Morris 1998), et que ces modifications d’expression des gènes sont au moins en partie dues à l’épigénétique. C. A. Miller and Sweatt 2007, ont en effet montré que le taux de méthylation global dans l’hippocampe avait augmenté une heure après un test ”fear conditioning” (sorte d’apprentissage émotionnel) pour ensuite revenir à un taux normal après 24h. Cela peut sembler contre-intuitif de diminuer l’expression des gènes lors des processus d’apprentissage, qui est un processus actif, mais on peut expliquer ce phénomène de plusieurs manières. Tout d’abord, il est nécessaire de supprimer l’expression des gènes suppresseurs de mémoire, comme PP1 (Protein phosphatase 1) (C. A. Miller and Sweatt 2007; Lester et al. 2011; Molfese 2011; Schafe 2016). Ensuite, la méthylation de l’ADN est probablement très liée à l’acétylation des histones, qui a pour effet d’augmenter la transcription (C. A. Miller, Campbell, and Sweatt 2008; Schafe 2016) (les modifications d’histones seront détaillées plus loin). De plus, les méthylcytosines peuvent recruter MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2). Cette protéine peut recruter des HDACs (histone desacetylase), qui vont favoriser la condensation de la chromatine et diminuer l’expression des gènes, mais va également parfois recruter CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1), qui lui favorise plutôt la transcription (Schafe 2016). Enfin, bien que le taux global de méthylation augmente dans l’hippocampe, certains gènes promoteurs de mémoire seront quand même déméthylés pour être plus exprimés. C’est le cas par exemple de la *reelin*, impliquée dans la migration des neurones et la plasticité neurale (Jeremy J. Day and Sweatt 2010; Kiroski et al. 2020), et de *bdnf*, également impliquée dans la plasticité neurale (Jeremy J. Day and Sweatt 2010). Ainsi, d’une part, un faible taux de méthylation mènerait à des problèmes mentaux et d’autre part, un taux de méthylation élevé ne permettrait pas d’exprimer les gènes nécessaires à la mémorisation, pouvant causer des dysfonctionnements cognitifs (Molfese 2011). Il faut donc un juste équilibre entre les deux.

Juste après cette première étape de formation de mémoire dans l’hippocampe, il y a la consolidation. Celle-ci nécessite aussi de la transcription et de la synthèse de protéines (Johansen et al. 2011). Ce stockage des informations à long terme a probablement lieu dans le cortex cingulaire

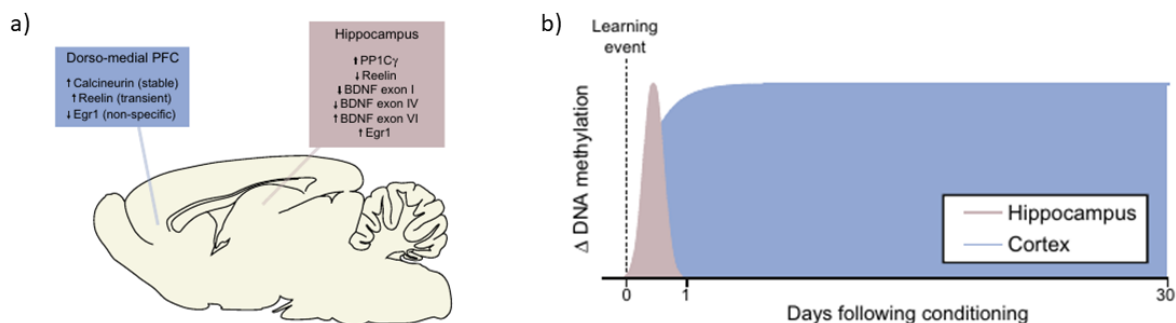


Figure 9: Changements de méthylation dans la cognition. a) Principaux gènes impliqués dans la formation et le stockage de la mémoire, ainsi que la localisation des changements de méthylation en fonction de la zone dans le cerveau de rat. PFC = Cortex Préfrontal; $\uparrow$ = le taux de méthylation augmente; $\downarrow$ = le taux de méthylation diminue. b) Taux de méthylation dans l'hippocampe et dans le cortex en fonction du temps (C. A. Miller, Gavin, et al. 2010)

antérieur (Frankland et al. 2004). C. A. Miller, Gavin, et al. 2010 y ont en effet observé, lors d'un test de fear conditioning, une élévation du taux de méthylation du gène *calcineurin* à partir d'un jour après le test et pour au moins les 30 jours suivants. De plus, lorsque des inhibiteurs de DNMTs ont été injectés après les 30 jours, réaugmentant l'expression du gène, la mémoire a été sérieusement altérée. Cela indiquerait un rôle important de la Calcineurine dans le stockage de la mémoire. Mais ce n'est probablement pas le seul gène impliqué: le même article montre que *Egr1/zif268* (Early growth response protein 1, aussi appelé zinc finger protein 268) a été, à l'inverse, déméthylé pendant cette même période. Pour ce qui est de la *reelin*, elle a été méthylée lors de la première heure, puis est revenue à un taux de méthylation normal par la suite. Ces deux premières étapes de formation de mémoire et de consolidation sont illustrées par la figure 9.

L'hydroxyméthylation est également très importante dans la formation et la consolidation de la mémoire. En effet, des souris dont le gène *tet1* est knockout montrent des problèmes d'apprentissage et de mémoire (Zhang et al. 2013). De plus, une augmentation de l'expression des TETs dans le cerveau permet de lutter contre les dysfonctionnements cognitifs liés à l'âge, comme Alzheimer (Griñán-Ferré et al. 2019; Gontier et al. 2018). La principale protéine qui se lie aux hydroxyméthylcytosines est MeCP2 (Mellén et al. 2012), mais ce n'est pas la seule (Spruijt et al. 2013). Certaines molécules sont donc communes aux deux modifications, qui ont pourtant des effets opposés. Les processus et mécanismes doivent donc être finement régulés et la bonne modification doit être faite au bon gène, pour que la formation de la mémoire se passe correctement. Donc, en plus des modifications épigénétiques des gènes des protéines impliquées dans la mémoire, il faut également que les gènes régulateurs de ces modifications soient exprimés correctement.

Mais la mémoire à long terme est un processus dynamique. Les souvenirs peuvent être réexprimés par l'individu lorsqu'il se retrouve dans une situation similaire et ils peuvent alors être modifiés, reconsolidés ou s'éteindre (Schafe 2016). Ces phénomènes impliquent les mêmes principes moléculaires, les mêmes mécanismes et les mêmes gènes que la formation de la mémoire, comme si lors de ceux-ci, il y avait un nouvel apprentissage (Schafe 2016; Stafford and Lattal 2011). Par exemple, lors d'une extinction de mémoire, les protéines HDAC vont être inhibées, comme lors d'une inhibition de la formation de la mémoire (Schafe 2016). On peut également citer la protéine TET1, qui lorsqu'elle est absente, provoque non seulement des problèmes de mémoire (Zhang et al. 2013), mais également des problèmes d'extinction de mémoire (Rudenko et al. 2013). Tous ces processus jouent un grand rôle dans la plasticité de la mémoire, et sont donc très importants d'un point de vue évolutif (Herry et al. 2010).

1.2.1.3 Etat des connaissances chez les poissons

Cependant, les expériences et leurs résultats discutés précédemment concernent les mammifères, principalement des rats et des souris. En effet, il existe très peu d'études sur les liens entre l'épigénétique et les processus d'apprentissage et de mémorisation chez les poissons, et aucune ne montre réellement une relation de causalité. Par exemple, une exposition au B[a]P (benzo[a]pyrene), réduit le taux de méthylation global chez le zebrafish en réduisant l'expression des DNMTs pendant plusieurs générations, et cause en parallèle une diminution des capacités d'apprentissage chez ces poissons (Knecht et al. 2017). D'autres articles montrent également cette corrélation entre diminution de l'expression des DNMTs et perte des capacités d'apprentissage, chez plusieurs espèces de poissons (Beaver et al. 2017; Baumgart et al. 2014). A l'inverse, une autre étude chez le zebrafish montre qu'un trop haut taux de méthylation du promoteur de GABRB2 (gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor $\beta 2$) serait corrélé avec des dysfonctionnements cognitifs et des symptômes proches de la schizophrénie (L. Wang et al. 2016). Mais bien que ces études ne permettent pas de l'affirmer, cela pourrait tout de même laisser supposer que les mécanismes d'apprentissage et de mémoire chez les téléostéens impliquent, comme chez les mammifères, de la méthylation. Quelques études décrivent des protéines impliquées dans la cognition chez les poissons. Par exemple, SETD5, une histone méthyltransférase, possède un rôle important dans le développement du cerveau autant chez la souris que chez le zebrafish (Sessa et al. 2019). D'autres gènes semblent également communs aux mammifères et aux poissons: *Creb1* (Dou et al. 2018), *Bdnf* (Dou et al. 2018), *MeCP2* (Coverdale et al. 2004), etc.

Mais la méthylation de l'ADN n'est pas la seule manière par laquelle l'épigénétique peut affecter la mémoire et l'apprentissage. Il existe aussi deux autres mécanismes épigénétiques, qui ont également un rôle dans les processus de cognition. L'acétylation des histones, par exemple, a été mentionnée plus haut comme possiblement liée à la méthylation de l'ADN.

1.2.2 Modification des histones

Les histones sont des protéines étroitement associées à l'ADN et jouant un grand rôle dans sa structure (Jenuwein and Allis 2001). Ils sont électrochimiquement positifs et s'associent donc avec ce dernier, plutôt négatif (Stilling and Fischer 2011). Cependant, des résidus peuvent s'ajouter sur plusieurs sites des histones et modifier l'attraction entre les deux molécules en formant un "code d'histones" (Jenuwein and Allis 2001). Par exemple, l'addition d'un groupement acétyle va neutraliser une charge positive de l'histone, ce qui va avoir pour effet de relâcher la structure, et par conséquent, rendre les gènes localisés à cet endroit plus accessibles (Levenson and Sweatt 2005; Stilling and Fischer 2011). De plus, l'histone acétylée va également servir de cible aux protéines de la machinerie de transcription (Jenuwein and Allis 2001), facilitant d'autant plus l'expression du gène. Les histones acétylées peuvent par la suite être désacétylés par des désacétylases, et il est également possible d'ajouter d'autres types de groupements dont certains ont un effet inverse, comme par exemple des groupements méthyles (Stilling and Fischer 2011). Les modifications d'histones ont un rôle dans la formation de la mémoire. Une étude de Levenson, O'Riordan, et al. 2004, montre en effet que dans l'aire CA1 de l'hippocampe, une heure après un test fear conditioning, le niveau d'acétylation de l'histone H3 était plus élevé. Ce niveau d'acétylation était par la suite revenu à la normale 24h après le test, montrant que cette phase n'est que temporaire. Elle est cependant primordiale, car lorsqu'elle ne se déroule pas correctement, cela mène à des dysfonctionnements cognitifs. Par exemple, une surexpression de certains HDACs diminue la plasticité synaptique et la formation de la mémoire, alors qu'un knockout du gène l'améliore (Guan et al. 2009). Un dysfonctionnement dans les enzymes impliquées dans la méthylation et la déméthylation des histones induisent également des problèmes de cognition (Parkel, Lopez-Atalaya, and Barco 2013). Il est probable que les processus d'acétylation des histones soient fortement liés à la méthylation de l'ADN. En effet, il semblerait que l'inhibition des DNMTs induit une inhibition de l'acétylation des histones, causant des déficits dans la consolidation de la mémoire (C. A. Miller, Campbell, and Sweatt 2008).

Ces deux premiers mécanismes épigénétiques agissent de manière "cell-wide", c'est-à-dire qu'ils régulent la mémoire et l'apprentissage à l'échelle de la cellule, et ce de la même manière pour toutes

les dendrites. Cependant des mécanismes plus fins sont nécessaires pour les régulations à l'échelle de la synapse, tout aussi primordiaux à la cognition. Pour cela, le troisième mécanisme épigénétique peut avoir une grande importance et implique les microARNs interférents.

1.2.3 MicroARNs interférents

Les microARNs (miRNAs) sont des petites molécules d'ARN non-codantes, qui, en se fixant à un brin d'ARN messager codant complémentaire, peuvent en inhiber la traduction en protéine (Derghal et al. 2016; Bredy et al. 2011). Il s'agit de la seule modification épigénétique qui n'est pas directement reliée à la molécule d'ADN, et elle peut donc également avoir un effet en dehors du noyau. Lorsque des miRNAs sont situés dans certaines dendrites uniquement, ils pourraient alors réguler la traduction en protéines de manière beaucoup plus précise, et jouer un rôle de régulation à l'échelle de la synapse. Aucune étude n'a été trouvée démontrant un rôle de ces miRNAs dans la mémoire et l'apprentissage chez les poissons, mais ils sont présents dans le système nerveux central. De plus chez la drosophile, ils y sont impliqués (Ashraf et al. 2006), et chez les mammifères, ils sont connus pour être présents en grandes quantités dans le cerveau, et notamment dans des régions très importantes pour la cognition (Mercer et al. 2008). Ils y joueraient un rôle de régulateur de la plasticité neurale, de la mémoire et de l'apprentissage (Bredy et al. 2011). On retrouve par exemple dans les dendrites des neurones de l'hippocampe, miR-134, un microARN empêchant la traduction de *bdnf*, dont la protéine est très importante dans la plasticité neurale (Schafe 2016). Wibrand et al. 2010, suggèrent également que la concentration en certains miRNAs peut changer lors d'évènements comme les potentialisations à long terme, primordiales dans les processus de formation de la mémoire. De plus, chez les mammifères, une inhibition ciblée de Dicer (une enzyme impliquée dans la formation des miRNAs) semble augmenter les capacités de cognition liées à la partie du cerveau touchée. Mais parfois, à l'inverse, l'augmentation de certains miRNAs peut aussi aider à la formation de la mémoire (Bredy et al. 2011). Les mécanismes par lesquels ils agissent sont encore méconnus, mais les trois grands rôles supposés qu'ils ont dans la cognition sont de modifier la morphogenèse des neurones lors du développement, réguler plus finement et individuellement les connections synaptiques, et "déstabiliser" la mémoire pour pouvoir modifier ou former de nouveaux souvenirs (Bredy et al. 2011). Or, il semblerait que l'environnement puisse avoir un effet sur la concentration en ces miRNAs. Par exemple, des perturbateurs endocriniens comme les œstrogènes peuvent moduler leur expression chez les zebrafish (A. Cohen et al. 2008). Là aussi, l'environnement pourrait donc influencer sur les processus de cognition.

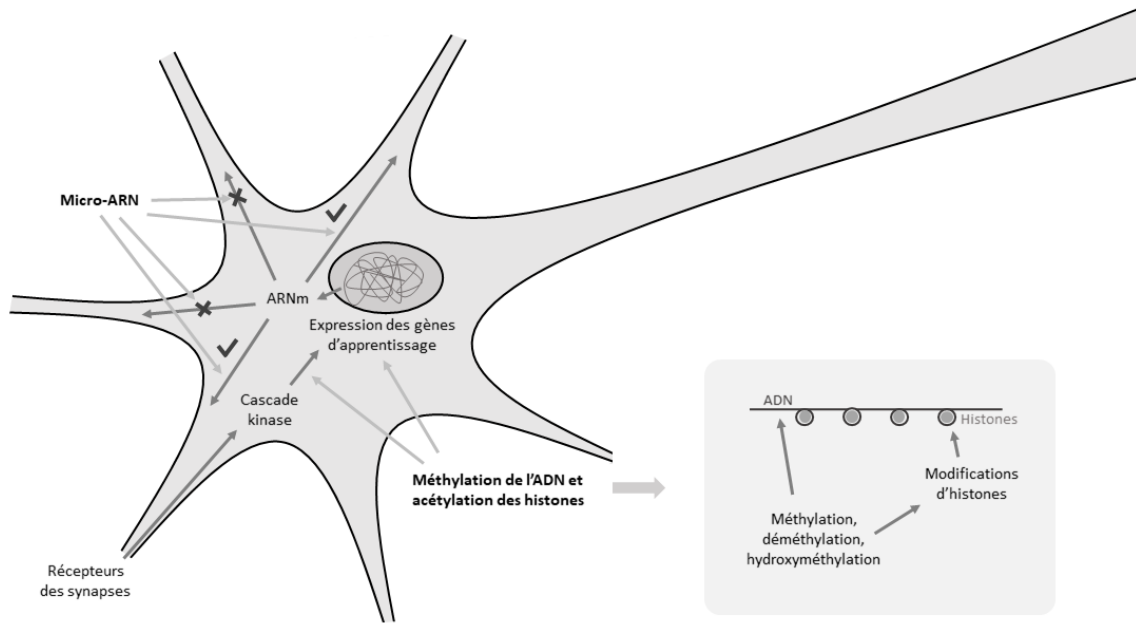


Figure 10: Rôle de l'épigénétique dans la cognition. Après la perception du signal par les récepteurs des synapses, une cascade de réactions se produit, ce qui va déclencher les modifications épigénétiques: méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN, puis modifications d'histones. Cela induit une modification de l'expression des gènes "cell-wide". Les ARNs messagers produits sont alors amenés aux dendrites, et en fonction des micro-ARNs qui s'y trouvent, seront traduits en protéines ou détruits.

Les mécanismes épigénétiques ont donc de nombreux rôles dans les processus cognitifs. Ceux-ci sont résumés par la figure 10.

1.2.4 Gènes d'intérêts

De nombreux gènes sont impliqués d'une manière ou d'une autre dans la cognition. Il faut donc que toute cette machinerie fonctionne correctement et que l'expression soit parfaitement régulée pour que l'apprentissage et la mémoire puisse se faire. Premièrement, le cerveau doit se développer de la bonne manière. Des gènes comme *bdnf*, *crh*, *setd5*, *dnmt2* (uniquement pour les poissons pour cette dernière), etc. vont alors entrer en jeu.

Ensuite, de nombreuses protéines jouent un rôle lors des phénomènes de formation et de consolidation de la mémoire. On peut tout d'abord citer toutes celles impliquées dans les cascades kinases précédant les modifications épigénétiques: les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), qui vont activer les protéines ERK (Extracellular-signal regulated kinase), ainsi que CREB, un facteur de transcription important dont l'expression doit être favorisée (Adams and Sweatt 2002; Johansen et

al. 2011) et MeCP2, une protéine qui va se fixer aux méthylcytisines et aux hydroxyméthylcytisines. Mais il y a aussi celles qui sont exprimées ou réprimées par l'épigénétique, comme PP1, la reelin ou BDNF (Lester et al. 2011). Si leur niveau de méthylation avant ou pendant la formation de la mémoire n'est pas correct, cela pourrait causer des troubles d'apprentissage. On peut ensuite nommer les gènes *calcineurin* et *Egr1* qui jouent un rôle dans le stockage de la mémoire. S'ils ne sont pas correctement méthylés après l'apprentissage, cela signifie soit que l'apprentissage n'a pas bien eu lieu, soit qu'il y a des problèmes dans le stockage de la mémoire.

Les gènes cités ci-dessus sont les plus couramment retrouvés dans la littérature et les mieux connus, mais il existe de nombreux autres gènes liés à la mémoire. De manière non exhaustive, on peut citer *mef2* (Bredy et al. 2011), *c-fos* (Bredy et al. 2011), *dcx* (doublecortin) (Ebbesson and Braithwaite 2012), *Neuro-D* (neural differentiating factor) (Ebbesson and Braithwaite 2012, etc.

Enfin, il est important que les modifications épigénétiques elles-mêmes soient régulées. Toutes les enzymes qui jouent un rôle épigénétique dans la cognition doivent également être correctement exprimées. De nombreuses études mentionnées plus haut montrent en effet que leur inhibition ou sur expression cause des problèmes, ou améliore la mémoire et l'apprentissage. Pour les modifications de cytosines, on peut citer les DNMTs, avec en particulier DNMT3 pour son rôle de méthylation *de novo*, et les TETs. Mais il y a également les HATs (par exemple CBP (Levenson and Sweatt 2005)) et les HDACs (par exemple HDAC3 (Lester et al. 2011) et KDAC (Peixoto and Abel 2013)) pour les modifications des histones et Dicer pour les microARNs (Bredy et al. 2011) qui ont un rôle dans la cognition.

Mais tous les gènes cités précédemment concernent n'importe quel processus cognitif impliqué dans la mémoire à long terme et l'apprentissage au sens large. Pour rappel, la mémoire à court terme ne rentre pas dans cette catégorie (à l'exception des gènes de développement), car il n'y a pas encore de synthèse de protéine (le gène *creb*, par exemple, n'influence pas cette dernière (Lau et al. 2012)). Ce n'est cependant pas le cas de tous les gènes. Lau et al. 2012 ont en effet montré chez le ver *Caenorhabditis elegans* que lorsque le gène *glr-1*, une sous-unité d'un récepteur glutamate non-NMDA, était touché, cela n'affectait pas la mémoire à court terme non-associative, mais bien la mémoire à long terme non-associative et l'apprentissage associatif (pour les deux types de mémoire). Une autre mutation sur le gène *nmr-1*, une sous-unité du récepteur NMDA, n'impacte aucune mémoire pour l'habituation, mais bien la mémoire à court et long terme de l'apprentissage

associatif. Une réduction ou une augmentation de l'expression de ces deux gènes pourrait donc affecter de manière ciblée certains types de mémoire seulement.

1.3 *Kryptolebias marmoratus*

1.3.1 Présentation de l'espèce

Le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus* est un poisson de l'ordre des Cyprinodontiformes et de la famille des Rivulidae (Avisé and A. Tatarenkov 2015). Il vit sur la côte est de l'Amérique, dans les mangroves entre la Floride et le sud du Brésil (Avisé and A. Tatarenkov 2015). En plus d'être capable de résister longtemps hors de l'eau (Bressman et al. 2019) et de résister à de très grandes différences de salinité (McCain et al. 2020), il possède un mode de reproduction très particulier: il n'y a pas de femelle dans cette espèce. Les populations sont androdioïques, c'est-à-dire entièrement composées d'hermaphrodites et de mâles (figure 11), en proportion variable (Turner, Davis, and D. S. Taylor 1992). De plus, il est le seul vertébré connu, avec son espèce sœur *Kryptolebias ocellatus*, capable d'autofécondation (Harrington 1961; W. J. E. M. Costa 2011). Cette capacité engendre des lignées isogéniques, au sein desquelles les individus sont pratiquement des clones, et il n'existe presque plus de variabilité allélique au sein d'une même population (Andrey Tatarenkov et al. 2015).

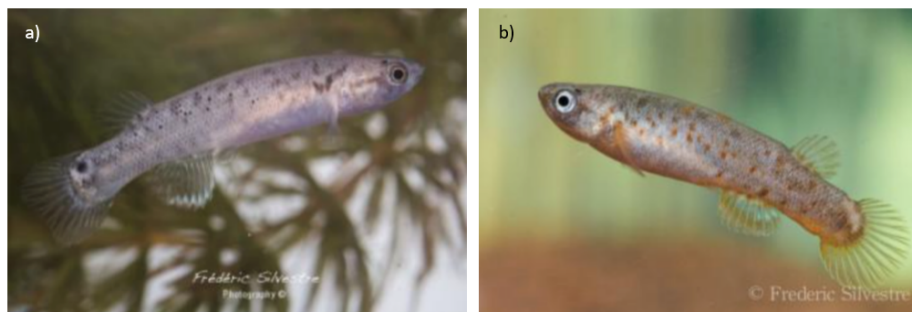


Figure 11: *Kryptolebias marmoratus* a) Hermaphrodite b) Mâle (Photos: Frédéric Silvestre)

1.3.2 Intérêt de l'espèce

Cette capacité d'autofécondation apporte un grand avantage: puisque tous les individus d'une même lignée sont pratiquement clonaux, la variabilité interindividuelle dans le phénotype observé ne peut pas être due à la séquence d'ADN. Or le phénotype d'un individu est influencé par la génétique, l'environnement et leur interaction (Bull 1987). La variation phénotypique observée est donc potentiellement causée par le milieu. Cela fait de cette espèce un très bon modèle pour étudier les

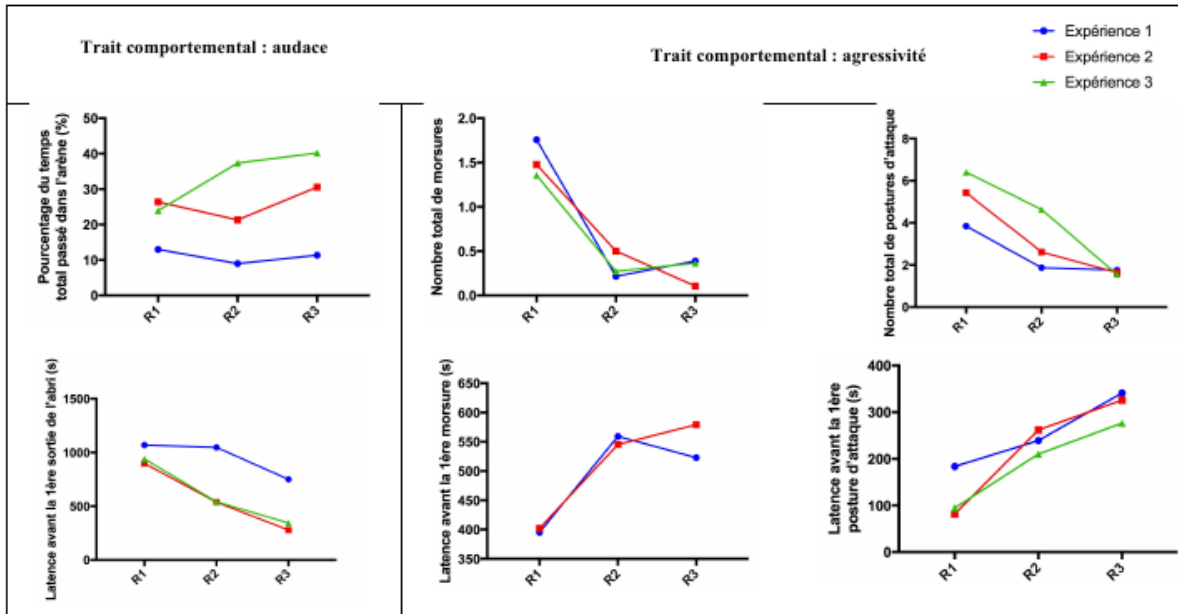


Figure 12: Résultats des tests comportementaux pour les trois réplicats de trois expériences. Expérience 1: âge au 1^{er} réplicat de 430 jours et temps entre réplicats de 21 jours. Expérience 2: âge au 1^{er} réplicat de 150 jours et temps entre réplicats de 21 jours. Expérience 3: âge au 1^{er} réplicat de 150 jours et temps entre réplicats de 14 jours. (Chapelle 2018)

effets de l'épigénétique.

De plus, les poissons sont en voie pour devenir des modèles reconnus pour l'étude de la cognition. En effet, contrairement à l'Homme, leur cerveau reste plastique et continue à faire de la neurogenèse jusqu'à leur mort (Ebbesson and Braithwaite 2012). Ils ont également une position basale dans l'arbre phylogénétique des vertébrés, et y ont une radiation très importante, ce qui est donc très intéressant pour comprendre la cognition de l'ancêtre commun de ce groupe, et l'évolution qui en a suivi, comme les convergences évolutives et les rôles écologiques de la mémoire et l'apprentissage (Bshary and Brown 2014). C'est notamment pour cela qu'il est important de ne pas étudier qu'une seule espèce. Jusqu'à présent, le principal modèle chez les poissons est le zebrafish, mais il existe des différences interspécifiques parfois assez importantes, et cette espèce n'est pas toujours représentative de tous les poissons. Dans une étude de McAroe, Craig, and Holland 2016 où ils comparent la cognition chez le zebrafish (*Danio rerio*), une espèce de killifish (*Nothobranchius guentheri*), le poisson rouge (*Carassius auratus auratus*) et le combattant (*Betta splendens*), ils montrent non seulement que le zebrafish est parfois une exception dans son comportement d'apprentissage, mais aussi que chaque espèce est différente et a ses propres particularités dans la cognition.

Enfin, le laboratoire de Prof. F. Silvestre, où ce mémoire sera réalisé, a déjà constaté de nombreuses preuves d'habituation lors des expériences sur *K. marmoratus*. Les mémoires et thèse de Avalos Cascante 2017; Chapelle 2018; Colinet 2018; Markey 2019; Laurent 2019; Carion 2020 parlent tous de ce phénomène. Par exemple, sur la figure 12 issue du mémoire de Valentine Chapelle, on observe pour chaque trait mesuré d'un test d'audace et un test d'agressivité, la réponse moyenne des individus pour chaque réplicat. Les 3 expériences ont été réalisées par des personnes différentes sur des individus d'âges différents et avec un intervalle de temps entre les réplicats différent. On observe ici pour la plupart des traits, une habituation dès le deuxième réplicat, et donc une non-répétabilité des résultats. Cela montre que les individus apprennent relativement vite chez cette espèce. Le rivulus des mangroves est donc une espèce parfaitement adaptée à l'étude des mécanismes épigénétiques sous-jacents la cognition.

2 Objectifs du mémoire

Ce mémoire a pour but d'étudier les mécanismes épigénétiques impliqués dans la cognition, et d'aider à comprendre le rôle qu'ils y jouent. Leur importance dans la formation et le stockage de la mémoire a été mise en évidence, mais peu est connu sur la manière dont ils peuvent influencer les capacités d'apprentissage et de mémoire, et créer de la variation interindividuelle dans une population. De plus, plusieurs corrélations entre la personnalité et l'apprentissage ont pu être observés chez certaines espèces, et celle-ci pourraient également jouer un rôle dans la variation de cette dernière. Ce travail se concentrera donc sur comment l'épigénétique peut moduler les capacités cognitives d'un individu et les possibles liens qu'elle peut créer entre les différents types de cognition, ainsi que de potentiels liens avec d'autres traits de comportements.

Afin de répondre à cette question, différents aspects de la cognition et de la personnalité, ainsi que le taux de méthylation de certains gènes clés seront caractérisés chez une lignée de *Kryptolebias marmoratus*. Cela permettra de détecter de potentielles corrélations entre les différents types de mémoire et d'apprentissage dans cette lignée, et entre ces traits cognitifs, la personnalité et les marques épigénétiques dans le cerveau.

Pour cela, chaque individu sera exposé à deux tests différents: un test d'habituation et un labyrinthe. Lors de ces tests, une mesure de l'apprentissage permettra de déterminer les capacités cognitives des individus, ainsi que leur personnalité et la variabilité interindividuelle dans cette lignée. On pourrait alors potentiellement observer des syndromes comportementaux entre les traits de personnalités, mais aussi des liens avec et entre les types de capacités d'apprentissage. Une première hypothèse est donc qu'il serait possible d'observer des "syndromes cognitifs" chez cette espèce.

De plus, puisque tous les individus sont de la même lignée (DC4), ils seront considérés comme des clones élevés dans un même environnement. Toute la variation interindividuelle observée sera donc principalement due à un effet du hasard. L'hypothèse faite ici est que cet effet du hasard se traduit par des changements épigénétiques, et plus précisément dans les taux de méthylation de certains gènes liés à la cognition. Une modification de ces taux influencera le niveau d'expression des gènes cibles, ce qui aura pour conséquence d'améliorer ou de diminuer soit toutes les capacités cognitives, soit seulement certaines.

3 Matériel et méthodes

3.1 Design expérimental

Les tests comportementaux sont réalisés sur 60 poissons de la lignée DC4 de *K. marmoratus* du laboratoire du Prof. Frédéric Silvestre. Ce nombre a été choisi sur base de plusieurs expériences étudiant des variations inter-individuelles de capacités cognitives sans effet toxicologique (Girvan and Braithwaite 1998; Sommer-Trembo and Plath 2018; Louison et al. 2019) et a été confirmé par Dr. R. Earley (communication personnelle). 24 individus (12 à apprentissage rapide et 12 à apprentissage lent) ont ensuite été sélectionnés pour les tests épigénétiques. Ce nombre se base sur plusieurs résultats où des différences significatives d'un point de vue méthylation gène spécifique, et liés à l'apprentissage, ont été trouvées entre des groupes dont la taille varie entre 4 et 15 individus (Penner et al. 2016; Doherty, Forster, and T. L. Roth 2016; Haberman, Quigley, and Gallagher 2012; King, Rosene, and Abraham 2012; Jeremy J Day et al. 2013). Les tests qui ont été réalisés sont illustrés par la figure 13.

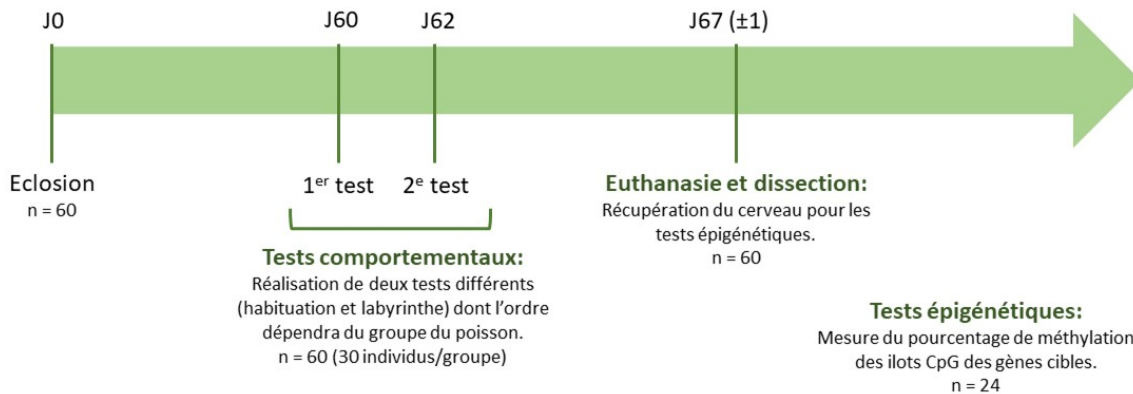


Figure 13: Schéma chronologique des expériences représentant les différents tests qui sont réalisés sur les poissons, ainsi que l'âge auquel ils sont réalisés.

Il s'agit d'une étude qui se déroule en trois étapes principales.

- La première consiste en la réalisation de plusieurs tests comportementaux qui permettent d'évaluer les capacités cognitives des différents individus. Il s'agit d'une expérience testant l'habituation, et d'une autre testant l'apprentissage spatial. Chaque poisson réalise une fois les deux tests, mais les 60 individus sont séparés aléatoirement en deux groupes de 30 qui déterminent l'ordre dans lequel ils sont réalisés. Cela permet d'éviter des biais liés à un possible apprentissage des poissons entre les tests. Le premier est réalisé 60 jours après éclosion, et le deuxième 62 jours après éclosion. A cet âge, les poissons sont encore sexuellement immatures

et en développement. Les deux tests sont réalisés à deux jours d'intervalle, de sorte à éviter une trop grande différence d'âge, tout en minimisant les effets du premier test sur les résultats du deuxième.

- Les poissons sont ensuite euthanasiés et disséqués afin de récupérer leur cerveau pour les tests épigénétiques. Cette étape a lieu 5 ± 1 jours après le dernier test. Ce nombre de jour a été choisi de sorte à ce que les poissons ne soient pas encore adultes, mais suffisamment grand pour minimiser un éventuel effet de l'ordre des tests sur les modifications épigénétiques.
- La dernière étape est la récolte de données épigénétiques. Le taux de méthylation de certains gènes clés traduit le niveau d'expression probable de celui-ci, et peut possiblement être corrélé aux capacités cognitives testées précédemment.

3.2 Elevage

120 oeufs sont récoltés au hasard dans le stock d'oeufs de rivulus de la lignée DC4 du laboratoire URBE de l'UNamur. Ils sont ensuite placés dans des plaques multi-puits contenant 4 ml d'eau salée à 25 ppt, qui est renouvelée toutes les semaines. Chaque jour, les larves ayant éclos sont déplacées dans des bocal individuels contenant 300 ml d'eau salée à 25ppt. Elles sont conservées dans un local thermorégulé à $28 \pm 1^\circ\text{C}$, avec une photopériode 12:12h. Elles sont nourries tous les jours *ad libidum* avec 1 ml d'une solution d'*Artemia salina* vivants. Les 60 premiers individus ayant éclos et survécu ont été utilisés pour l'expérience.

3.3 Tests cognitifs

Les tests cognitifs sont réalisés à 60 et 62 dph. L'ordre des deux tests est, pour rappel, déterminé aléatoirement pour chaque poisson afin d'éviter un biais d'apprentissage. Chaque test est filmé à l'aide d'une caméra Panasonic fullHD (HC-V770) ou Sony Handycam (HDR-CX220 ou HDR-CX625) afin de pouvoir par la suite être analysé sur le logiciel Noldus Ethovision XT[®].

3.3.1 Test 1: habituation

Le test d'habituation réalisé est un test de type "novel object". Un seau circulaire gris clair de 18 cm de diamètre (figure 14a) est rempli avec 1,2 l d'eau salée à 25 ppt et à une température de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Le poisson y est placé au début de l'expérience et y reste pendant 30 minutes d'acclimatation. Ensuite, une colonne rouge en plastique (le nouvel objet) de 7 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre (figure 14b) est placée dans le seau près d'un bord. Le temps passé à proximité de la

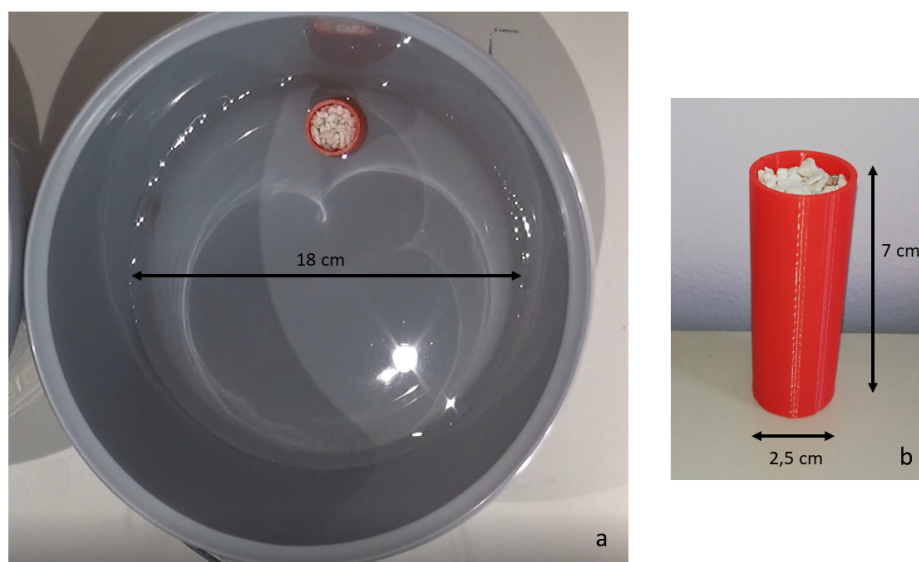


Figure 14: Matériel utilisé pour l'expérience d'habituation. a) Seau et emplacement de la colonne lors de l'expérience. b) Colonne

colonne est mesuré par intervalles de 5 minutes pendant 2h30. Cela permet de voir l'évolution du comportement des individus face à la colonne, et donc d'estimer leur habituation, c'est-à-dire une diminution (ou non) de la réponse à ce nouveau stimulus. Le nombre de transitions entre la zone proche de la colonne et le reste de l'arène, la réaction de l'individu lors de la pose de la colonne, le temps écoulé avant la première approche de l'objet et le pourcentage de temps total passé près de la colonne ont également été mesurés. A la fin de l'expérience, le seau est vidé et rincé avant l'utilisation suivante.

3.3.2 Test 2: apprentissage spatial

Un labyrinthe est utilisé pour tester l'apprentissage spatial des poissons. Les bords latéraux de l'arène sont gris foncé, alors que le fond est blanc translucide, permettant un rétro-éclairage afin de faciliter la détection de l'animal par logiciel. Elle est remplie avec 350 ml d'eau salée à 25 ppt et à une température de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Le poisson est placé au début de l'expérience dans la chambre d'acclimatation (figure 15a) pendant 10 minutes. Lorsque le temps est écoulé, la porte qui le sépare des deux autres chambres est soulevée, et il peut alors se déplacer librement pendant 30 minutes. L'une des deux chambres (figure 15b) (aléatoirement celle de droite ou de gauche) contient un morceau de coton en dessous duquel il peut se cacher, et qui est protégé du rétro-éclairage par une opacification du fond de l'arène avec du papier collant noir. Cet abri (figure 15d) constitue le stimulus positif supposé récompenser le poisson, alors que l'autre chambre (figure 15c), de dimensions

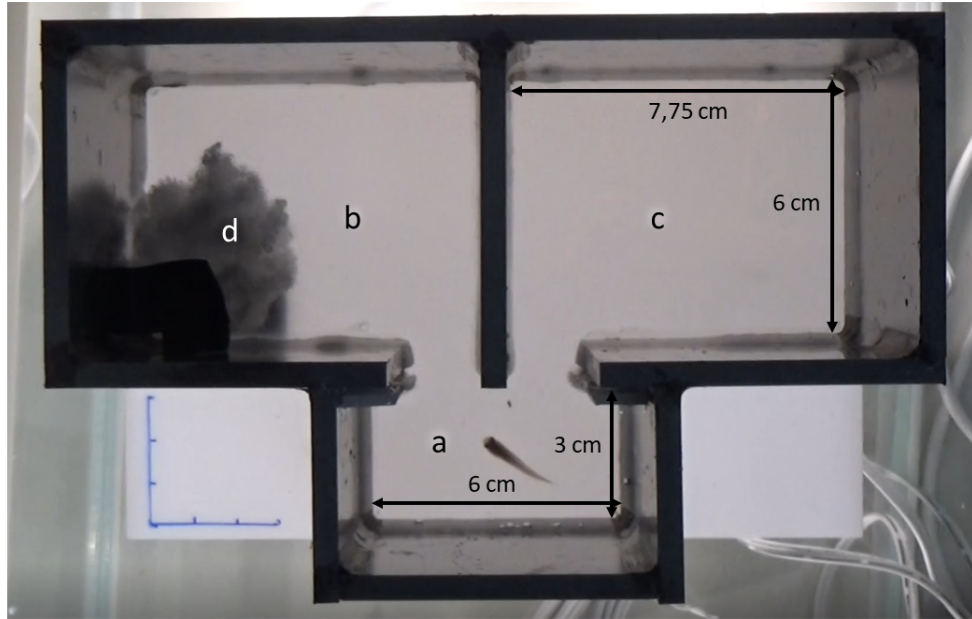


Figure 15: Arène de l'apprentissage spatial. a) chambre d'acclimatation; b) chambre contenant un abri; c) chambre sans abri; d) abri. Le fond de l'arène est blanc translucide et les murs sont gris. Les dimensions de chaque chambre sont indiquées sur l'image, et la hauteur de murs est de 12 cm. La porte se place dans les coulisses situées entre la chambre d'acclimatation et les 2 autres chambre.

identiques à la première, est vide. Après cette première phase d'entraînement, le poisson est replacé dans la chambre d'acclimatation porte fermée pendant 30 minutes, et s'en suit une deuxième phase d'entraînement de 30 minutes. Et après une nouvelle acclimatation de 30 minutes, a ensuite lieu un dernier essai de 30 minutes. Pour chaque essai est mesuré le temps passé dans chaque chambre et si l'individu est allé dans la chambre avec ou sans coton lors de sa première sortie de la chambre d'acclimatation. A cela s'ajoute le temps nécessaire à la première sortie de la chambre, le nombre de transitions entre les chambres et la réaction des individus au moment où la porte est soulevée. A la fin de l'expérience, l'arène est vidée et rincée avant l'utilisation suivante.

3.3.3 Analyses avec Ethovision

Toutes les vidéos des tests sont analysées via le logiciel Ethovision XT[®], produit par Noldus. Celui-ci permet de calculer les différentes mesures décrites précédemment. Pour cela, des arènes ont été dessinées sur le logiciel. Pour l'habituation (figure 16a), l'arène (a.I) se compose uniquement d'un disque autour de l'objet (a.II), dont le rayon est calculé de sorte à laisser la longueur d'un poisson tout autour de la base de l'objet. Pour le labyrinthe (figure 16b), trois principales zones sont distinguées: la chambre d'acclimatation (b.I), la chambre contenant le coton (b.II) et la chambre vide (b.III). Celle contenant le coton possède une dernière zone, détournée de bleu: l'abri (b.IV).

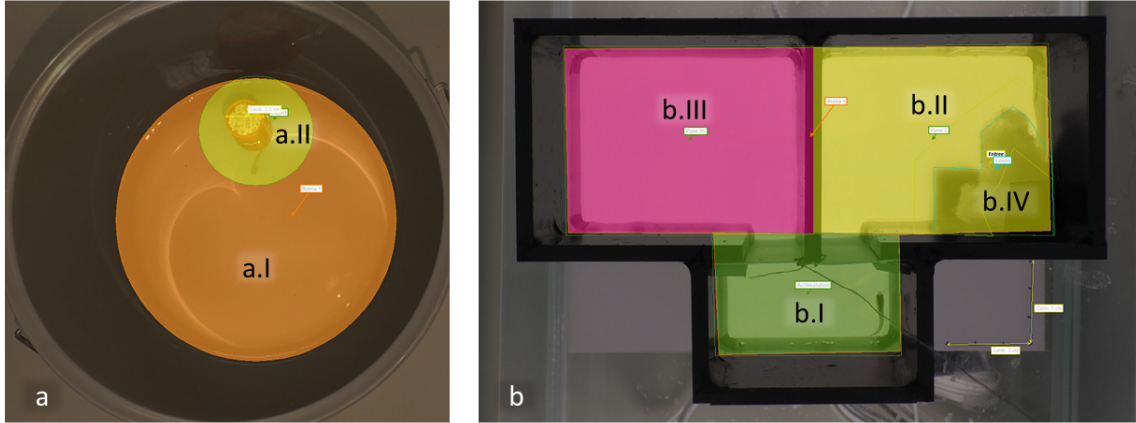


Figure 16: Représentation des arènes telles que dessinées sur le logiciel Ethovision XT[®]. a) arène du test d'habituation (a.I), composée d'une zone proche de l'objet (a.II) dont le rayon est calculé de sorte à laisser la longueur d'un poisson tout autour de l'objet. b) arène du test d'apprentissage spatial composée de la chambre d'acclimatation (b.I), la chambre contenant un abri (b.II) et la chambre vide (b.III). L'abri (b.IV) est délimité par la forme du coton et/ou du papier collant noir au fond de l'arène (ligne bleue).

3.3.4 Calcul de l'apprentissage

Les données comportementales brutes obtenues grâce au logiciel ont par la suite été manipulées afin d'en déduire les capacités d'apprentissage (A) des individus. Trois mesures de l'apprentissage sont réalisées, une pour l'apprentissage lors du test d'habituation ($A_{Habituation}$), et deux sur base du test d'apprentissage spatial ($A_{SpatialChoix}$ et $A_{SpatialTemps}$).

3.3.4.1 Mesure de l'habituation

La mesure d'habituation est calculée sur base du temps passé près de la colonne par intervalles de 5 minutes tout au long des 2h30. En cas d'apprentissage, après une période pendant laquelle le poisson évite l'objet inconnu, l'intérêt porté à ce nouvel objet devrait augmenter puis diminuer progressivement, et donc le temps passé à proximité de la colonne doit également suivre cette courbe. La figure 17 donne un exemple de résultat attendu (données fictives).

La rapidité d'habituation à l'objet ($A_{Habituation}$), correspondant à la rapidité d'apprentissage, est défini comme le nombre d'intervalles de 5 minutes nécessaires pour que le poisson se désintéresse de la colonne à partir du moment où il s'en est approché. Afin d'éviter un biais lié au fait que le poisson peut s'approcher de la colonne sans nécessairement s'y intéresser, le pourcentage moyen de temps qui aurait dû être passé près de celle-ci si les mouvements des individus étaient uniquement

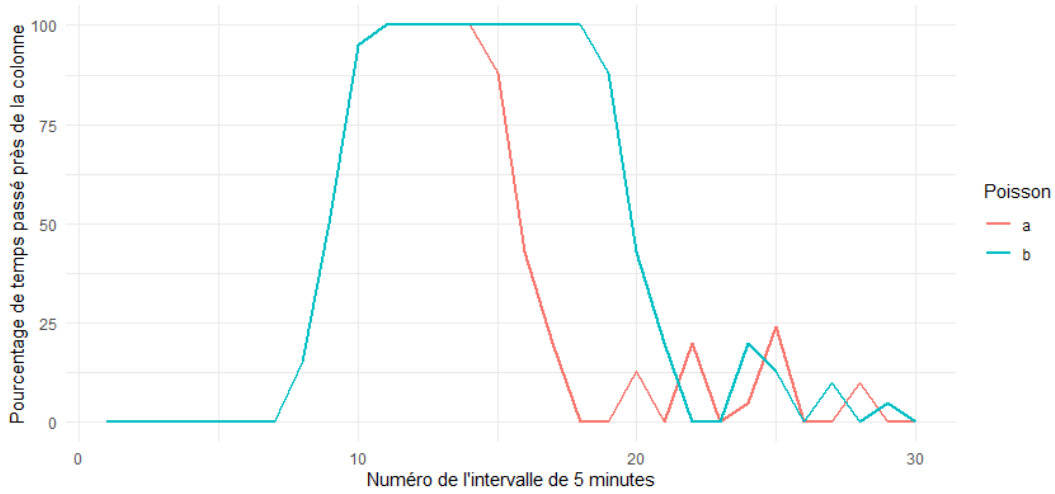


Figure 17: Données fictives de temps passé près de la colonne pour chaque intervalle de 5 minutes, afin d'illustrer l'exemple de calcul de l'habituatation. Les 2 courbes représentent des poissons différents (a, en rouge et b, en bleu).

dû au hasard a été calculé comme suit: $Pourcentage_{hasard} = \frac{S_{objet}}{S_{tot}} * 100$, où S_{objet} est la surface de la zone considérée proche de l'objet et S_{tot} est la surface totale de l'arène. Ici, on a $S_{objet} = 3,25^2 * \pi = 33,17cm^2$ et $S_{tot} = 9^2 * \pi = 254,34cm^2$. Donc $Pourcentage_{hasard} = 13\%$. Le poisson est considéré comme n'ayant plus peur de la colonne à partir du moment où le pourcentage de temps passé près de la colonne dépasse les 13%. Le compte du nombre d'intervalles commence donc à partir du premier dont le pourcentage dépasse les 13%. L'habituatation est ensuite considérée comme terminée lorsque le poisson passe moins de 13% du temps près de la colonne pour 2 intervalles d'affilées. Ce compte ne reprend pas, même si le pourcentage de temps passé près de l'objet redépasse les 13% plus tard au cours de l'expérience. Sur l'exemple de la figure 17, le poisson (a) a donc un $A_{Habituation} = 10$ intervalles et pour le poisson (b) $A_{Habituation} = 14$ intervalles. Le $A_{Habituation}$ de (a) étant plus petit que celui de (b), les capacités d'habituatation de (a) sont alors considérées plus grande que celles de (b).

3.3.4.2 Mesure de l'apprentissage spatial

La première mesure utilisée pour quantifier l'apprentissage spatial consiste à regarder si au dernier essai, le poisson est entré en premier dans la chambre contenant l'abri (stimulus positif) ou celle qui est vide. S'il est allé dans la bonne chambre du premier coup, il se voit attribuer un score ($A_{SpatialChoix}$) de 1, s'il est allé dans la chambre vide, un score de -1, et s'il n'est pas sorti de la chambre d'acclimatation au dernier essai, un score de 0.

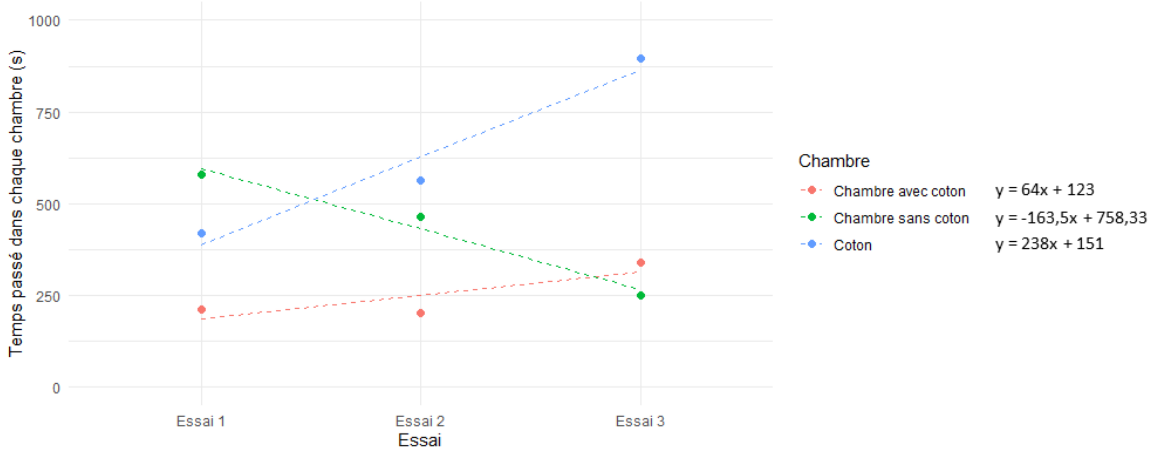


Figure 18: Données fictives de temps passé dans chaque chambre pour les 3 essais pour un individu. Les points correspondent aux valeurs mesurées et les lignes pointillées aux pentes de régressions calculées (méthode = modèle linéaire). A droite de la légende de chaque chambre se trouve l'équation de la droite de régression.

Le deuxième score ($A_{SpatialTemps}$) est basé sur l'évolution du temps passé dans chaque chambre. Pour chaque individu et pour chaque chambre, une pente de régression est calculée représentant l'évolution du temps passé dans la chambre entre les différents essais. Un exemple fictif est montré sur la figure 18. L'équation de cette droite indique la pente, ce qui permet de calculer le score d'apprentissage comme suit:

$$A_{SpatialTemps} = P_{Coton} + P_{ChambreC} - P_{ChambreSC}$$

Où P_{Coton} est la pente pour l'abri, $P_{ChambreC}$ est la pente pour la chambre contenant l'abri et $P_{ChambreSC}$ est la pente pour la chambre vide. Dans le cas de l'exemple fictif, $A_{SpatialTemps} = 238 + 64 - (-163,5) = 465,5$. Plus $A_{SpatialTemps}$ est grand, plus les capacités d'apprentissage sont considérées comme élevées.

3.3.4.3 Mesures de traits de personnalité

Bien que ces tests d'apprentissage ne soient pas initialement prévus pour, il est possible de mesurer certains traits de personnalité grâce aux réactions que les individus ont face aux tests. Or, ces traits peuvent être corrélés avec les résultats aux différents tests, soit par syndrome cognitif, soit par biais expérimental. Les différents traits de personnalité et la manière dont ils ont été mesurés sont détaillés dans cette section.

Premièrement, l'audace peut être évaluée grâce au test d'apprentissage spatial. En effet le temps nécessaire à la sortie de la chambre d'acclimatation peut être associée au temps nécessaire pour sortir de l'abri d'un shelter test (plus le temps est long, moins le poisson est audacieux). Puisqu'il y a 3 essais différents, 3 mesures de timidité sont disponibles pour chaque individu. Un deuxième trait associé à l'audace, la néophobie, peut être mesurée par le temps écoulé avant la première entrée dans la zone à proximité de la colonne lors du test d'habituation. Ces deux mesures de personnalité sont également obtenues via le logiciel Ethovision.

Une autre mesure qui peut être associée à la personnalité est l'attractivité de la colonne du test d'habituation par rapport au reste de l'environnement. Cette mesure permettrait de détecter un possible biais d'expérimentation. En effet, si le nouvel objet est attractif ou répulsif pour certains individus, cela peut influencer le temps passé près de celui-ci, et donc le score d'habituation. Pour cela, le pourcentage de temps passé par le poisson près de la colonne doit être comparé avec le temps passé près de celle-ci si ses mouvements étaient uniquement dus au hasard. Cette première mesure ($Attractivité_{mesurée}$) est fournie par le logiciel, et la seconde a été calculée pour la mesure de l'habituation ($Attractivité_{hasard} = Pourcentage_{hasard} = 13\%$). Si $Attractivité_{mesurée}$ est nettement plus grande ou plus petite que $Attractivité_{hasard}$, cela pourrait montrer un effet respectivement attractif ou répulsif de la colonne. On peut cependant distinguer deux $Attractivité_{mesurée}$: soit l'on prend en considération le pourcentage de temps passé près de l'objet pour l'entièreté du test, soit on ne commence qu'à partir du moment où le poisson s'est approché de l'objet pour la première fois. Cette deuxième mesure a pour avantage de supprimer l'effet de la néophobie, mais les deux mesures seront prises en considération lors de l'analyse.

Un score d'attractivité peut également être calculé pour l'apprentissage spatial, afin de voir si la chambre avec coton était bel et bien perçue comme un renforcement positif par rapport à la chambre sans coton. Il se calcule selon la formule:

$$Attractivité_{mesurée} = \frac{t_{Coton} + t_{ChambreC}}{t_{Coton} + t_{ChambreC} + t_{ChambreSC}} * 100$$

Où t_{Coton} est le temps passé sous le coton, $t_{ChambreC}$ est le temps passé dans la chambre avec coton (coton non compris) et $t_{ChambreSC}$ est le temps passé dans la chambre sans coton. Le résultat donne le pourcentage de temps passé dans la chambre contenant le coton (coton compris), par rapport au temps total passé hors de la chambre d'acclimatation. Ce score peut être calculé pour les 3 essais afin d'avoir des répétitions. Si le pourcentage moyen est significativement plus grand que

50% (*Attractivité_{hasard}*), la chambre contenant le coton peut être considérée comme attractive.

Ensuite, une mesure de l'activité du poisson peut être réalisée pour les deux tests, en comptant le nombre de transitions entre les différentes zones (entre la zone proche de l'objet et le reste de l'arène pour le test d'habituation, et entre les différentes chambres pour le test d'apprentissage spatial). Cette mesure est fournie par le logiciel.

Une dernière mesure de personnalité est le type de réponse de l'individu face à un danger. Lorsqu'il se retrouve en situation dangereuse, 3 types de réactions peuvent être produites par l'individu. Il peut s'immobiliser, mais il peut également fuir, ou attaquer. Le choix de réponse parmi ces 3 stratégies dépend notamment de la personnalité de l'animal. La réaction des individus est donc observée lors de la pose de la colonne pour le test d'habituation, ou lors de l'ouverture de la porte lors des 3 essais du test d'apprentissage spatial.

Le test d'habituation et le test d'apprentissage spatial ne peuvent pas être considérés comme deux réplicats mesurant la personnalité des poissons, puisque les protocoles de ces deux tests sont très différents. Mais cela peut permettre de classer les individus selon un gradient de personnalité. De plus, la variabilité au sein des individus peut tout de même être comparée à la variabilité entre individus grâce aux 3 essais différents de l'apprentissage spatial. Cela permet de déterminer l'individualité, qui indique s'il y a une certaine constance dans les traits de personnalité au sein des individus, et s'il y a de la variabilité entre individus.

3.4 Tests épigénétiques

La méthylation gène-spécifique est choisie comme méthode d'étude épigénétique. Celle-ci permet de détecter le pourcentage de méthylation précis de chaque CpG indépendamment pour une séquence donnée.

3.4.1 Euthanasie et dissection

A 67 ± 1 dph, les poissons sont euthanasiés dans de l'eau froide à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une salinité de 25 ppt. Après l'euthanasie, ils sont mesurés et pesés afin de déterminer les mesures morphologiques, puis décapités afin de s'assurer de leur mort avant dissection. La peau de la face dorsale de la tête peut alors être découpée longitudinalement du côté postérieur vers le côté antérieur, afin de dégager le crâne. Ensuite, le sommet de la boîte crânienne est soulevé, leur cerveau (figure 19) est récupéré

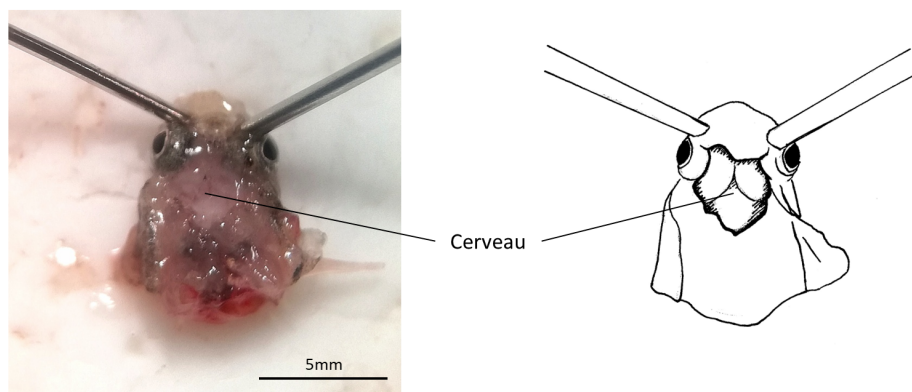


Figure 19: Vue dorsale de la tête de *Kryptolebias marmoratus* avec indication de la localisation du cerveau (à gauche en photo, à droite schématisé)

dans un eppendorf et immédiatement conservé dans de l'azote liquide, pour enfin être stocké à $-80\pm 1^{\circ}\text{C}$ jusqu'aux extractions d'ADN.

3.4.2 Extraction d'ADN

L'objectif de cette manipulation est d'isoler l'ADN contenu dans le cerveau des individus à l'aide du kit NucleoSpin[®] Tissue XS de l'entreprise Macherey-Nagel. Cette section ne présente que les grandes lignes des étapes suivies. Pour plus de détails quant au protocole utilisé, se référer à l'Annexe 2.

L'échantillon de cerveau prélevé lors de la dissection est tout d'abord prédigéré par de la protéinase K dans du buffer T1 lors d'une incubation de 4h dans un thermomixer. Les tissus sont ensuite une deuxième fois digérés par le buffer B3 lors d'une incubation de 5 minutes. On ajoute alors de l'éthanol absolu et on place l'échantillon dans une colonne à membrane de silice. Lors de la centrifugation, l'ADN va se lier à cette membrane, alors que le reste de l'échantillon passera au travers. S'en suit alors 2 cycles de lavage au cours desquels du buffer B5 est placé dans la colonne puis centrifugé. Lors d'une dernière étape, le buffer BE est placé dans la colonne. Celui-ci va éluer l'ADN, qui pourra donc passer au travers de la membrane de silice et être récupéré dans un eppendorf lors d'une dernière centrifugation. L'échantillon peut alors être conservé au congélateur à -80°C .

La quantité et la qualité de l'ADN extrait lors de cette étape est évaluée de deux manières. La pureté et la quantité de l'échantillon d'ADN est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre

NanoDropTM 2000 de la marque ThermoFisher. Cet outil permet de détecter l'éventuelle présence de protéines ou de lipides qui auraient contaminé l'échantillon et de connaître la concentration en ADN de notre échantillon. Un gel sur 20 échantillons parmi les 60 a également été réalisé afin voir si l'ADN extrait était dégradé ou fragmenté.

3.4.3 Gènes étudiés et design des primers

5 gènes ont été sélectionnés pour leur rôle dans la cognition afin d'être analysés d'un point de vue épigénétique. *Bdnf*, *creb1* et *mecp2* sont 3 gènes importants dans les processus moléculaires liés à l'apprentissage, et ont tous les 3 été démontrés comme influençant les capacités cognitives lorsque leur niveau d'expression était mal régulé chez des mammifères (Vaynman, Ying, and Gomez-Pinilla 2004; Gonzales and LaSalle 2010). *Grin1b*, dont l'équivalent chez *C. elegans* est *nmr-1*, est un gène qui code pour une sous-unité du récepteur NMDA, qui, lorsqu'il est muté chez ce dernier, impacte la mémoire associative, mais pas la mémoire non-associative (Lau et al. 2012). Enfin, *egr1* est un gène qui est déméthylé après un apprentissage (C. A. Miller, Gavin, et al. 2010), il pourrait donc servir de contrôle, et renseigner s'il y a bien eu un apprentissage plus important d'un point de vue moléculaire chez les individus ayant mieux réussi le test.

L'entièreté des poissons n'a pas été testée d'un point de vue moléculaire. Seuls les 12 poissons ayant le mieux et le moins bien réussi le test du labyrinthe ont été sélectionnés (voir section Résultat), pour un total de 24 poissons utilisés pour les tests épigénétiques.

La séquence des gènes, ainsi que la localisation des exons, ont par la suite été recherchées sur NCBI (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)* n.d.). Tous ont été retrouvés chez *K. marmoratus*, à l'exception de *creb1*. La séquence de *Nothobranchius furzeri* a donc été choisie à la place, car il s'agit d'une autre espèce de killifish, de la famille des Rivulidae, et donc assez proche phylogénétiquement (Murphy, Thomerson, and Collier 1999). Les îlots CpG ont par la suite été cherchés sur ces séquences à l'aide des sites MethPrimer (*MethPrimer* n.d.) et GPMiner (*Gene Promoter Miner* n.d.). Les séquences les plus intéressantes ont alors été sélectionnées. Elles se situent toutes dans la région précédant le premier exon, supposée régulatrice, à l'exception de l'îlot 1 de *bdnf*, qui est lui localisé dans un intron à proximité du début de l'exon 4. Ce dernier a été choisi car il possède un pattern particulier composé de 6 CpG d'affilée. Le logiciel PyroMark Assay Design de l'entreprise Qiagen a ensuite créé les primers forward et reverse qui permettraient de réaliser la PCR et le primer synthèse nécessaire au pyroséquençage (seul le deuxième îlot de *grin1b*

a nécessité l'utilisation de MethPrimer car PyroMark Assay Design ne trouvait aucun primer pour cette séquence).

L'efficacité des primers forward et reverse a été testée en faisant une PCR sur un pool des 60 individus (traité au préalable au bisulfite), puis en effectuant un gel, afin de voir s'il y a bien eu une amplification suffisante et que la PCR n'a amplifié qu'un seul fragment. Le primer synthèse a été testé sur un pool des 24 individus testés d'un point de vue moléculaire, lors d'un run test.

La structure des différents gènes, ainsi que les primers utilisés lors des manipulations sont représentées dans l'Annexe 3. Il est à noter que *creb1* ne s'y retrouve pas, car aucun couple de primer n'a fonctionné pour ce gène.

3.4.4 Traitement bisulfite

Cette étape permet de convertir les cytosines non méthylées en thymine, à l'aide du kit EZ DNA Methylation-GoldTM de Zymo Research, afin de permettre l'analyse par pyroséquençage. Les étapes précises du protocole sont disponible dans l'Annexe 4.

Après avoir ajouté le réactif de conversion des C en T à chaque échantillon, ceux-ci sont placés dans le thermocycler pour un programme de 10 minutes à 98°C, suivi de 2h30 à 64°C. Chaque échantillon est ensuite placé dans une colonne avec du buffer de liaison, afin que l'ADN se lie à la membrane de silice de la colonne. Ils sont alors centrifugés, puis lavés par l'ajout du buffer de lavement et une nouvelle centrifugation. Ils sont ensuite traités par un buffer de désulfonation, puis à nouveau lavés deux fois. Enfin, les échantillons sont récupérés dans un eppendorf, par l'ajout d'un buffer d'élution dans la colonne et d'une dernière centrifugation. Ils peuvent alors être stockés à 4°C.

Le contrôle permettant de vérifier que le traitement bisulfite a fonctionné correctement est réalisé durant la phase de pyroséquençage.

3.4.5 PCR

Le kit PyroMark[®] PCR de Qiagen a été utilisé pour répliquer massivement les séquences d'intérêt. Les détails du protocole sont repris dans l'Annexe 5.

Les différents couples de primers (forward et reverse) listés dans le tableau 3 de l'Annexe 3 ont

été ajouté à un mélange de Master Mix PyroMark PCR, de CoralLoad et d'eau nucléase free. Ces différents mélanges ont ensuite été ajoutés aux échantillons, puis placés dans le thermomixer selon le programme suivant. Après une initiation de la PCR à 95°C pendant 15 minutes, 50 cycles de dénaturation (94°C - 30s), annelage (56°C - 30s), extension (72°C - 30s) sont réalisés. Lors du dernier cycle, l'extension à 72°C est conservée 10 minutes de plus afin de s'assurer qu'un maximum de fragments soient complets. Les échantillons peuvent alors être conservés à 4°C.

Plusieurs gels ont été réalisés afin de vérifier que l'amplification par PCR a bien fonctionné sur l'ensemble des échantillons.

3.4.6 Pyroséquençage

Le pyroséquençage a été réalisé à l'aide du kit PyroMark[®] Q24 Advanced CpG Reagents, ainsi que du poste de travail PyroMark Q24, de l'instrument PyroMark Q24 Advanced et du logiciel PyroMark Q24 Advanced de Qiagen. Un protocole plus précis est disponible dans l'Annexe 6.

Un master mix est tout d'abord préparé, contenant des billes de streptavidine-sépharose, un buffer de liaison et de l'eau MilliQ. Ce master mix est ensuite ajouté aux échantillons d'ADN, et agité pendant 10 minutes afin de s'assurer que l'ADN soit bien lié aux billes. Le Cartridge est alors rempli avec les différents nucléotides, l'enzyme et le substrat, puis placé dans l'instrument PyroMark Q24 Advanced. Les primers synthèses sont ensuite dilués dans du buffer d'anneau et disposés sur une plaque PyroMark Q24. Les plaques PCR et PyroMark sont alors disposés sur le poste de travail, et les différents bacs sont remplis avec leurs produits respectifs (voir figure 29 de l'Annexe 6). Un outil d'aspiration va alors aspirer le contenu liquide de la plaque PCR, mais les billes de streptavidine-sépharose seront bloquées par le filtre. L'ADN est alors lavé dans l'éthanol, puis dénaturé dans de la solution de dénaturation afin de ne garder que le brin utilisé pour le pyroséquençage, puis à nouveau lavé dans le buffer de lavement. Les billes ainsi que les brins d'intérêt sont alors déposés dans les puits de la plaque PyroMark Q24 contenant le primer synthèse. Cette plaque est ensuite chauffée à 80°C pendant 5 minutes afin d'assurer l'anneau du primer au brin. La plaque PyroMark Q24 est ensuite placée dans l'instrument, et le programme préalablement préparé sur le logiciel PyroMark Q24 Advanced peut être lancé.

Deux contrôles ont lieu lors du pyroséquençage. Tout d'abord, un contrôle bisulfite permet de vérifier que la conversion des C en T s'est effectuée correctement. Ensuite des nucléotides au hasard

sont insérés régulièrement tout au long de la séquence, afin de vérifier qu’il n’y a pas de déviation dans la séquence, ainsi que pour s’assurer qu’il n’y a pas d’autres séquences que celle d’intérêt, qui pourraient fausser les résultats.

3.5 Analyse statistique

3.5.1 Conditions d’application

La normalité des données est vérifiée à l’aide d’un test D’Agostino et Pearson (fonction `dagoTest()`, package `fBasics`). Ce test s’adapte mieux aux tests comportementaux, car il est plus adapté aux données comprenant de nombreux *ex æquo*. L’homogénéité des variances est vérifiée à l’aide d’un test de Bartlett (`bartlett.test()`, package `stats`). Ces conditions d’applications sont nécessaires pour plusieurs tests réalisés ci-dessous.

3.5.2 Tests statistiques

Le choix de la chambre au 1^{er} et 3^e essai a été considéré comme suivant une distribution binomiale. Afin de vérifier si celui-ci était significativement différent du hasard (50%-50%), la fonction `pbinom()` a donc été utilisée.

Un test de Wilcoxon (`wilcox.test()`, package `stats`), aussi appelé test de Mann-Whitney, a été utilisés pour vérifier si l’attractivité du coton était significativement plus grande que 0,5 (hasard) pour l’ensemble du jeu de donnée, car la normalité n’était pas respectée. Il a également été utilisé lorsque chaque individu a été étudié séparément, puisque le faible nombre de valeurs (3) ne permettait pas de vérifier de manière fiable la normalité. Un test de t (fonction `t.test()`) a été utilisé pour vérifier que le score d’apprentissage était significativement plus grand que 0, et pour chercher quelles différences étaient significatives entre les individus à apprentissage lent et rapide d’un point de vue pourcentage de méthylation.

Plusieurs modèles linéaires et linéaires généralisés ont été réalisés sur les données. Tout d’abord, la fonction `lm()` (package `stats`) a été utilisée afin de vérifier si le score d’apprentissage utilisant les pentes d’évolution du temps passé dans le chambres était dépendant de la longueur du poisson et de l’ordre des tests, mais aussi afin de voir s’il y avait un effet des différents comportements observés. La fonction `glm()` (package `stats`), avec la famille binomiale (fonction `logit`) a été utilisée pour le score basé sur le choix de la chambre au dernier essai, avec comme valeurs 0 si le poisson a été dans la mauvaise chambre et 1 s’il a été dans la bonne. La fonction `lm()` a également été utilisée pour

vérifier le pourcentage de méthylation moyen de *mecp2* sur la séquence étudiée avait un effet sur la valeur de l'axe 2 de l'ACP de l'ensemble des comportements. Cependant, ce test n'a été utilisé que lorsque la variable réponse était approximable à une normale. Pour le pourcentage moyen de méthylation de *mecp2* en fonction de la réponse au stress, la fonction `kruskal.test()` du package `stats` a été utilisée. Cette fonction a également été nécessaire pour visualiser un potentiel effet de l'individu sur plusieurs traits de personnalité et sur la méthylation des différents CpG, qui pourrait indiquer une constance au sein des individus. Elle a aussi servi à mesurer les corrélations entre la personnalité et la réponse à un stress. L'effet de l'individu sur l'attractivité a été calculé grâce à une `glm()`, avec la famille quasi-binomiale, et la réponse au stress a plutôt nécessité la fonction `glm()`, avec la famille binomiale (fonction logit), les "fuites" ayant été remplacées par des 1 et les "immobilisations" par des 0.

Afin de vérifier la constance au sein des individus des 4 traits de personnalité et la méthylation de *mecp2* entre CpG, des tests de répétabilités ont également été effectués à l'aide de plusieurs fonctions du package `rptR`. `rpt()` a été utilisé pour les comportements d'attractivité, d'audace et d'activité, ainsi que pour le pourcentage de méthylation, en raison de la non-normalité des données. C'est la fonction `rptBinary()` qui a été utilisée sur le jeu de données de réponse au stress.

Plusieurs ACP ont également été réalisées au cours de l'analyse sur les données numériques. La création de ces ACP a nécessité la fonction `dudi.pca()` du package `ade4`. Les coefficients de corrélations entre les différents comportements et leurs significativités ont été calculés avec `rcorr()` du package `Hmisc`. Le coefficient de Spearman a été choisi, car la plupart des données comportementales ne sont pas distribuées normalement.

4 Résultats

4.1 Tests cognitifs

4.1.1 Habituation

Lors de la mesure de l'habituation, il a été constaté que de nombreux individus ne répondaient pas comme attendu. La figure 20 illustre quelques exemples de résultats obtenus. Quelques tests de séries temporelles ont été réalisés afin de tenter de voir quelles mesures étaient exploitables et quelles autres ne l'étaient pas, mais ces tests étant infructueux, il a été décidé de ne pas exploiter le test d'habituation pour la mesure d'apprentissage.

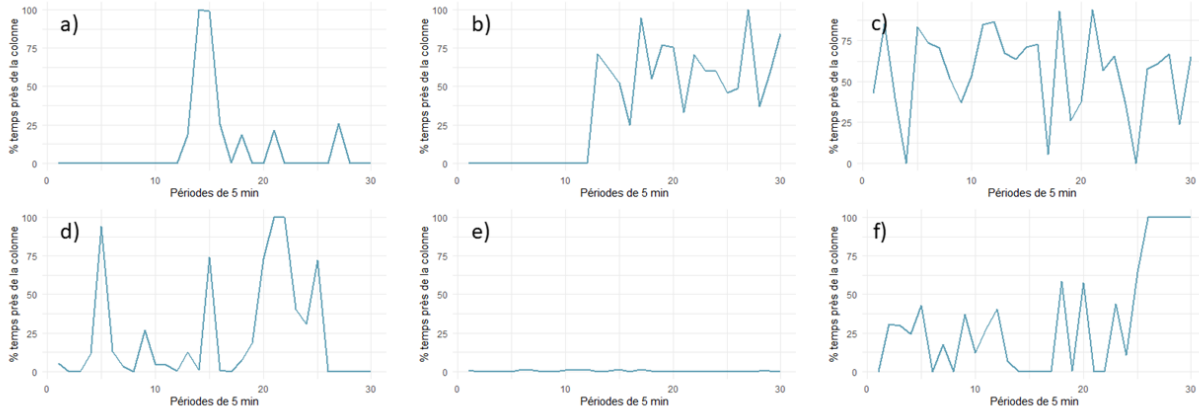


Figure 20: Pourcentage de temps passé près de l'objet pour chaque intervalle de 5 minutes: exemples de résultats obtenus a) similaire aux résultats attendus (poisson 20-56) ; b) à f) difficilement interprétables (respectivement poissons 20-4, 20-11, 20-55, 20-57, 20-59).

4.1.2 Apprentissage spatial

4.1.2.1 Contrôles de fiabilité du test

Deux contrôles ont été réalisés afin de vérifier qu'il n'y ait pas de biais dans les résultats obtenus liés à la manière dont le test a été réalisé.

Le premier vise à vérifier si le poisson percevait le coton sans sortir de la chambre d'acclimatation. Lors du premier essai, autant de poissons sont sortis en premier dans la chambre ne contenant pas de coton que dans la chambre contenant le coton. On ne peut donc pas rejeter l'hypothèse que le choix de la chambre lors de la première sortie de la chambre d'acclimatation soit dû au hasard. Il sera donc considéré que les individus ne percevaient pas, ou n'étaient pas attirés par le coton avant

de sortir de la chambre d'acclimatation.

Le deuxième permet de vérifier que le coton était bien attractif pour les poissons testés. Si l'on regarde l'ensemble des 60 poissons et les 3 essais, on obtient que les poissons ont significativement (p-valeur de $2,2 \times 10^{-11}$) tendance à rester plus longtemps dans la chambre possédant le coton que dans la chambre vide, avec une moyenne d'environ 66% du temps. Lorsque l'on regarde chaque poisson individuellement, on observe qu'aucun individu a passé significativement plus de temps dans la chambre avec abri au cours de leurs 3 essais. Il y avait cependant beaucoup de variabilité entre les poissons, car 40% ont passé en moyenne plus de 75% du temps dans la chambre avec abris, et 16,7% ont passé en moyenne plus temps dans la chambre vide que dans la chambre avec coton. Il ne peut donc pas être affirmé que l'entièreté des individus perçoivent le coton comme attractif, mais la population étudiée semble globalement plutôt attirée par celui-ci.

4.1.2.2 Résultats d'apprentissage

Avant d'analyser les résultats liés à l'apprentissage, il a d'abord été vérifié que les scores mesurés n'était pas le fruit du hasard, mais représentaient bien une évolution dans le comportement de l'individu qui peut être associé à de l'apprentissage. Le score du choix de la chambre au dernier essai a été évalué comme n'étant pas significativement différent du hasard (p-valeur = 0,205). On ne peut donc pas affirmer que ce choix soit représentatif de l'apprentissage du poisson. Pour ce qui est du score dépendant des pentes de l'évolution des temps passés dans les différentes chambres, le test a montré que le score moyen obtenu (172) était significativement plus grand que 0 (p-valeur = 0,004). L'hypothèse selon laquelle le temps passé dans les chambres à chaque essai est uniquement dû au hasard est rejetée. On observe cependant beaucoup de variabilité entre les individus, et si certains ont eu un score au-dessus de 1000, 18 individus sur 60 ont obtenu un score négatif.

Un nouveau test a par la suite été réalisé afin de vérifier si cette variabilité pouvait être expliquée par la longueur du poisson, ainsi que l'ordre des tests et leurs interactions. Aucun de ces effets n'est significatif pour aucun des deux scores mesurant l'apprentissage spatial. Un coefficient de corrélation a par la suite été calculé, permettant de constater une corrélation positive significative (p-valeur de 0,024) de 0,29 entre les deux scores d'apprentissage spatial. Parce que cette corrélation est significative, il a été décidé de conserver le score du choix de la chambre dans les tests suivants, mais de toujours utiliser les 2 scores ensemble, afin d'essayer d'avoir une vision plus globale des différents aspects de l'apprentissage.

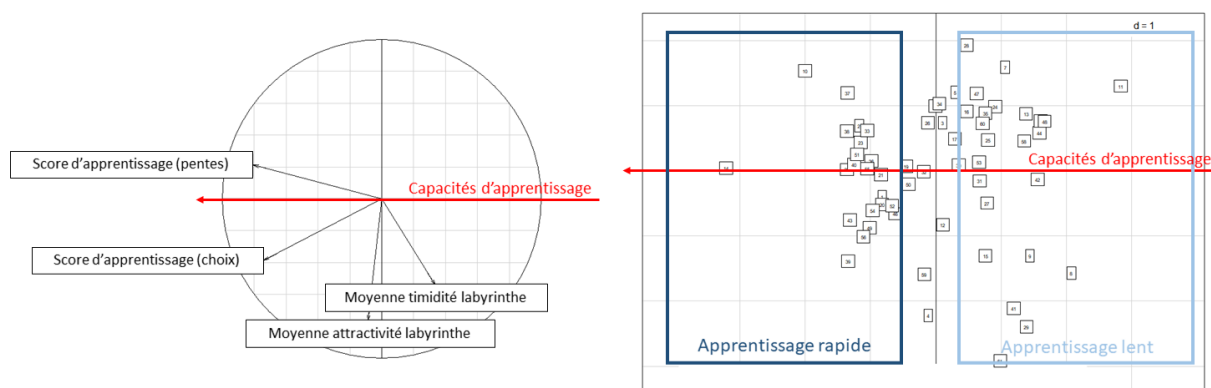


Figure 21: ACP réalisée afin de choisir les poissons destinés aux tests épigénétiques. À gauche se trouve le cercle des corrélations selon le plan 1-2, avec en rouge l'axe supposé d'intelligence. À droite se trouve la localisation des différents individus selon le plan 1-2. La flèche rouge représente à nouveau l'axe d'intelligence. Sur la partie gauche de ce graphe, encadrés en bleu foncé, sont représentés les individus supposés avoir un apprentissage plus rapide, et à droite, plus lents (cadre bleu clair). Les 60 poissons ont été utilisés pour réaliser cette ACP. Les deux premiers axes de celle-ci représentent plus de 70% de la variation de notre jeu de données.

Grâce aux scores d'apprentissage, certains poissons ont été sélectionnés pour les tests épigénétique. L'ACP réalisée, comprenant les 2 scores d'apprentissage, ainsi que deux des traits de personnalité, est représentée sur la figure 21. On y voit sur le cercle des corrélations selon le plan 1-2, que l'axe des x semble représenter le gradient des capacités d'apprentissage des poissons pour ce test. Sur la représentation de la position des individus, les 12 poissons situés le plus à gauche et les 12 poissons les plus à droite ont été considérés comme étant respectivement ceux avec l'apprentissage le plus rapide et le plus lent. Ce sont ces 24 individus qui seront utilisés lors des différentes étapes moléculaires et analysés d'un point de vue épigénétique.

4.1.3 Syndromes comportementaux et cognitifs

4.1.3.1 Constance des traits de personnalité

Il a tout d'abord été vérifié si les comportements étudiés étaient constants au sein des individus, afin de vérifier qu'il s'agisse bien de traits de personnalité et non de comportements isolés. Les modèles expliquant l'attractivité, la timidité, l'activité et la réponse au stress par le poisson montrent que l'individu a un effet significatif sur les 4 traits de personnalité (p-valeur de respectivement 0,0018, 0,0005, $3,6 \times 10^{-7}$ et 0,001). Il y a donc une certaine constance de ces traits au sein des individus et une variabilité entre les individus. On constate également que le numéro de l'essai n'est significatif pour aucun des traits de personnalité, à l'exception de la réponse au stress (p-valeur = $6,8 \times 10^{-5}$),

mais que celui de l'attractivité présente une tendance (p-valeur de 0,053). Ensuite, la répétabilité a été vérifiée pour les 4 traits de personnalité (en ne tenant compte de la vidéo que lorsqu'elle était significative), et celle-ci s'est révélée non significative pour l'attractivité (p-valeur de 0,092) et la réponse au stress (p-valeur de 0,076), mais bien pour la timidité avec une répétabilité moyenne de 0,37, et l'activité avec une répétabilité moyenne de 0,35 (p-valeurs de respectivement $7,9 * 10^{-7}$ et $4,9 * 10^{-6}$).

Ces résultats montrent qu'il y a de l'individualité dans les comportements des poissons pour l'activité et la timidité. En ce qui concerne l'attractivité et la réponse au stress, la répétabilité n'était pas significative, mais on observe tout de même une variation entre individus, car les modèles montrent un effet significatif du poisson sur les mesures de ces 2 traits.

4.1.3.2 Analyse en composante principale sur l'ensemble des comportements à valeur numérique et corrélations entre comportements

L'ACP montrant les relations entre les différents traits de personnalité et les scores d'apprentissage est représentée par la figure 22. La valeur des coefficients de corrélation entre les différents comportement et leur significativité est montrée dans le tableau 1.

La figure 22a) montre les 2 premiers axes de l'ACP et y représente les différents traits de personnalité. Selon l'axe des X, on y observe une anti-corrélation presque tout le temps significative (voir table 1) entre les traits mesurés de timidité et d'activité pour le test d'apprentissage spatial. Les 3 mesures de l'activité lors du test du labyrinthe sont également significativement corrélées entre elles, alors que seuls les traits de timidité mesurés au 2^e et 3^e essai sont significativement corrélés. L'axe Y de ce même cercle des corrélations montre une anti-corrélation entre l'attractivité mesurée au 2^e essai de l'apprentissage spatial et l'activité mesurée lors du test d'habituation. On constate également sur le tableau 1 des corrélations que cette attractivité est corrélée à 2 autres traits d'attractivité et que l'activité mesurée au cours de l'habituation est également corrélée à un trait d'activité mesuré lors du test d'apprentissage spatial, et anti-corrélée avec 2 traits de timidité.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		0,29*	-0,07	-0,01	0,45***	-0,14	-0,14	0,02	-0,05	0,05	-0,09	-0,14	-0,04	-0,09	0,02
2	0,024		-0,55***	0,17	0,5***	-0,04	-0,07	-0,09	0,02	-0,08	-0,05	0,14	0,08	0,21	-0,1
3	0,5775	0		0,17	0,17	0,16	0,2	0,02	0	0	0,09	-0,01	0,03	-0,23	0
4	0,9323	0,1927	0,1824		0,31*	0,21	0,28*	-0,03	0,01	0,23	0,13	0	0,17	-0,08	-0,37***
5	0,0003	0	0,189	0,0142		0,01	0,04	0,09	0,12	-0,03	0	-0,01	0,09	0	-0,05
6	0,2784	0,7404	0,2263	0,1066	0,9145		0,96***	0,25	0,39***	0,27*	0,16	-0,24	-0,32*	-0,3*	-0,15
7	0,3002	0,5851	0,1173	0,0286	0,7401	0		0,26*	0,44***	0,29*	0,28*	-0,28*	-0,35**	-0,35**	-0,25
8	0,863	0,5052	0,8561	0,8124	0,4846	0,0565	0,0463		0,23	0,21	0,2	-0,47***	-0,12	-0,3*	-0,12
9	0,7274	0,8664	0,9975	0,9224	0,3799	0,0023	0,0004	0,0829		0,54***	0,12	-0,43***	-0,68***	-0,52***	-0,17
10	0,6846	0,5302	0,9714	0,083	0,8357	0,0403	0,027	0,1042	0		0	-0,37***	-0,44***	-0,57***	-0,28*
11	0,5089	0,7147	0,4979	0,3168	0,9771	0,2209	0,0314	0,1206	0,3462	0,9734		-0,26*	-0,28*	-0,19	-0,39***
12	0,279	0,2901	0,9691	0,9758	0,9585	0,068	0,03	0,0001	0,0005	0,0032	0,0427		0,58***	0,59***	0,22
13	0,75	0,529	0,8371	0,1908	0,502	0,0142	0,0055	0,3447	0	0,0005	0,0275	0		0,64***	0,19
14	0,4961	0,1091	0,0788	0,5437	0,9997	0,0193	0,0061	0,0193	0	0	0,1419	0	0		0,27*
15	0,8642	0,464	0,9807	0,0034	0,7175	0,2662	0,0558	0,3522	0,1933	0,0308	0,0021	0,0883	0,1474	0,039	

Table 1: Corrélations et significativité de ces relations entre les différents traits de comportement. Le triangle supérieur représente les coefficients de corrélation, et l'inférieur les p-valeurs associées à ces corrélations. Les corrélations significatives sont indiquées en gras et le nombre d'étoiles représente la force de cette significativité (*: 0,01 < p-val < 0,05 ; **: 0,005 < p-val < 0,01 ; ***: p-val < 0,005). Les numéros des lignes et des colonnes sont explicités ci-dessous.

1. Apprentissage: Choix de la chambre au dernier essai
2. Apprentissage: Score des pentes de temps passé dans les chambres
3. Attractivité au 1^{er} essai (apprentissage spatial)
4. Attractivité au 2^e essai (apprentissage spatial)
5. Attractivité au 3^e essai (apprentissage spatial)
6. Attractivité pour la totalité du test (habitation)
7. Attractivité à partir de la 1^{ère} approche (habitation)
8. Timidité au 1^{er} essai (apprentissage spatial)
9. Timidité au 2^e essai (apprentissage spatial)
10. Timidité au 3^e essai (apprentissage spatial)
11. Timidité (habitation)
12. Activité au 1^{er} essai (apprentissage spatial)
13. Activité au 2^e essai (apprentissage spatial)
14. Activité au 3^e essai (apprentissage spatial)
15. Activité (habitation)

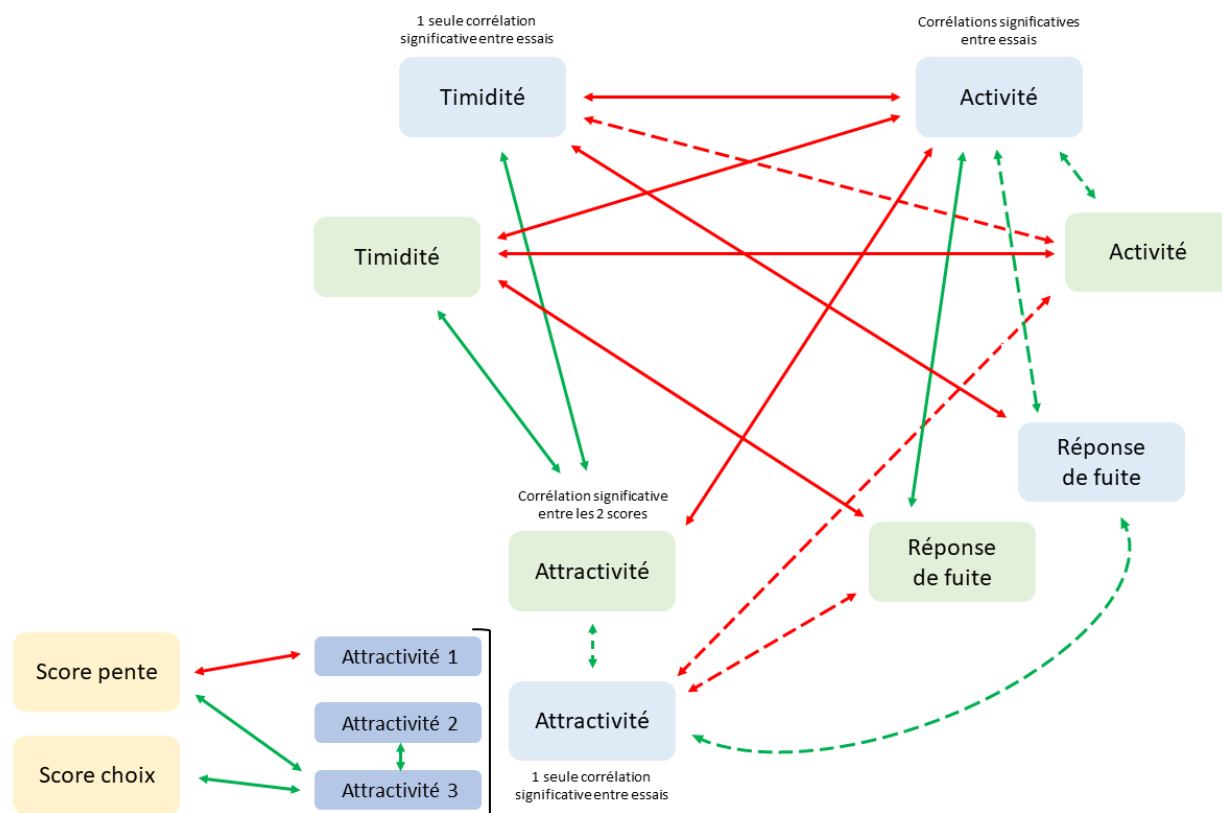


Figure 23: Représentation synthétique et simplifiée des différents syndromes comportementaux et cognitifs observés. Les cadres verts représentent les valeurs issues du test d'habituation ; les cadres bleus, du test d'apprentissage spatial ; et les cadres oranges, les scores d'apprentissage. Les flèches vertes représentent les corrélations significatives positives ; les flèches rouges, les corrélations négatives significatives ; et l'absence de flèche, aucune corrélation significative. Les flèches pleines indiquent que la majorité des corrélations étaient significatives et les flèches pointillées, que la plupart n'étaient pas significatives.

pour le test d'habituation, en plus d'être corrélé entre eux, sont corrélés positivement avec presque tous les scores de timidités mesurés, et négativement avec presque toutes les mesures de l'activité des individus dans labyrinthe.

En ce qui concerne la réponse à un stress ou une menace, les résultats montrent que les individus qui ont réagi par la fuite lors de l'ouverture de la porte au 1^{er} et 2^e essai avaient en moyenne un score de timidité pour l'apprentissage spatial significativement plus bas (p-valeurs de 0,025 et 0,00016). Un résultat similaire a été trouvé pour l'habituation (p-valeur de 0,046). Les individus ayant réagi par la fuite pour le 2^e essai et lors de la pose de la colonne du test d'habituation avaient également un score d'activité plus haut au labyrinthe (p-valeur de 0,00013 et 0,0088). Cependant, pour le 3^e essai, il n'y avait plus de différence pour ces deux traits de personnalité entre les individus

qui fuyaient ou restaient immobiles, mais les individus qui ont produit un comportement de fuite avaient une attractivité significativement plus grande (p -valeur = 0,018). Ce dernier résultat est cependant plus discutable, car on observe une relation inverse entre les individus qui fuient au 1^{er} essai et le score d'attractivité de l'habituation après la première approche (p -valeur = 0,023).

La figure 23 représente de manière synthétique et simplifiée les différentes corrélations observées entre les traits de personnalité et les scores d'apprentissage. On y voit une corrélation qui semble positive entre attractivité et timidité (bien qu'aucune corrélation significative n'ait été détectée entre la timidité et les score d'attractivité du labyrinthe, et que les coefficients de corrélations soient tous proches de 0 pour ceux-ci). Il semblerait également qu'il y ait une corrélation positive entre la réponse de fuite face à une menace et l'activité mesurée lors du test du labyrinthe. On peut également observer une tendance à avoir de nombreuses corrélation négatives entre ces 2 groupes de personnalité. On aurait donc un syndrome comportemental avec d'un côté, des individus timides, très attirés par le coton, peu actifs et qui s'immobilisent en cas de menace, et de l'autre des individus actifs, audacieux, moins attirés par le coton, et qui fuient en cas de menace. Chaque individu se placerait alors approximativement le long de ce gradient.

On remarque également que les scores d'apprentissage sont corrélés uniquement aux mesures d'attractivité du test d'apprentissage spatial, et ce de manière différente entre les 3 essais.

4.1.3.3 Modèles expliquant l'apprentissage par l'ensemble des comportements

Des modèles ont également été testés afin de vérifier si certaines variables comportementales "expliquent" les résultats aux scores d'apprentissage. Le modèle linéaire généralisé utilisé pour tenter d'expliquer le choix de la chambre au dernier essai montre un effet significatif de l'attractivité mesurée au 3^e essai, tout comme l'ACP, avec un $\beta_{estimé}$ de 7,39. On constate cependant également un effet de l'attractivité mesurée aux 1^{er} et 2^e essais, avec des $\beta_{estimés}$ respectivement de -3,56 (p -valeur = 0,044) et -6,34 (p -valeur = 0,042). Il y aurait donc possiblement une corrélation négative entre l'attractivité aux deux premiers essais et le choix de la chambre au dernier essai. Pour ce qui est du modèle linéaire du score d'apprentissage utilisant les pentes de temps, deux effets significatifs ont été mis en avant: une corrélation négative avec l'attractivité mesurée au 1^{er} essai et une positive avec l'attractivité mesurée au 3^e essai, comme l'avait déjà montré l'ACP. Cependant, le type de réaction de l'individu lors de l'ouverture de la porte ou le placement de la colonne (fuite ou immobilisation) ne semble pas corrélé avec les résultats d'apprentissage.

Ces résultats semblent donc plutôt cohérents avec ce qui a été observé lors de l'ACP sur l'ensemble des comportements. Mais ces modèles ajoutent deux informations: une corrélation négative entre l'attractivité au 2 premiers essais sur le choix de la chambre au dernier essai, et une absence de corrélation avec la réponse face à une menace.

4.2 Tests épigénétiques

4.2.1 Contrôles

Plusieurs contrôles ont été effectués tout au long des manipulations afin de vérifier que chaque étape a fonctionné correctement.

Après extraction, il a été vérifié que l'ADN extrait des échantillons de cerveaux était en quantités suffisantes, mais aussi qu'il n'était pas contaminé par des protéines ou des solvants, ni fragmenté. Ces deux premières informations ont été fournies par le Nanodrop, dont les résultats par échantillons sont visibles dans l'Annexe 7. Il a été mesuré que la concentration en acide nucléique des échantillons était d'en moyenne $125 \pm 34 \text{ ng}/\mu\text{L}$, ce qui est une concentration suffisante pour la suite de l'analyse. On y voit également des rapports d'absorbance entre 260nm et 230nm de $1,98 \pm 0,04$, et entre 260nm et 230nm de $2,09 \pm 0,19$, montrant un faible taux de contamination par des solvants ou protéines. La fragmentation de l'ADN a été estimée par un gel d'électrophorèse (voir l'Annexe 8). Celui-ci montre que les échantillons d'ADN n'étaient que très peu fragmentés.

L'efficacité du traitement bisulfite a été vérifiée lors de l'étape de pyroséquençage. L'ajout dans la séquence d'un C juste avant un T converti pendant le traitement permet de voir le pourcentage de C qui n'ont pas été convertis en T. Le résultat issu n'a pas été exploité pour les échantillons dont ce pourcentage était trop haut.

L'efficacité des couples de primers a également été estimée à l'aide de gels d'électrophorèse, qui sont montrés dans l'Annexe 8. Ceux-ci montrent que les primers ont fonctionné correctement pour la plupart des gènes. Seul l'ilot 1 de *grin1b* présente 2 autres amplicons. Ceux-ci n'ont cependant pas affecté les résultats du pyroséquençage. Les quelques échantillons ayant été moins bien amplifiés pour un gène n'ont pas été utilisés pour le pyroséquençage de ce gène. Il est également important de noter que l'échantillon 20-2 n'a jamais été utilisé car il a été contaminé par de l'ADN d'un autre individu lors d'une erreur de manipulation.

Lors du pyroséquençage, en plus du contrôle du traitement bisulfite, sont également vérifiés d'autres paramètres. Le logiciel permet de s'assurer que la séquence soit correcte, ou que d'autres séquences ne contaminent pas d'échantillon étudié. Il contrôle également d'autres problèmes internes au pyroséquençage comme la déviation de la ligne de base, ou que les photons émis soient en quantité suffisante pour pouvoir estimer de manière fiable le pourcentage de méthylation. Les résultats dont la fiabilité était mauvaise à cause de possibles contaminations par d'autres séquences, de la trop faible concentration en photons émis, d'une trop grande déviation de la ligne de base, etc. n'ont pas été pris en considération.

4.2.2 Résultats du pyroséquençage

Le pyroséquençage donne comme résultat le pourcentage de méthylation de chaque CpG, pour chaque individu et chaque séquence. Sur la figure 24, sont représentés les pourcentages de méthylation moyens de chaque CpG de chaque séquence, en séparant les individus à apprentissage rapide et lent. 24 échantillons par séquence ont été testés au pyroséquençage, cependant, certains échantillons de certaines séquences ont dû par la suite être écartés à cause de résultats non exploitables.

On constate quelques différences significatives entre les deux groupes: pour le gène *egr1*, 2 CpG sont significativement plus méthylés chez les individus à apprentissage rapide (CpG7: p-valeur = 0,0007 et CpG: p-valeur = 0,0009). Pour l'îlot 2 de *grin1b*, le CpG1 est significativement plus méthylé chez les "rapides" (p-valeur de 0,006) et le CpG5 chez les "lents" (p-valeur de 0,044). On remarque également pour le CpG8 de l'îlot 2 de *bdnf* un pic chez les individus à apprentissage lent. Ce pic est en réalité dû à un unique individu (20-46) dont la méthylation dépassait les 30% pour ce CpG, et celui-ci n'a donc pas été pris en compte.

On constate donc au total assez peu de différences dans le taux de méthylation entre les individus à apprentissage rapide et à apprentissage lent, et même lorsque ces différences de moyennes sont significatives, elles n'excèdent pas les 1,4%. Il est donc peu probable que celles-ci aient un effet biologique. On remarque cependant beaucoup de variabilité dans le pourcentage de méthylation des CpG de *mecp2*, avec des variations qui vont de 2-3% jusqu'à plus de 20% pour certains CpG.

La figure 25 montre que cette variation de pourcentage de méthylation de *mecp2* provient en fait d'une très grande variabilité dans le pourcentage de méthylation entre les individus, mais qui semble plutôt constante sur l'ensemble de la séquence (pour les valeurs de méthylation pour chaque CpG

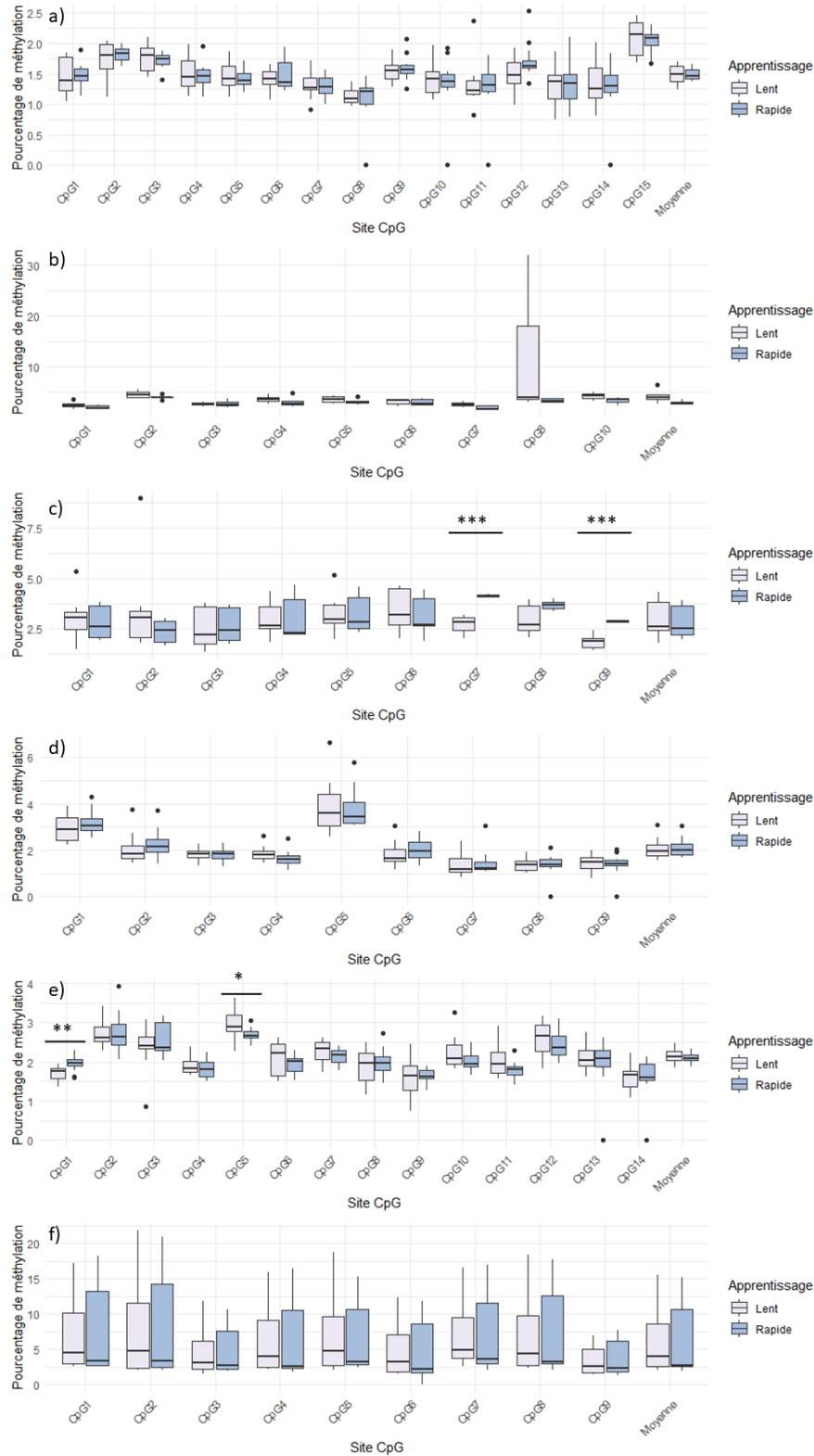


Figure 24: Pourcentage de méthylation moyen de chaque CpG, pour chaque séquence étudiée, en distinguant les individus à apprentissage lent (bleu clair) des individus à apprentissage rapide (bleu foncé). La dernière colonne ("Moyenne") représente la moyenne de tous les CpG de la séquence. a) *bdnf* ilot 1 (apprentissage lent n = 12 et rapide n = 12) ; b) *bdnf* ilot 2 (lent n = 4 et rapide n = 5) ; c) *egr1* (6 premiers CpG: lent n = 7 et rapide n = 5 ; 3 derniers CpG: lent n = 6 et rapide n = 2) ; d) *grin1b* ilot 1 (lent n = 12 et rapide n = 12) ; e) *grin1b* ilot 2 (lent n = 12 et rapide n = 12) ; f) *mecp2* (lent n = 10 et rapide n = 9).

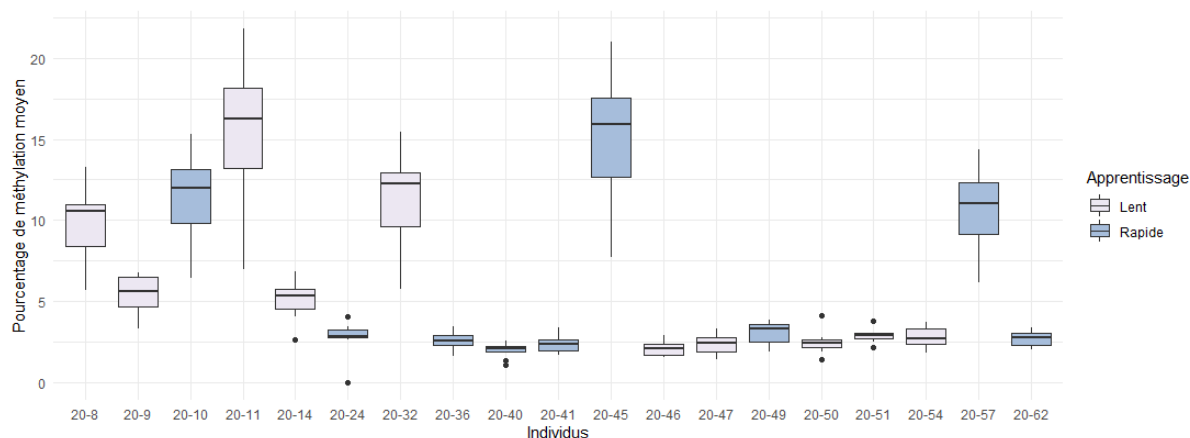


Figure 25: Pourcentage de méthylation moyen de l'ensemble des CpG de la séquence étudiée pour le gène *mecp2*, pour chaque individu. En bleu clair sont représentés les individus à apprentissage lent et en bleu foncé à apprentissage rapide.

de chaque individu, voir Annexe 9). On constate en effet avec un modèle (test de Kruskal-Wallis) que le niveau de méthylation est significativement influencé par l'identité de l'individu (p-valeur $< 2,2 * 10^{-16}$). Le pourcentage de méthylation est également significativement influencé par le site CpG (p-valeur = 0,014). Un test de répétabilité a également permis de confirmer cette tendance (répétabilité moyenne de 0,91, et p-valeur de $4,3 * 10^{-86}$). On remarque enfin que cette variation ne semble à nouveau pas liée aux capacités d'apprentissage du poisson. Afin d'essayer de comprendre la variabilité observée entre les individus, ce gène a été investigué plus en détail.

4.2.3 MeCP2

Puisque la méthylation est constante et très répétable au sein des individus, c'est la moyenne de méthylation de l'ensemble des CpG de la séquence qui a été utilisée pour chaque individu dans les analyses suivantes.

4.2.3.1 ACP comprenant le taux de méthylation moyen de *mecp2*

Une ACP a été réalisée sur l'ensemble des traits de personnalité et d'apprentissage, à laquelle on a ajouté le pourcentage de méthylation moyen de la séquence de *mecp2*. Cela permettra de vérifier si le pourcentage de méthylation est corrélé avec un de ces traits. Celle-ci n'inclue que les 19 poissons dont il y a des résultats pour la méthylation. On voit sur cette ACP (figure 26) que le niveau de méthylation semble suivre approximativement les axes 2 et 3 de l'ACP (figure 26a) et b)). Cependant, bien que les axes 1, 2 et 4 semblent représenter approximativement les mêmes informations que dans l'ACP précédente, on constate que l'axe 3 semble nettement moins représenté

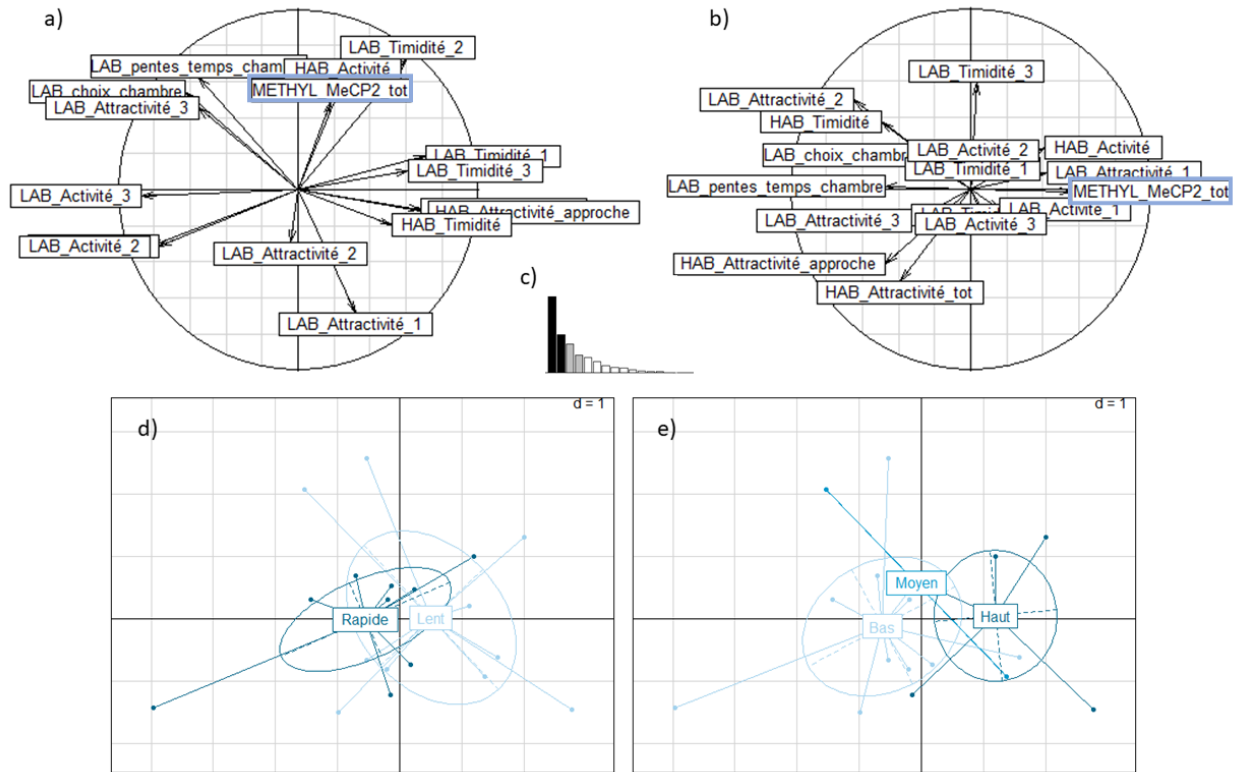


Figure 26: Cercles de corrélations de l'ACP, selon a) le plan 1-2, b) le plan 3-4, incluant la valeur de méthylation moyenne des individus. La flèche représentant la valeur de méthylation moyenne est encadrée en bleu sur les schémas. c) Représentation des valeurs propres pour chaque axe. Les 4 premiers axes représentent 76% de la variation totale. d) Position des individus selon le plan 3-4 et groupés par rapidité d'apprentissage ; e) groupés par pourcentage de méthylation ("bas" <5% ; 5% < "moyen" < 10% ; "haut" > 10%).

	Coefficient de corrélation	P-valeur
LAB.choix_chambre	-0,05	0,84
LAB.pentes_temps_chambre	-0,1	0,68
LAB.Attractivité_1	0	0,99
LAB.Attractivité_2	-0,4	0,091
LAB.Attractivité_3	-0,1	0,68
HAB.Attractivité_tot	0,03	0,91
HAB.Attractivité_approche	0	0,99
LAB.Timidité_1	0,28	0,24
LAB.Timidité_2	0,28	0,25
LAB.Timidité_3	-0,1	0,69
HAB.Timidité	-0,03	0,92
LAB.Activité_1	-0,18	0,47
LAB.Activité_2	-0,26	0,28
LAB.Activité_3	-0,16	0,52
HAB.Activité	0,45	0,055

Table 2: Corrélations entre le taux moyen de méthylation de *mecp2* pour la séquence étudiée et les différents traits de comportement. Abréviations: HAB = habituation ; LAB = labyrinthe (apprentissage spatial) ; 1, 2, 3 = numéro de l'essai ; LAB.choix_chambre = score d'apprentissage en fonction du choix de la chambre ; LAB.pentes_temps_chambre = score d'apprentissage en fonction des pentes des temps passés dans les chambres.

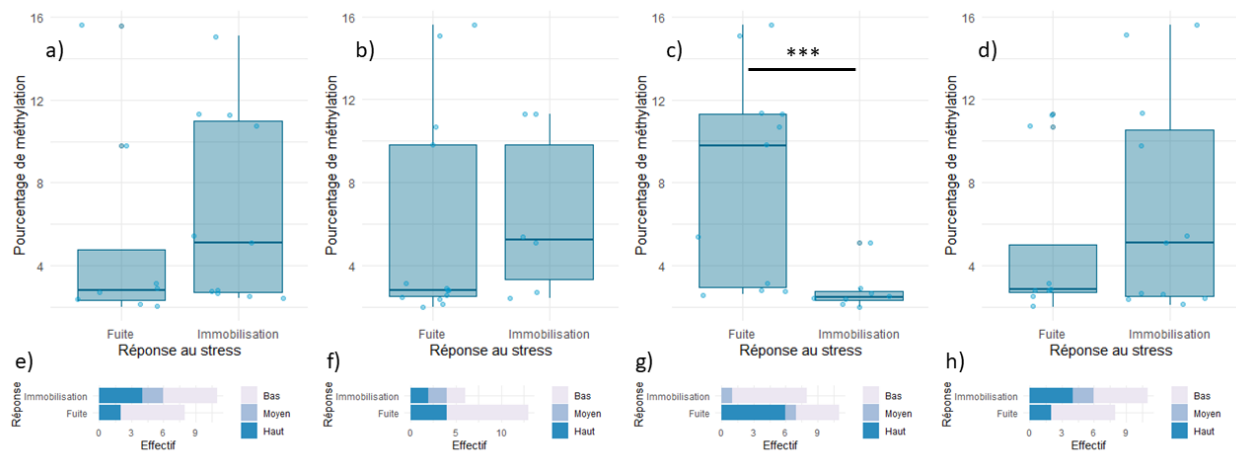


Figure 27: Réponses à un stress en fonction du pourcentage moyen de méthylation des CpG dans la séquence de *meep2* étudiée.

(a) à (d): Chaque individu a été classé en fonction de la réponse comportementale: à l'ouverture de la porte du labyrinthe pour les graphes (a) à (c), ou la pose de la colonne du test d'habituation pour le graphe (d). Sur la figure sont représentés les boxplots du pourcentage de méthylation moyen des individus en fonction de si l'individu a réagi par la fuite, ou s'est immobilisé.

(e) à (h): Ces mêmes réponses sont représentées sous forme d'histogrammes représentant le nombre d'individus ayant réalisé chaque réponse (immobilisation ou fuite), où les différentes couleurs représentent le nombre d'individus de chaque groupe de méthylation.

(a) et (e) représentent la réponse au 1^{er} essai du labyrinthe ; (b) et (f) au 2^e essai du labyrinthe ; (c) et (g) au 3^e essai du labyrinthe ; (d) et (h) à l'habituation.

par les scores d'apprentissage. Sur la figure 26b), on observe en effet que les flèches sont assez petites, et la figure 26d) montre qu'à l'exception de quelques individus extrêmes, les deux groupes semblent assez confondus. Donc bien qu'un potentiel gradient de *meep2* soit représenté le long de cet axe (figure 26e)), on ne peut pas conclure à une corrélation avec l'apprentissage. Le tableau 2 des corrélations confirme que les coefficients de corrélation entre les scores d'apprentissage et le taux de méthylation de *meep2* sont très proche de 0, et que cette corrélation n'est pas du tout significative. On remarque également sur ce tableau qu'aucune autre relation n'est significative. On ne constate qu'une potentielle tendance de corrélation positive avec l'activité au cours de l'habituation (p-valeur = 0,055) et une autre négative avec l'attractivité au 2^e essai du labyrinthe (p-valeur = 0,091), qui correspondent à la variation selon l'axe 2 de l'ACP.

4.2.3.2 Corrélations entre le taux moyen de méthylation de *meep2* et la réponse à un stress

On peut également chercher si le pourcentage de méthylation est corrélé à la réponse des individus face à un stress. Sur la figure 27, les différentes réponses au stress sont représentées en fonction du

niveau de méthylation des individus. Sur les boxplots a), b) et d), on observe que les moyennes de méthylation sont assez proches entre les groupes "immobilisation" et "fuite". On constate en effet qu'aucune de ces 3 différences n'est significative. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre le taux de méthylation des CpG pour la séquence de *mecp2* et la réponse de l'individu à l'ouverture de la porte pour les 2 premiers essais de l'apprentissage spatial et lors de la pose de la colonne pour le test d'habituation. On observe d'ailleurs que la proportion de chaque couleur (donc chaque groupe de niveau de méthylation) sur les histogrammes e), f) et h) sont à peu près identiques entre les groupes immobilisation et fuite. Seul l'histogramme g) diffère: on y voit que l'entièreté des individus qui ont un haut taux de méthylation (le bleu le plus foncé) ont tous réagi par la fuite. Cela est également visible sur le graphe c), pour lequel le niveau de méthylation moyen des CpG du gène *mecp2* est significativement plus haut pour les individus ayant répondu par la fuite que pour ceux qui se sont immobilisés (p-valeur = 0,002). Cela montrerait qu'au 3^e essai du labyrinthe, les individus aux CpG fortement méthylés pour la séquence étudiée pour *mecp2*, ont tendance à préférer fuir, plutôt que rester immobiles, alors que les individus dont les CpG sont peu méthylés utilisaient l'une ou l'autre défense face à une menace.

5 Discussion

5.1 Comportement durant les tests, variabilité entre individus et syndromes cognitifs

5.1.1 Interprétations des résultats d'apprentissage

Pour commencer, le comportement général des poissons face aux tests peut nous renseigner sur la capacité des tests à évaluer l'apprentissage. En ce qui concerne le labyrinthe, les résultats semblent montrer premièrement que le coton n'est pas perçu depuis la chambre d'acclimatation, ou que s'il est perçu, il n'a pas un effet attractif significatif sur le poisson au premier essai. Cela signifierait que si les poissons orientent leur choix au fur et à mesure du test, ils n'orientent pas ce choix de manière innée, mais à la suite d'un apprentissage. Ensuite, il semblerait que cette lignée de *K. marmoratus* soit de manière générale plutôt attirée par le coton, puisque ils passent en moyenne significativement plus de temps dans la chambre avec le coton que dans la chambre sans. Il est cependant plus difficile de tirer des conclusions individuelles pour ces deux résultats, car il n'est pas possible de faire des répétitions pour le choix de la chambre au premier essai pour chaque individu, et qu'il y en a trop peu (3) pour l'attractivité pour distinguer des individus significativement attirés par le coton. Cependant, pour ce dernier, beaucoup de variabilité entre les poissons a pu être observée, et on ne peut pas être certains que la totalité des individus étaient attirés par le coton.

La représentativité des scores a également été évaluée, ce qui a permis de constater que le choix de la chambre au dernier essai pouvait être dû au hasard. Cependant, on observe une certaine évolution du comportement global des individus, car la moyenne du score se basant sur les pentes de temps passé dans chaque chambre est significativement différente de 0, et positive. Donc en moyenne, les individus ont passé de plus en plus de temps dans la chambre possédant le coton au fur et à mesure des essais, ce qui semble montrer un apprentissage. Une première hypothèse serait donc que les individus ne choisissent pas la chambre en fonction de ce qu'ils ont appris, par exemple parce que l'arène étant assez petite, ils peuvent passer de l'un à l'autre facilement et en peu de temps. Mais on constate une corrélation positive entre les 2 scores d'apprentissage, ce qui tendrait à faire penser que le choix de la chambre représente en partie un certain apprentissage également. Il suffirait donc peut être d'un plus grand nombre d'individus pour avoir une différence significative, ou de plus d'essais pour que ce comportement se manifeste plus clairement (certains individus à apprentissage plus lent auraient aussi appris).

Cette corrélation montre également qu'il peut être intéressant d'utiliser les deux scores ensemble, car bien que le score se basant sur les pentes de temps semble déjà montrer une évolution de comportement seul, le fait qu'il s'agisse d'un score induit nécessairement une simplification des données. Le choix de la chambre au dernier essai ne peut également pas être utilisé seul puisqu'il pourrait être expliqué par le hasard. De plus, un autre problème de cette variable, est que si les individus à apprentissage rapide sont supposés n'aller que du bon côté, ceux à apprentissage lent iront au hasard dans une des 2 chambres. Aller dans la chambre avec coton n'indique donc pas nécessairement un apprentissage rapide. L'idéal est donc d'associer les 2 scores, afin qu'ils compensent les biais l'un de l'autre, de sorte à avoir un résultat plus proche de la réalité.

Une autre faiblesse potentielle de ce test, est que les résultats au score d'apprentissage pourraient être liés à certains facteurs, comme à l'attractivité de l'abri pour chaque individu. Il n'a pas pu être distingué des individus significativement attirés par l'abri, mais on observait beaucoup de variation dans la moyenne de l'attractivité, et cela peut impacter l'expérience. En effet, si certains sont plus attirés par le coton que d'autres, le renforcement positif de la récompense n'est peut-être pas le même pour tous les poissons. Dans ce cas, la différence dans le score d'apprentissage ne serait pas due à des capacités d'apprentissage différentes, mais à une motivation plus ou moins forte à apprendre. Il est assez difficile d'évaluer l'effet de l'attractivité, étant donné que le score se basant sur les pentes de temps passé dans chaque chambre correspond en quelques sortes à une mesure de l'évolution de cette attractivité. Mais on observe tout de même que ça ne semble pas être le cas pour le test d'apprentissage spatial, car comme cela est visible sur la figure 21, l'attractivité moyenne n'est pas du tout corrélée avec l'axe d'intelligence.

Cependant, ce facteur a pu jouer pour la difficulté à interpréter le test d'habituation. Par exemple, sur la figure 17, l'individu du graphe e) était sans doute particulièrement néophobe, et il ne s'est presque pas approché de la colonne durant les 2h30 de test, alors que les individus le faisaient en moyenne après une dizaine de minutes. A l'inverse, l'individu 20-11 (c) était très attiré par la colonne et a passé en moyenne beaucoup de temps près de celle-ci. Le calcul de l'apprentissage de l'habituation indiquerait que le poisson a mis 2h30 à apprendre, et que cet apprentissage n'est toujours pas fini à la fin du test, mais il y a également une autre hypothèse. La colonne étant assez haute, elle faisait de l'ombre derrière laquelle certains poissons allaient se cacher, ils étaient donc attirés par la colonne pour une autre raison que celle de l'apprentissage. Le pattern très irrégulier

visible sur le graphe est probablement plus proche de ce comportement d'attractivité de la colonne, où le poisson fait des allers et venues entre la zone sûre proche de la colonne et le reste de l'arène, que de celui plus net de l'apprentissage, tel que visible en a). Il est cependant souvent difficile de distinguer les 2, comme pour le graphe b), d) ou f), et il a donc été décidé de ne pas exploiter les données d'habituation. On constate donc que des traits de personnalité pourraient probablement influencer le comportement indépendamment de l'apprentissage lors du test et biaiser les résultats de manière conséquente.

5.1.2 Constance dans les traits de personnalité observés

On a pu constater dans les résultats un effet individuel significatif pour l'ensemble des traits de personnalité, ce qui montre que pour chaque trait, il y avait au moins 2 individus qui agissait de manière significativement différente l'un par rapport à l'autre. La variabilité au sein des individus est donc inférieure à celle entre les individus. Cependant, la répétabilité n'était significative que pour l'audace et l'activité, et pas pour l'attractivité et la réponse au stress. Cela est probablement dû à une évolution du comportement au cours des différents essais pour ces 2 derniers traits. On observe en effet que l'effet de la vidéo est significatif pour la réponse au stress et presque significatif (p -valeur de 0,053) pour l'attractivité. Ces résultats sont assez cohérents avec ce qui a été observé sur l'ACP des différents comportements: on observait que les flèches étaient orientées de manière assez différentes entre les 3 essais pour l'attractivité, alors que celles de l'activité et la timidité étaient plus proches l'une de l'autre. Les trois essais de l'activité étaient d'ailleurs significativement positivement corrélés entre eux. En ce qui concerne la réponse au stress, il est, de plus, plus compliqué de trouver une potentielle répétabilité au sein des individus, du fait que ce soit une variable binaire et qu'il n'y ait que 3 essais. Cependant, il a été constaté que certains traits de personnalité pouvaient évoluer au cours du développement chez le rivulus (Edenbrow and D. Croft 2011), et le fait que les différents réplicats aient été réalisés sur un très court laps de temps ne traduisent pas une possible variation à plus long terme.

On constate également que la réponse des individus n'est pas la même lors du test d'apprentissage spatial, et lors du test d'habituation. En effet, bien que des corrélations significatives soient parfois trouvées entre le trait de personnalité mesuré dans le labyrinthe ou lors de l'habituation, la valeur du coefficient de corrélation est généralement plus faible que celles retrouvées entre les 3 essais de l'apprentissage spatial. Cela est également visible sur le cercle des corrélations de l'ACP, on y voit que les différentes flèches de l'apprentissage spatial sont plutôt regroupées pour l'activité

et la timidité, et que celle de l’habituation est un peu plus éloignée. On pourrait expliquer cela par le fait que le protocole est différent, que la situation n’est pas identique et qu’elle perçue de manière différente par chaque individu. La réponse comportementale est donc différente en fonction de la personnalité, mais il y a toujours une certaine plasticité en fonction de la situation et de l’environnement (Jolles et al. 2019). C’est également ce que l’on retrouve dans le cas de l’habituation. Dans ce cas, ni la personnalité et ni l’environnement n’ont a priori changé, mais la situation a évolué, dû au fait que l’individu a déjà vécu une expérience similaire et donc à son apprentissage.

Il est également intéressant de constater qu’assez peu d’habituation a été observée entre les différents essais du labyrinthe pour les traits de personnalité, contrairement aux tests de personnalité réalisés précédemment dans le laboratoire du Prof. F. Silvestre. Il serait donc intéressant de comparer qu’est ce qui a changé dans les conditions du test qui a permis d’éviter cette habituation. Certains articles préconisent de diminuer le nombre de tests, et la durée de ceux-ci, ainsi que d’augmenter le temps entre les différents essais (Chajma, Kopecký, and Vojar 2020; Mazzamuto et al. 2019). Cependant, l’habituation apparaissait parfois dès le 2^e test (Chapelle 2018), et diminuer de manière conséquente la durée peut avoir un effet sur la fiabilité du test. De plus, les essais du test du labyrinthe étaient parfois plus longs que les tests où l’habituation étaient observées, et le temps entre les essais était nettement plus court (seulement 30 minutes contre 3 semaines pour les tests où l’habituation a été observée) (Chapelle 2018). L’habituation est un apprentissage qui se base sur le fait qu’il est coûteux de réagir à un stimulus si celui-ci n’est pas dangereux ou nocif: on observe alors une diminution progressive de la réponse à ce stimulus. On peut donc émettre l’hypothèse que si le stimulus est toujours perçu comme suffisamment dangereux, l’habituation n’aura pas lieu. Lors du test d’apprentissage spatial, les 3 essais ont été réalisés à seulement 30 minutes d’intervalle, et le poisson n’est jamais sorti de l’arène entre les essais. La situation a donc peut-être toujours été considérée comme ”nouvelle et imprévisible”, comme un seul long test, contrairement à un test à la fin duquel il est remis dans son bocal, et auquel il est réexposé plus tard.

Une autre solution à l’habituation serait d’utiliser plusieurs tests différents pour étudier le même trait de personnalité. Par exemple, l’audace pourrait être estimée à l’aide d’un ”shelter test” et d’un test ”novel object”. De plus, le fait d’exposer le poisson à une nouvelle situation empêcherait non seulement l’habituation d’avoir lieu, mais permettrait d’évaluer la personnalité de manière plus fiable. En effet, il a été observé qu’il peut y avoir une variation plus ou moins grande dans les traits

de personnalité mesurés en fonction de la situation, que ce soit dans cette expérience entre le test d'apprentissage spatial et le test d'habituation, ou lors d'autres études (Jolles et al. 2019; Hubená, Horký, and Slavík 2020).

5.1.3 Variabilité entre les individus: intérêt écologique et évolutif

Ce qui a été également remarqué, est que chaque individu avait une manière différente de répondre aux tests qui étaient proposés. Que ce soit dans les traits d'apprentissage ou dans la personnalité, une très grande variabilité a été observée.

Pour ce qui est du score d'apprentissage se basant sur les pentes de temps passé dans les différentes chambres, on constate que malgré le fait que la moyenne soit significativement plus grande que 0, et qu'il y a donc eu une évolution globale du comportement similaire à un apprentissage chez la plupart des individus, cela n'est sans doute pas le cas pour tous. Certains avaient en effet un score très proche de 0, voire même négatif. Ces poissons peuvent avoir, soit des capacités d'apprentissage inférieures à la moyenne, soit un trait de personnalité ou une perception de leur environnement qui les poussent à agir de manière contre-intuitive selon nous. Mais dans les 2 cas, cela montre que les individus n'adaptent pas leur comportement de la même manière face à la même situation.

Cette variabilité a également été observée dans les traits de personnalité. Par exemple, pour l'audace, les poissons sortaient après en moyenne un peu plus de 7 minutes. Cependant, certains poissons sortaient après moins d'une minute, et un poisson (qui n'a donc pas été utilisé), n'est sorti de la chambre d'acclimatation pour aucun des 3 essais. Cette variabilité a été constatée pour tous les traits de personnalité étudiés, puisqu'il y avait pour chacun d'entre eux au moins un individu qui différait significativement d'au moins un autre individu.

Il est déjà bien connu que la variabilité est un des piliers de l'évolution. Parmi la gamme de phénotypes présents dans la population, la sélection naturelle élimine les individus ayant les traits les moins adaptés à leur environnement et les traits favorisant la fitness, s'ils sont héréditaires, sont plus transmis à la génération suivante (Endler 1986). Cependant, l'environnement peut être changeant, et dans ce cas, un trait qui était adaptatif par le passé, peut ne plus l'être dans le futur. La variabilité au sein de la population permet de conserver une variété de phénotypes différents, qui permet donc à cette population d'évoluer en cas de changement des conditions environnementales.

Le comportement et la personnalité sont des aspects du phénotype des individus qui peuvent dans certains cas être héréditaires et soumis à la sélection (Pelletier and Garant 2012). Par exemple, chez l'espèce de poisson *Pacifastacus leniusculus*, les individus des populations pour lesquelles la nourriture est peu abondante montrent une personnalité plus agressive, audacieuse et active, car la compétition est plus forte dans cet environnement (Pintor, Sih, and Bauer 2008). Mais l'environnement étant variable, il peut également y avoir de la variabilité spatiale et/ou temporelle dans la sélection, et donc conserver de la variation est important pour les populations (Pelletier and Garant 2012). Par exemple, chez les écureuils *Tamiasciurus hudsonicus*, l'agressivité et l'activité des femelles est corrélée à la survie des jeunes et à leur rapidité de croissance, mais cette corrélation pourrait être modulée voire inversée en fonction de la variation annuelle d'abondance de la nourriture (Boon, Réale, and Boutin 2007). En fonction de l'environnement, certains traits de personnalité pourraient donc être favorisés ou défavorisés, ce qui montre l'importance de conserver une gamme suffisamment large de phénotypes.

En ce qui concerne l'apprentissage, on sait qu'il s'agit d'un trait qui peut être intéressant pour les individus. En effet, cela permet à l'animal d'adapter son comportement à l'environnement à plus courte échelle de temps qu'une génération (Brown 2012). Plus un individu a d'informations sur son environnement, plus sa fitness et sa survie en sont augmentée (Dall et al. 2005). Par exemple, lors de l'expérience réalisée pour ce mémoire, les individus qui avaient appris où se trouvait le coton auraient pu se réfugier en cas d'attaque par un prédateur. On observe cependant de la variabilité dans ce trait également. Cela peut être expliqué par le fait que l'apprentissage est également coûteux pour les individus. Tout d'abord, la recherche d'information nécessite beaucoup d'énergie et de temps. De plus, cette phase pendant laquelle l'individu recherche les informations sur son environnement n'est pas nécessairement adaptative car il n'a pas encore appris comment se comporter, alors qu'elle lui a coûté de l'énergie et du temps (Brown 2012; Dall et al. 2005). De plus, le cerveau et les tissus neuraux nécessitent beaucoup d'énergie. On estime que chez l'homme, 20% de l'énergie assimilée quotidiennement est utilisée pour alimenter le cerveau, alors qu'il ne compte que pour 2% de la masse totale (Raichle and Gusnard 2002). Or la masse de tissus neuraux semble souvent corrélée aux capacités d'apprentissage (Brown 2012; Dall et al. 2005). Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre l'apprentissage et ses coûts, ce qui peut faire apparaître plusieurs stratégies différentes. Cela est d'autant plus vrai que certains traits peuvent compenser des capacités cognitives plus basses. Par exemple, chez les mésanges *Parus major*, la compétitivité est inversement corrélée avec la capacité à résoudre un problème. On peut interpréter cela par le

fait que les individus très compétitifs n'auraient pas besoin de grandes capacités cognitives, car ils ont accès aux ressources facilement. Cependant, les individus peu compétitifs pourraient trouver ce dont ils ont besoin dans les ressources plus difficiles d'accès, qui nécessitent de résoudre des problèmes et où la compétition est donc inférieure (Cole and Quinn 2012).

La variabilité des comportements, comme pour tous les autres traits des individus, peut également avoir un effet sur la dynamique des populations. En effet, bien que la personnalité des individus a un impact sur leur fitness, la sélection naturelle qui agit sur ces traits de personnalité n'est pas suffisante pour stabiliser ces traits et supprimer la variabilité (Pelletier and Garant 2012). De par le fait que ces comportements ont un effet sur la survie, la dispersion et la reproduction, cette variabilité doit nécessairement affecter, positivement ou négativement, la croissance de la population (Wolf and Weissing 2012; Pelletier and Garant 2012). De plus la variabilité dans la personnalité peut avoir un effet sur la compétition, comme chez les mésanges (Cole and Quinn 2012), mais aussi à beaucoup plus large échelle, sur les interactions interspécifiques, les communautés et écosystèmes (Wolf and Weissing 2012). Les différents types comportementaux présents au sein d'une espèce peuvent en effet interagir avec des espèces différentes, puisqu'ils n'interagissent pas de la même manière avec leur environnement, et ils peuvent même être distribués différemment dans le milieu. La variabilité est donc également importante pour comprendre la structure et la dynamique des réseaux écologiques (Wolf and Weissing 2012).

On constate donc de la variabilité comportementale chez *Kryptolebias marmoratus*, malgré la très faible variabilité génétique, puisqu'une seule lignée isogénique a été utilisée. Une autre source de variation doit donc entrer en jeu pour produire ce phénomène. Cela est d'autant plus important pour cette espèce qu'elle vit dans des mangroves. En effet, ces milieux possèdent une forte hétérogénéité spatio-temporelle, dans la salinité et la température de surface de l'eau par exemple (Lazareth et al. 2003). De plus, les petits bassins peu profonds dans lesquels il vit (D. Scott Taylor 2000) peuvent s'assécher ou apparaître et amener les individus à devoir adapter leur comportement en peu de temps. L'apprentissage fait sans doute partie des solutions, il permettrait aux individus de mieux connaître les endroits relativement stables dans le temps et d'apprendre au fur et à mesure les évolutions des autres bassins. Mais les individus utilisent probablement également des stratégies alternatives, comme une variabilité dans la résistance aux variations environnementales par exemple, pouvant faire augmenter la variabilité dans les capacités cognitives dans la population.

Cependant, des expériences sur le terrain et sur d'autres lignées sont nécessaires afin de vérifier si ce qui est observé en laboratoire est également valable pour les populations sauvages vivant dans leur milieu naturel. En effet, les individus utilisés proviennent d'un élevage, dont les animaux sont élevés en captivité depuis plusieurs générations. Or, il a déjà été montré que de micro-évolutions pouvaient survenir en quelques générations de captivité (Fraser et al. 2019). Il serait donc intéressant de savoir si ces résultats pourraient être extrapolables à l'espèce dans la nature ou non.

5.1.4 Syndromes comportementaux et cognitifs: importance écologique et évolutive

5.1.4.1 Syndromes observés

La figure 23 représentant les différents traits de personnalité et d'apprentissage étudiés et leurs relations montre la présence de plusieurs corrélations significatives. Cette figure semble montrer un syndrome comportemental entre l'audace, l'activité, une attractivité faible envers un abri, et une réponse de fuite face à une menace.

Il semble en effet cohérent qu'un individu audacieux soit moins attiré par les abris, ou qu'un poisson actif et audacieux réagisse plutôt par la fuite plutôt qu'en s'immobilisant face à un stress. Bien que cette dernière réponse n'a pas été mesurée comme répétable lors de cette expérience, elle a pu l'être chez un autre poisson, la sole *Paralichthys olivaceus* (Rupia et al. 2016). Dans cet article, ils associent également le comportement de fuite à une défense active et l'immobilisation à une défense passive qui correspondraient aux réponses respectivement des individus audacieux et timides (Rupia et al. 2016), ce qui semble cohérent avec les observations chez *K. marmoratus*.

La corrélation audace-activité a quant à elle déjà été observée chez le rivulus des mangroves lors d'autres expériences, où il a été observé que le temps nécessaire pour sortir d'un abri était négativement corrélé à la distance totale parcourue (Chapelle 2018). De plus, ce syndrome a déjà été observé chez d'autres espèces (Wilson and Godin 2009; Kanda, Louon, and Straley 2012) et semble assez typique (Sih, Bell, et al. 2004). Cependant, plus d'études sont nécessaires pour vérifier que ce syndrome soit valable à l'échelle de l'espèce, car il a été trouvé chez l'épinoche qu'il pouvait y avoir des variations plus ou moins fortes en fonction de la population (Dingemanse et al. 2007).

Cependant, quelques résultats sont moins cohérents. Il est par exemple étonnant que ce soit l'attractivité lors du test d'apprentissage spatial qui soit corrélée avec l'activité lors de l'habituation, et inversement, plutôt que les résultats soient corrélés au sein d'un test. On observe également que

la réponse de fuite au troisième essai du labyrinthe est corrélée positivement avec l'attractivité, et non plus avec l'activité ou l'audace. De plus, les coefficients de corrélation, même significatifs, sont rarement au-dessus de 0,5, donc généralement assez bas. Cela montre qu'il reste tout de même une certaine flexibilité dans le comportement, malgré la présence d'un syndrome comportemental.

On observe également qu'il ne semble pas y avoir de syndromes cognitifs entre l'apprentissage et les traits de personnalité mesurés. Il y a quelques corrélations entre les scores d'apprentissage et l'attractivité, mais difficilement interprétables. Le score d'apprentissage se basant sur les pentes est négativement corrélé à l'attractivité au 1^{er} essai, et positivement corrélé à celle du 3^e essai, mais cela peut-être expliqué par le fait que les deux se basent sur la même information: le temps passé dans les chambres. Pour ce qui est du deuxième score d'apprentissage, il était positivement corrélé à l'attractivité au dernier essai, mais il semblerait que l'attractivité aux deux premiers essais ait un effet négatif sur le choix de la chambre au dernier essai. De plus, lorsque l'on compare l'attractivité moyenne des 3 essais à l'apprentissage il ne semble pas y avoir de corrélations avec aucun des deux scores (figure 21). Une interaction entre attractivité et apprentissage spatial n'est donc pas clairement démontrée. Cependant, il est difficile d'imaginer qu'un poisson qui ne semble pas attiré par le coton et ne le perçoit pas comme un renforcement positif (comme les 16,7% qui ont une moyenne d'attractivité inférieure à 0,5) apprenne tout de même à aller plus souvent dans la chambre possédant le coton. Il serait donc plus fiable d'examiner dans un premier temps la réaction de chaque individu face au coton indépendamment du labyrinthe, afin de mesurer l'attractivité, puis dans un deuxième temps de l'exposer au test d'apprentissage spatial, pour évaluer l'apprentissage.

De plus, les autres types d'apprentissages et de personnalité n'ont pas été investigués. On observe par exemple dans une expérience de Guenther et Brust que la sociabilité des individus est négativement corrélée à la capacité à résoudre des problèmes chez le cochon d'inde. On constate également que l'audace semble positivement corrélée avec la résolution de problèmes et avec l'apprentissage social (Guenther and Brust 2017). L'audace apparaît d'ailleurs comme un trait souvent corrélé à différents types d'apprentissage, et ce notamment chez les poissons. Ce trait de personnalité a été associé aux capacités d'apprentissage associatif chez le bar *Micropterus salmoides* (Louison et al. 2019), et à l'apprentissage social et associatif chez le guppy *Poecilia reticulata* (Trompf and Brown 2014; Dugatkin and Alfieri 2003). Il semblerait que chez beaucoup d'espèces, les individus audacieux expérimentent plus leur environnement et donc apprennent plus vite en situation nouvelle (Carere and Locurto 2011). Cependant, une autre hypothèse indique que les

individus "proactifs" (audacieux, actifs et agressifs) tentent plus de maîtriser leur environnement et sont moins sensibles aux changements subtils, alors que les individus "réactifs" s'adaptent plus facilement à de petits changements dans une tâche familière (Carere and Locurto 2011). On aurait alors que les individus audacieux réussissent plus vite des tâches nouvelles pour lesquelles explorer l'environnement est avantageux, alors que les individus plus timides remarquent mieux les changements subtils et savent donc adapter leur comportement dans une situation proche d'une tâche à laquelle ils sont habitués (Carere and Locurto 2011).

Ce genre de corrélations entre la personnalité et l'apprentissage peuvent être causés par différentes interactions. Tout d'abord, les 2 traits peuvent avoir une cause commune, et dans ce cas, ni l'apprentissage, ni la personnalité n'influe l'un sur l'autre. Afin de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans les capacités cognitives, il suffirait de trouver cette cause commune. Mais il serait possible que l'apprentissage influence la personnalité ou à l'inverse, que la personnalité impacte la vitesse d'apprentissage, comme montré dans les hypothèses de l'effet de l'audace sur l'apprentissage. Il y a alors un rapport de causalité entre les deux traits. Dans le cas où la personnalité impacte l'apprentissage, celle-ci peut le faire de plusieurs manières: soit elle influence directement les capacités cognitives, soit elle facilite les conditions d'apprentissage sans nécessairement améliorer les capacités d'apprendre. Un animal curieux, par exemple, aura plus tendance à plus explorer le dispositif de test qu'un animal timide, ce qui pourrait l'amener à résoudre un problème plus vite sans que ses capacités d'apprentissage ne soient nécessairement meilleures. Il est donc possible que la personnalité biaise le résultat du test (Carere and Locurto 2011). La manière de réaliser l'expérience va alors dépendre de l'objectif de celle-ci et de la définition d'apprentissage. S'il s'agit de comprendre les implications écologiques et évolutives de la rapidité d'apprentissage, il n'est pas directement nécessaire de distinguer ce qui est causé par la personnalité ou par les capacités cognitives, car le comportement final produit est suffisant. Cependant, il peut être intéressant de comprendre cette covariation pour identifier quels phénotypes sont optimaux en cas de trade-off entre les traits (Carere and Locurto 2011). Et si le but est d'identifier les mécanismes sous-jacents aux capacités d'apprentissage, il devient intéressant de tenir compte de l'effet de la personnalité afin d'enlever de possibles biais et de réduire la variation due au hasard, ce qui augmenterait la précision du modèle. On voit donc que les mécanismes qui régissent les syndromes cognitifs peuvent influencer la manière dont il faut étudier les capacités cognitives, et qu'il est donc important d'explorer plus en profondeur les liens entre ces différents traits.

5.1.4.2 Impact des syndromes sur l'écologie et l'évolution

D'un point de vue écologique, ces syndromes comportementaux représentent généralement des stratégies alternatives. Par exemple, dans le cas du gradient entre les individus "proactifs" et "réactifs", les individus qui sont audacieux et agressifs auront tendance à obtenir plus de ressources et partenaires de reproduction, mais ils prennent également plus de risques pour les avoir. A l'inverse, les individus timides prendront moins de risques, mais auront (à court-terme) moins de ressources. La meilleure stratégie entre les 2 dépendra de l'environnement (abondance des ressources, présence de prédateurs, etc.) (Sih and Del Giudice 2012). On observe un gradient qui pourrait s'apparenter à cet axe proactif-réactif chez le rivulus des mangroves dans cette expérience. On a en effet pu observer que les individus qui sortaient plus tôt de la chambre d'acclimatation ou les moins néophobes étaient également ceux qui ont fait le plus de transitions entre les zones. A l'inverse, ceux qui ont mis plus de temps à sortir de leur zone de confort ont été également ceux qui sont le plus restés à l'abri de la colonne lors du test d'habituation.

On peut utiliser cette même approche dans le cadre de l'apprentissage, ce qui permet de comprendre le lien et la continuité entre la stratégie de la proactivité et de l'apprentissage rapide. On retrouve en effet ici aussi un compromis, cette fois-ci entre la vitesse d'apprentissage et la précision ou la fiabilité des informations. Les individus qui ont un apprentissage rapide perdent donc en précision des informations, ou ont plus de chance d'apprendre quelque chose de faux, car ils ont moins d'observations sur lesquelles baser leur apprentissage (Sih and Del Giudice 2012). Il y a donc ici aussi une prise de risque (le manque de fiabilité et de précision des informations), qui est contre balancé par un avantage à court terme (l'apprentissage).

Mais ces syndromes comportementaux, en corrélant plusieurs traits de personnalité entre eux peuvent avoir des désavantages d'un point de vue adaptatif, car les comportements corrélés ne sont pas libres d'évoluer indépendamment. Un comportement observé chez un individu peut alors être maladaptatif, mais il n'est pas pour autant contre-sélectionné car il est corrélé à un autre trait qui lui est avantageux pour l'individu (Sih, Bell, et al. 2004). Par exemple, chez le bar, il a été trouvé que l'audace était corrélée avec la rapidité d'apprentissage. Cependant, les individus audacieux étaient également ceux qui se faisaient le plus attraper par les pêcheurs (Louison et al. 2019). La rapidité d'apprentissage pourrait alors être contre sélectionnée à cause de cette corrélation avec l'audace, alors qu'elle peut indépendamment être adaptative. On a alors nécessairement un compromis entre les deux traits de personnalité ou de cognition afin d'obtenir la combinaison comportementale

optimale. Et comme il a déjà été détaillé dans l'introduction, il est important d'en tenir compte en expérimentation en écologie et évolution.

Enfin, un dernier point important concernant l'aspect écologique et évolutif des syndromes cognitifs, est que, en plus des effets de la personnalité sur l'apprentissage détaillés plus haut, il pourrait y avoir des effets de l'apprentissage sur la personnalité. On a en effet déjà pu constater l'importance de l'expérience au début de la vie de l'individu dans le développement de la personnalité (Stamps and Groothuis 2010; Rödel and Meyer 2011). On a donc des effets en boucle, qui pourrait possiblement former des rétro-actions, qu'elles soient positives ou négatives (Carere and Locurto 2011).

5.1.4.3 Comportement, personnalité et syndromes chez le rivulus

On observe chez *K. marmoratus* un syndrome comportemental semblable à l'axe proactivité-réactivité. Peu de mesures différentes ont été récoltées pour confirmer sur base de plusieurs aspects les traits de personnalités, mais on observe pour les deux tests différents une corrélation négative entre la mesure d'activité et la mesure de timidité, ce qui correspond à un syndrome comportemental entre activité et audace. Cependant, ce syndrome ne semble pas toujours complet, car, bien que des expériences sur d'autres lignées montrent une corrélation entre agressivité, audace et exploration (Chang et al. 2012), des expériences sur la lignée DC4 du laboratoire du Prof. Frédéric Silvestre ont montré qu'il n'y avait pas de lien entre l'audace et l'agressivité (Chapelle 2018). On observe également que les capacités d'apprentissage ne semblent pas corrélées avec l'audace/timidité, contrairement à ce qui aurait pu être déduit sur base d'expériences déjà réalisées sur d'autres espèce. On se trouve en effet dans une situation où l'animal est exposé à un environnement entièrement nouveau, et où ce trait de personnalité aurait pu avoir un impact positif sur l'apprentissage. On pourrait donc conclure que le syndrome cognitif entre audace et apprentissage spatial n'est pas présent chez le rivulus des mangroves. Pourtant, cela signifie également que les individus qui sont sortis rapidement de la chambre d'acclimatation n'ont pas appris plus rapidement que ceux qui sont sortis nettement plus tard, malgré l'avantage qu'ils avaient d'avoir plus de temps pour explorer l'arène. Il y a alors 3 hypothèses possibles pour expliquer ce phénomène. Soit (1) le temps supplémentaire dont les audacieux ont profité n'était pas nécessaire pour l'apprentissage et une exploration est suffisante pour développer l'apprentissage, indépendamment du temps d'exploration. Une deuxième hypothèse (2) est que, puisque l'audace et l'attractivité du coton sont anti-corrélé, les poissons peu audacieux étaient en fait plus attirés par le coton, et avaient donc une motiva-

tion plus grande à apprendre. Cette hypothèse expliquerait d'ailleurs également partiellement que l'attractivité n'ait pas d'effet visible sur l'apprentissage. Mais on pourrait également imaginer que (3) les individus plus timides ont développé des capacités cognitives supérieures qui compensent les bénéfices apportés par l'audace lors d'un apprentissage. Il y aurait alors une corrélation négative entre audace et capacités d'apprentissage, qui serait masquée par l'effet positif de l'audace lors d'un apprentissage. Ce point reste toutefois à investiguer, car la répétabilité des résultats d'apprentissage n'a pas été déterminée, et qu'il n'est donc pas possible de confirmer qu'elles sont représentatives des capacités cognitives. De plus, on ne peut pas, avec les résultats obtenus, déterminer quelle hypothèse est vraie. Une expérience de Chang et al. 2012 sur d'autres lignées de *K. marmoratus* ne trouve également aucune corrélation entre certains traits de personnalité (audace, exploration et agressivité) et l'apprentissage spatial. Toutefois, aucune mesure de l'attractivité de la récompense (également des abris), ni de la répétabilité n'a été faite afin d'évaluer un potentiel biais.

Cependant, cette dernière hypothèse permet de soulever un point important. Il a jusqu'à présent souvent été considéré que les résultats observés d'apprentissage étaient causé par les capacités cognitives à laquelle s'ajoutait de la variabilité non expliquée: $Observation = Capacité \pm Variation$. La théorie des syndromes cognitifs permet d'inclure le facteur personnalité dans l'équation, afin de diminuer la variabilité non expliquée: $Observation = Capacité + Personnalité \pm Variation$ (Carere and Locurto 2011). Cependant, les résultats de cette expérience montrent qu'il pourrait y avoir une interaction entre personnalité et capacités cognitives, et qu'ils n'évoluent donc pas indépendamment l'un par rapport à l'autre: $Observation = Capacité + Personnalité + Capacité * Personnalité \pm Variation$. Dans ce cas-ci, ce n'est donc pas parce qu'aucun syndrome cognitif n'a été relevé qu'il n'y a aucun effet de la personnalité sur les capacités cognitives. L'hypothèse (2) montre également qu'il pourrait y avoir des interactions assez complexes entre la personnalité et l'apprentissage observé, ce qui complique d'autant plus l'étude de ces traits.

L'hypothèse (1) selon laquelle l'audace n'a pas d'effet sur les capacités d'apprentissage peut cependant aussi être intéressante et apporter des informations sur *K. marmoratus*. En effet, la sélection naturelle a pu découpler certains traits des syndromes comportementaux et cognitifs de sorte à ce que cette espèce soit mieux adaptée à son environnement. Ces syndromes diminuent en effet la flexibilité des populations et conservent certains traits qui pouvaient être maladaptatifs. Généralement, cette sélection n'est pas suffisamment forte pour faire disparaître les syndromes comportementaux et cognitifs (Pelletier and Garant 2012), mais le milieu très changeant des man-

groves peut avoir exercé une pression plus forte, nécessitant plus de flexibilité et un découplage des personnalités et apprentissages. De plus, même lorsqu'on remarque chez le rivulus des corrélations, celles-ci ont généralement un coefficient de corrélation assez faible et toutes les corrélations ne sont pas significatives. Cela montre que malgré les corrélations observées, celle-ci reste relativement flexible, et permettent plus de souplesse dans la variation des traits de personnalité. Cependant, seuls des hermaphrodites ont été étudiés lors de cette expérience. Or, il a déjà été observé chez le rivulus des mangroves des variations dans les syndromes comportementaux entre mâles et hermaphrodites (Edenbrow and D. Croft 2012), ce qui montre l'importance d'étudier le rôle du sexe dans les syndromes.

5.2 Corrélations avec l'épigénétique

5.2.1 Variation de méthylation observée pour les CpG des séquences étudiées entre les individus à apprentissage rapide et lent

La première chose que l'on peut observer est le faible taux de méthylation global de tous les CpG de la plupart des séquences. Cela est principalement dû au fait qu'il ne s'agit presque que de régions promotrices, et cela montre également qu'il s'agit de gènes fortement exprimés de manière générale.

Peu de différences significatives ont été observées dans la méthylation des CpG pour les individus à apprentissage lent et rapide. Seul la séquence de *egr1* présente 2 CpG dont la méthylation est significativement supérieure chez les "rapides". Il s'agit d'un résultat inverse à ce qui était attendu. En effet, le taux de méthylation global de *egr1* est sensé diminuer à partir de 24h après un apprentissage (C. A. Miller, Gavin, et al. 2010). Il était donc supposé que les individus ayant le mieux appris auraient un taux de méthylation plus faible de ce gène. Cependant, très peu d'individus ont pu être utilisés pour montrer cette différence, il ne peut donc pas être affirmé avec certitude qu'il existe une réelle différence entre les deux groupes. De plus, pour montrer une différence de méthylation avec ou sans apprentissage, les chercheurs ayant déjà investigué le gène utilisaient souvent un groupe témoin n'ayant pas été exposés à un test et un groupe ayant réalisé le test (Jeremy J Day et al. 2013; C. A. Miller, Gavin, et al. 2010). La variation des capacités d'apprentissage n'est peut-être pas suffisante pour montrer une réelle différence entre les 2.

Une deuxième séquence présente 2 résultats significatifs, il s'agit de l'îlot 2 de *grin1b*. Mais pour cette séquence, les 2 CpG montrent des résultats contraires: le taux de méthylation est plus haut chez les individus à apprentissage rapide pour l'un des deux CpG, et pour l'autre, ce taux est plus

haut chez les individus à apprentissage lent. Ce gène ne jouant un rôle que lors d'un apprentissage associatif, il était attendu que les individus ayant un plus haut taux de méthylation auraient des capacités d'apprentissage similaires pour l'habituation, mais inférieures pour des tests d'apprentissage associatifs comme l'apprentissage spatial. Puisque les scores d'apprentissage ne se basent ici que sur le test du labyrinthe, il était attendu que les individus à apprentissage lent aient un taux moyen de méthylation plus haut.

Cependant, pour l'une comme pour l'autre séquence, malgré une différence statistiquement significative, il n'y a probablement pas de différence importante dans l'expression des gènes. En effet, la différence de moyenne de méthylation des CpG entre les deux groupes est entre 0,2 et 1,4%, ce qui est assez faible d'un point de vue biologique. Il semblerait que certaines variations aussi faibles puissent avoir un effet sur l'expression du gène (Breton et al. 2017). Cependant, puisque l'expression des gènes n'a pas été mesurée dans cette expérience, il ne peut pas être affirmé que les faibles variations observées aient un effet biologique. De plus, chez le rivulus des mangroves, il a été observé pour quelques gènes que pour avoir un réel effet sur l'expression, cette différence doit tourner autour des 10 à 20% (Carion 2020; Voisin 2018). En revanche, cela montre que la variation interindividuelle dans la méthylation des différents CpG de la séquence de *mecp2* aurait probablement un effet biologique.

On observe assez peu de différences qui sont significatives entre les individus à apprentissage rapide et lent, et même lorsqu'elles le sont, les différences de méthylation sont trop faibles pour avoir un effet biologique. De plus, il est important de préciser que de nombreux tests ont été réalisés puisque chaque CpG a été testé séparément. La probabilité d'avoir un résultat significatif qui est le fruit du hasard augmente donc beaucoup. On peut alors se demander pourquoi il n'a pas été trouvé de différences entre les individus à apprentissage rapide et lent.

On peut tout d'abord imaginer qu'il y avait bien des différences de méthylation des CpG entre les individus à apprentissage lent et rapide dans les séquences étudiées, mais que ces différences n'étaient perceptibles que dans certaines zones du cerveau des individus. Le fait d'utiliser le cerveau entier a alors pu estomper la différence et elle a donc pu ne pas être perçue. Par exemple, la déméthylation de *egr1* lors de l'apprentissage chez les mammifères n'a lieu que dans le cortex préfrontal (C. A. Miller, Gavin, et al. 2010). Si on avait fait le test uniquement sur la zone équivalente chez le poisson, une différence significative et suffisamment importante pour avoir un effet biologique aurait

peut-être pu être trouvée.

Ensuite, la méthylation n'est pas le seul moyen de régulation des gènes. Certes, la régulation des gènes peut influencer les capacités cognitives chez certaines espèces. Il a par exemple été trouvé que les individus qui avaient un plus grand taux d'ARNm de *bdnf* étaient également ceux qui apprenaient le plus vite (Vaynman, Ying, and Gomez-Pinilla 2004). Pour *mecp2*, les problèmes de sous- et surexpression du gène induisent des déficiences cognitives (Gonzales and LaSalle 2010). Mais il est possible que ce soit plutôt les modifications d'histones ou les microARNs interférents qui influent sur la variabilité des capacités cognitives chez *K. marmoratus*. La méthylation des histones pourrait en effet empêcher la méthylation de la région promotrice, tout en réduisant l'expression du gène (Weber et al. 2007).

De plus, seule une courte séquence de la région promotrice en amont du gène a été étudiée. Il se pourrait que la séquence contenant les CpG régulateurs de l'expression du gène se trouve dans une région promotrice située très loin du gène, ou dans le gène lui-même, que ce soit un intron ou un exon, voire dans une partie non-étudiée de la région promotrice à proximité du début du gène. Par exemple pour le gène *egr1* chez le rat, on remarque une grande variation de la méthylation des CpG en fonction de la séquence étudiée (Jeremy J Day et al. 2013). Cela pourrait non seulement expliquer le peu de différences observées mais également les résultats contre-intuitifs constatés pour les gènes *egr1* et *grin1b* îlot 2.

On peut également imaginer que ce ne sont pas ces gènes-là qui modulent la variabilité interindividuelle des capacités cognitives. Cela entrerait cependant en contradiction avec certains résultats trouvés dans la littérature sur d'autres espèces. Comme dit plus haut, l'expression de certains gènes comme *bdnf* et *mecp2* avait un effet sur les capacités cognitives de l'animal (Vaynman, Ying, and Gomez-Pinilla 2004; Gonzales and LaSalle 2010). Comme l'apprentissage est un phénomène très complexe impliquant de nombreux gènes, il serait toutefois possible que plusieurs gènes différents soient impliqués dans la variation des capacités cognitives. Par exemple, il n'est pas impossible que les capacités d'apprentissage moins grandes du poisson numéro 20-46 soit causé par un taux de méthylation plus haut (>30%) du CpG8 dans la séquence de l'îlot 2 de *bdnf*. Ce n'est pas pour cette raison que cela doit être le cas pour tous les individus, et peut-être que les autres poissons à capacité d'apprentissage plus réduite ont une modification de l'expression d'un autre gène, qui peut être différent pour chacun. Ce serait alors la combinaison de méthylation de tous les gènes

impliqués dans la cognition qui représenterait les capacités d'apprentissage des individus.

Une dernière possibilité est que les scores d'apprentissage mesurés ne soient pas représentatifs des capacités d'apprentissage, et que la distinction apprentissage lent et rapide ne soit donc pas correcte. Cependant, le fait que les 2 scores soient corrélés, alors qu'ils mesurent des aspects très différents du comportement d'apprentissage, indiquerait le contraire. Mais il est impossible de savoir avec ce design expérimental, si l'apprentissage observé n'est qu'un comportement ponctuel ou représentatif des capacités d'apprentissage de l'individu, car aucune répétition n'a été réalisée.

On voit par cela que les causes de la variabilité dans les capacités cognitives sont probablement très complexes, que ce soit les mécanismes qui induisent cette variabilité ou les interactions qu'il peut y avoir entre les différents processus. Lorsque ce n'est pas une lignée isogénique qui est étudiée, il faut de plus ajouter tous les aspects génétiques, ainsi que les interactions entre le génome et l'épigénome. Tout cela rend la variabilité des capacités d'apprentissage d'autant plus complexe à étudier.

Cependant, cette expérience met en avant un résultat intéressant. Il a été observé une variation biologiquement importante de la méthylation des CpG de *mecp2* qui ne serait pas corrélée avec la variation de capacité d'apprentissage spatial qui a été mesurée.

5.2.2 Variation dans la méthylation des CpG de la séquence de *mecp2* étudiée et corrélation aux comportements

Mecp2 est un gène encore mal compris. A l'origine on pensait que la protéine MeCP2 ne se liait à des méthylcytosines que dans des zones très méthylées de l'ADN afin de réduire l'expression du gène cible. On sait maintenant que son rôle est beaucoup plus subtil. Non seulement il ne se lie pas nécessairement à toutes les régions très méthylées, mais en plus il est aussi capable de se lier à des régions très peu méthylées avec l'aide d'autres protéines (Yasui et al. 2007). Et au lieu d'agir uniquement en répresseur, il serait plutôt un moyen beaucoup plus fin de réguler l'expression des gènes autant positivement (en recrutant CREB par exemple), que négativement (en condensant la chromatine) (Guy et al. 2011). MeCP2 joue un rôle particulièrement important dans la cognition: il permet le développement post-natal du cerveau. En effet, il influe sur l'expression des gènes de plasticité neuronale comme *bdnf*, *id1*, *egr2* et *junb*. En fonction de l'activité des différents neurones, il va moduler l'expression de ces gènes de sorte à maturer certaines synapses spécifiques, ce qui permet

l'apprentissage (Gonzales and LaSalle 2010). Chez les mammifères certaines mutations de *mecp2* entraîne des maladies neurologiques graves, telles que le syndrome de Rett, mais une variation de l'expression (autant sous- que surexpression) du gène peut également mener à certains désordres mentaux comme de l'autisme ou du retard mental (Gonzales and LaSalle 2010). Toujours chez les mammifères, le taux de méthylation normal des CpG de la région promotrice de ce gène varie entre 0 et 6% en fonction du CpG, alors que le taux de méthylation des CpG peut dépasser les 12% chez des individus autistes (Nagarajan et al. 2006). Chez les poissons, on pourrait s'attendre à un rôle et à des conséquences similaires en cas de problèmes d'expression, car même s'il y a des différences entre la protéine MeCP2 des mammifères et des poissons, les domaines semblent conservés (Guy et al. 2011).

Cependant, la variation de méthylation des CpG de la séquence étudiée de MeCP2 ne semble pas influencer les capacités d'apprentissage spatial chez le rivulus des mangroves. Il n'y avait en effet aucune différence significative entre la moyenne de méthylation les individus à apprentissage rapide et lent, et ce pour aucun des CpG étudiés. Une surexpression de *mecp2* chez *K. marmoratus* ne causerait donc pas de retard mental. On constate cependant beaucoup de variation entre les individus. Cette variation est également très constante entre les 9 différents CpG d'un même individu. Certains poissons ont en effet tous leurs CpG méthylés à 2 ou 3%, alors que d'autres ont presque tous leurs CpG au-dessus de 10%, avec une moyenne dépassant les 15%. Cette variation devrait influencer l'expression de *mecp2* et avoir un effet biologique (Carion 2020; Nagarajan et al. 2006; Voisin 2018). On peut alors chercher si cette variation d'expression pourrait induire une certaine forme d'autisme chez les poissons.

L'autisme chez l'homme est caractérisé par plusieurs phénomènes. On retrouve tout d'abord de fortes déficiences en interaction sociales et communication, combiné à des activités et intérêts très ciblés et répétés. Il est également intéressant de constater que l'autisme ne mène pas nécessairement à une déficience, ou un retard dans le développement des capacités intellectuelles, comme par exemple dans le syndrome d'Asperger (Frith and Happé 2005; Lord et al. 2020).

Chez le rivulus, on observe tout d'abord 2 potentielles tendances: une corrélation négative entre la méthylation des CpG de *mecp2* et l'attractivité au 2^e essai, et une autre positive avec l'activité mesurée via le test d'habituation. Il serait nécessaire d'à nouveau faire un test avec plus de poissons pour confirmer cette tendance, mais cela pourrait vouloir dire que les individus avec un plus haut

taux de méthylation (les poissons avec une possible tendance autiste) sont moins attirés par le coton et sont plus actifs. Cependant, ces comportements ne sont pas particulièrement cohérents avec ce qu'on aurait pu attendre d'un individu autiste chez l'homme. Ces personnes ont, comme déjà dit plus haut, tendance à beaucoup répéter leurs actions, et à ne pas aimer le changement. On se serait donc attendu à un comportement plutôt néophobe et peu audacieux chez les poissons, plutôt qu'à des individus qui font beaucoup de transitions entre la zone proche de l'objet et le reste de l'arène, et qui ne sont pas attirés par le refuge du coton. Il serait donc nécessaire de répéter cette expérience pour avoir la confirmation de ces tendances, d'autant plus que le nombre de variables testées étant relativement grand, il est probable de trouver des tendances presque significatives par hasard.

On a également constaté que le taux de méthylation des CpG de *mecp2* pouvait être lié au type de réponse produit par les individus à la suite d'un stress ou d'une menace. Lors du 3^e essai, les individus dont les CpG sont fortement méthylés ont tous répondu par la fuite lors de la potentielle menace que représentait l'ouverture de la porte, alors que les individus dont les CpG de la séquence de *mecp2* étaient moins méthylés ont produit les deux réponses de manière approximativement équivalente. Il y a 2 interprétations possibles de ce résultat. Tout d'abord, on peut faire l'hypothèse que les individus dont le taux de méthylation des CpG de la séquence étudiée pour *mecp2* est plus élevé pourraient avoir tendance à développer un comportement de plus en plus audacieux au cours des essais. En effet, la fuite semblait plutôt liée aux individus proactifs, que ce soit dans cette expérience ou dans la littérature (Rupia et al. 2016). Cependant, le dernier essai était le seul pour lequel la réponse ne semblait ni liée à l'activité, ni à la timidité, mais plutôt à l'attractivité. Il se pourrait donc que les individus dont les CpG de *mecp2* sont fortement méthylés soient ceux qui étaient particulièrement attirés par le coton. Cependant, cette dernière hypothèse n'est pas cohérente avec la tendance de corrélation négative entre le taux de méthylation des CpG et l'attractivité au 2^e essai.

L'impact que pourrait avoir la variation de la méthylation du promoteur de *mecp2* chez le riu-lus des mangroves n'est donc pas encore clair. Les différences semblent suffisamment fortes entre les individus pour avoir une variation de l'expression et un effet biologique. Celui-ci pourrait se traduire par une variation du comportement de réponse à une menace après plusieurs essais, et de potentielles autres tendances, mais ces observations ne sont pas très nettes et/ou peu interprétables. Ce gène devrait donc être investigué plus en détail chez cette espèce pour comprendre le rôle qu'il y joue. Par exemple, l'autisme chez l'homme impacte grandement les interactions sociales, et il serait

donc intéressant de s'intéresser à certains traits sociaux chez *K. marmoratus* afin de voir s'ils sont corrélés aux variations de méthylation des CpG de la région promotrice de *mecp2*.

Un résumé des limitations de l'expérience est disponible dans l'Annexe 10.

6 Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus semblent montrer que *K. marmoratus* présente des capacités d'apprentissage spatial. Cependant, cet apprentissage, tout comme les traits de personnalité observés, semblait très variable entre les individus. Des corrélations entre traits de personnalités montrent que cette espèce présente également des syndromes comportementaux. Tous ces traits comportementaux, puisqu'ils influent sur des traits de fitness, comme la survie, la reproduction ou la dispersion, vont influencer les dynamiques de population, mais aussi les interactions entre espèce, ce qui va donc influencer l'écologie de l'espèce. La présence de variabilité va également jouer un rôle important en évolution, car il s'agit d'un des piliers du principe de sélection naturelle. Les syndromes comportementaux et cognitifs peuvent eux aussi influencer l'évolution en corrélant certains traits qui pourraient avoir des valeurs adaptatives opposées, ce qui nécessite alors un compromis. L'absence de syndromes cognitifs observés chez le rivulus pourrait alors nous donner des informations: la pression de sélection dans l'environnement dans lequel il vit a pu être suffisamment forte pour décorrélérer l'apprentissage et la personnalité chez cette espèce, mais pas suffisante pour supprimer toutes les corrélations entre les traits de personnalité. Cela pourrait donc montrer que de la flexibilité peut être très importante dans un environnement changeant comme les mangroves. Cependant, plus d'études sont nécessaires pour pouvoir l'affirmer avec certitude, car des hypothèses alternatives pourraient également expliquer certains résultats.

Il a enfin également été cherché de possible causes épigénétiques à la variabilité dans les capacités cognitives. Cependant, aucun résultat biologiquement important n'a été observé pour les séquences étudiées. Seul la séquence étudiée pour le gène *mecp2* montrait une grande variabilité interindividuelle, mais celle-ci ne semblait pas liée aux capacités d'apprentissage, ni aux traits de personnalité étudiés. Mais ce gène étant lié à l'autisme, il serait intéressant de vérifier s'il pourrait être corrélé à d'autres traits de personnalités comme la sociabilité. De plus, des avancées dans la compréhension du rôle de ce gène chez les poissons pourraient aider à comprendre le rôle qu'il joue chez l'homme, ce qui est d'autant plus important que celui-ci est lié à plusieurs maladies mentales.

Dans la continuité de ce mémoire, il serait intéressant d'approfondir certains points. De nouvelles expériences pourraient par exemple être réalisées dans le but de vérifier s'il y a bien de la constance dans les traits d'apprentissage, ainsi que des corrélations entre les différents types de cognition, et avec la personnalité, et cela chez plusieurs lignées du rivulus des mangroves comme chez d'autres

espèces. Il serait ensuite intéressant d'investiguer les mécanismes sous-jacents à cette constance et à ces corrélations, car cela permettrait de trouver les interactions entre personnalité et cognition. En alliant ces informations à des études sur le terrain, cela permettrait de comprendre leur impact sur l'écologie et l'évolution des espèces. Enfin, la variabilité de méthylation de CpG du gène *mecp2* a semblé particulièrement intéressante à investiguer, autant dans un but de comprendre son rôle chez le rivulus des mangroves, que pour les potentielles avancées dans la compréhension de ce gène chez l'homme.

Bibliographie

- Adams, J. Paige and J. David Sweatt (2002). “Molecular Psychology : Roles for the ERK MAP Kinase Cascade in Memory”. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 42.1, pp. 135–163. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.145401.
- Ahmed, M., K.H. Alzoubi, and O.F. Khabour (2020). “Vitamin E prevents the cognitive impairments in post-traumatic stress disorder rat model: behavioral and molecular study”. In: *Psychopharmacology* 237.2, pp. 599–607. DOI: 10.1007/s00213-019-05395-w.
- Antunes, C. et al. (2019). “TET enzymes in neurophysiology and brain function”. In: *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 102, pp. 337–344. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.006.
- Ashraf, Shovon I. et al. (2006). “Synaptic Protein Synthesis Associated with Memory Is Regulated by the RISC Pathway in *Drosophila*”. In: *Cell* 124.1, pp. 191–205. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.017.
- Atkinson, R.C. and R.M. Shiffrin (1968). *Human memory: A proposed system and its control processes*. Academic Press New York.
- Avalos Cascante, Toa (2017). *Effets de la salinité sur la plasticité développementale chez le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus*: intégration d’approches comportementale, physiologique et épigénétique*. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive.
- Avise, J. C. and A. Tatarenkov (2015). “Population genetics and evolution of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*, the world’s only self-fertilizing hermaphroditic vertebrate”. In: *Journal of Fish Biology* 87.3, pp. 519–538. DOI: 10.1111/jfb.12741.
- Bancroft, Tyler D. et al. (2014). “TMS-induced neural noise in sensory cortex interferes with short-term memory storage in prefrontal cortex”. In: *Frontiers in Computational Neuroscience* 8. DOI: 10.3389/fncom.2014.00023.
- Barak, Omri, Mattia Rigotti, and Stefano Fusi (2013). “The Sparseness of Mixed Selectivity Neurons Controls the Generalization–Discrimination Trade-Off”. In: *The Journal of Neuroscience* 33.9, pp. 3844–3856. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2753-12.2013.
- Barco, Angel, Craig H. Bailey, and Eric R. Kandel (2006). “Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory”. In: *Journal of Neurochemistry* 97.6, pp. 1520–1533. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03870.x.
- Baumgart, Mario et al. (2014). “RNA-seq of the aging brain in the short-lived fish *N. furzeri* – conserved pathways and novel genes associated with neurogenesis”. In: *Aging Cell* 13.6, pp. 965–974. DOI: 10.1111/ace1.12257.
- Beaver, Laura M. et al. (2017). “Adverse effects of parental zinc deficiency on metal homeostasis and embryonic development in a zebrafish model”. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 43, pp. 78–87. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.006.
- Benito, Eva et al. (2018). “RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment”. In: *Cell Reports* 23.2, pp. 546–554. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.059.
- Best, Jonathan D. et al. (2008). “Non-Associative Learning in Larval Zebrafish”. In: *Neuropsychopharmacology* 33, pp. 1206–1215. DOI: 10.1038/sj.npp.1301489.
- Bird, Adrian (2002). “DNA methylation patterns and epigenetic memory”. In: *Genes & Development* 16.1, pp. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Biwer, C et al. (2020). “The Role of Stochasticity in the Origin of Epigenetic Variation in Animal Populations”. In: *Integrative and Comparative Biology* 60.6, pp. 1544–1557. DOI: 10.1093/icb/icaa047.
- Bliss, T. V. P. and T. Lømo (1973). “Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path”. In: *The Journal of Physiology* 232.2, pp. 331–356. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.

- Blumenfeld, Robert S. and Charan Ranganath (2006). “Dorsolateral Prefrontal Cortex Promotes Long-Term Memory Formation through Its Role in Working Memory Organization”. In: *The Journal of Neuroscience* 26.3, pp. 916–925. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2353-05.2006.
- Boon, Adrienne K., Denis Réale, and Stan Boutin (2007). “The interaction between personality, offspring fitness and food abundance in North American red squirrels”. In: *Ecology Letters* 10.11, pp. 1094–1104. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01106.x.
- Bredy, Timothy W. et al. (2011). “MicroRNA regulation of neural plasticity and memory”. In: *Neurobiology of Learning and Memory*. Epigenetics and memory 96.1, pp. 89–94. DOI: 10.1016/j.nlm.2011.04.004.
- Bressman, Noah R. et al. (2019). “Where do fish go when stranded on land? Terrestrial orientation of the mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*”. In: *Journal of Fish Biology* 95.1, pp. 335–344. DOI: 10.1111/jfb.13802.
- Breton, Carrie V. et al. (2017). “Small-Magnitude Effect Sizes in Epigenetic End Points are Important in Children’s Environmental Health Studies: The Children’s Environmental Health and Disease Prevention Research Center’s Epigenetics Working Group”. In: *Environmental Health Perspectives* 125.4, pp. 511–526. DOI: 10.1289/EHP595.
- Brown, Culum (2012). “Experience and learning in changing environments”. In: *Behavioural Responses to a Changing World*. Ed. by Ulrika Candolin and Bob B.M. Wong. United Kingdom: Oxford University Press, pp. 46–62. ISBN: 9780199602568. DOI: 10.1093/acprof:osobl/9780199602568.003.0004.
- Brown, Culum, Jens Krause, and Kevin N. Laland, eds. (2011). *Fish cognition and behavior*. 2nd ed. Fish and aquatic resources series 15. Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN: 978-1-4443-3221-6.
- Bshary, Redouan and Culum Brown (2014). “Fish cognition”. In: *Current Biology* 24.19, R947–R950. DOI: 10.1016/j.cub.2014.08.043.
- Bshary, Redouan, Simon Gingins, and Alexander L. Vail (2014). “Social cognition in fishes”. In: *Trends in Cognitive Sciences* 18.9, pp. 465–471. DOI: 10.1016/j.tics.2014.04.005.
- Bull, J. J. (1987). “Evolution of Phenotypic Variance”. In: *Evolution* 41.2, pp. 303–315. DOI: 10.2307/2409140.
- Bullens, Jessie et al. (2010). “Developmental time course of the acquisition of sequential egocentric and allocentric navigation strategies”. In: *Journal of Experimental Child Psychology* 107.3, pp. 337–350. DOI: 10.1016/j.jecp.2010.05.010.
- Cai, Shi-Qing et al. (2009). “Auto-phosphorylation of a voltage-gated K⁺ channel controls non-associative learning”. In: *The EMBO Journal* 28.11, pp. 1601–1611. DOI: 10.1038/emboj.2009.112.
- Cameron, Katherine A. et al. (2005). “Long-term memory is the representational basis for semantic verbal short-term memory”. In: *Psychophysiology* 42.6, pp. 643–653. DOI: 10.1111/j.1469-8986.2005.00357.x.
- Carere, Claudio and Charles Locurto (2011). “Interaction between animal personality and animal cognition”. In: *Current Zoology* 57.4, pp. 491–498. DOI: 10.1093/czoolo/57.4.491.
- Carion, Alessandra (2020). “Characterization of the brain molecular bases of personalities and assessment of their developmental plasticity in response to environmental stressors using an emerging model fish species, the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*”. PhD thesis. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive, Laboratory of Evolutionary and Adaptive Physiology.
- Chajma, P., O. Kopecký, and J. Vojar (2020). “Individual consistency in exploration and shyness but not activity in smooth newts (*Lissotriton vulgaris*): the effect of habituation?” In: *Journal of Zoology* 311.4, pp. 269–276. DOI: <https://doi.org/10.1111/jzo.12784>.

- Chang, C. et al. (2012). “Aggression and Related Behavioral Traits: The Impact of Winning and Losing and the Role of Hormones”. In: *Integrative and Comparative Biology* 52.6, pp. 801–813. DOI: 10.1093/icb/ics057.
- Chapelle, Valentine (2018). *Etude des traits comportementaux d’audace et d’agressivité, de leur héritabilité et analyse de l’expression relative de gènes impliqués dans ces traits chez le rivulus des mangroves Kryptolebias marmoratus*. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive.
- Chen, Z et al. (2016). “GADD45B mediates podocyte injury in zebrafish by activating the ROS-GADD45B-p38 pathway”. In: *Cell Death & Disease* 7.1, e2068. DOI: 10.1038/cddis.2015.300.
- Christian, Kimberly M. and Richard F. Thompson (2003). “Neural Substrates of Eyeblink Conditioning: Acquisition and Retention”. In: *Learning & Memory* 10, pp. 427–455. DOI: 10.1101/1m.59603.
- Ciccone, N.A. et al. (2017). “Early pathogenesis during infectious bursal disease in susceptible chickens is associated with changes in B cell genomic methylation and loss of genome integrity”. In: *Developmental and Comparative Immunology* 73, pp. 169–174. DOI: 10.1016/j.dci.2017.03.014.
- Cohen, Amit et al. (2008). “Alterations in Micro-Ribonucleic Acid Expression Profiles Reveal a Novel Pathway for Estrogen Regulation”. In: *Endocrinology* 149.4, pp. 1687–1696. DOI: 10.1210/en.2007-0969.
- Cohen, Neal J., Russell A. Poldrack, and Howard Eichenbaum (1997). “Memory for Items and Memory for Relations in the Procedural/Declarative Memory Framework”. In: *Memory* 5.1-2, pp. 131–178. DOI: 10.1080/741941149.
- Cole, Ella F. and John L. Quinn (2012). “Personality and problem-solving performance explain competitive ability in the wild”. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279.1731, pp. 1168–1175. DOI: 10.1098/rspb.2011.1539.
- Colinet, Mathilde (2018). *Etude de la mémoire chez le rivulus des mangroves Kryptolebias marmoratus via l’utilisation des tests comportementaux*. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive.
- Costa, Silvia S et al. (2011). “Sex differences in the dorsolateral telencephalon correlate with home range size in blennioid fish”. In: *Brain, Behavior and Evolution* 77.1, pp. 55–64. DOI: 10.1159/000323668.
- Costa, Wilson J. E. M. (2011). “Identity of Rivulus ocellatus and a new name for a hermaphroditic species of Kryptolebias from south-eastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae)”. In: *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 22.2, pp. 185–192.
- Cotella, Diego and Federico Sesti (2011). “Dynamic Phosphorylation/Dephosphorylation of a Voltage-Gated K⁺ Channel Controls Non-associative Learning”. In: *Biophysical Journal* 100.3, Supplement 1, 99a. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.12.748.
- Coverdale, Louise E. et al. (2004). “Differential expression of the methyl-cytosine binding protein 2 gene in embryonic and adult brain of zebrafish”. In: *Developmental Brain Research* 153.2, pp. 281–287. DOI: 10.1016/j.devbrainres.2004.08.009.
- Cowan, Nelson (2001). “The magical number 4 in short-term memory: A reconsideration of mental storage capacity”. In: *Behavioral and Brain Sciences* 24.1, pp. 87–114. DOI: 10.1017/S0140525X01003922.
- Dall, Sasha R. X. et al. (2005). “Information and its use by animals in evolutionary ecology”. In: *Trends in Ecology & Evolution* 20.4, pp. 187–193. DOI: 10.1016/j.tree.2005.01.010.
- Day, Jeremy J. and J. David Sweatt (2010). “DNA methylation and memory formation”. In: *Nature Neuroscience* 13.11, pp. 1319–1323. DOI: 10.1038/nn.2666.
- Day, Jeremy J et al. (2013). “DNA methylation regulates associative reward learning”. In: *Nature neuroscience* 16.10, p. 1445. DOI: 10.1038/nn.3504.

- Derghal, Adel et al. (2016). “An Emerging Role of micro-RNA in the Effect of the Endocrine Disruptors”. In: *Frontiers in Neuroscience* 10. DOI: 10.3389/fnins.2016.00318.
- Dingemanse, Niels J. et al. (2007). “Behavioural Syndromes Differ Predictably between 12 Populations of Three-Spined Stickleback”. In: *Journal of Animal Ecology* 76.6, pp. 1128–1138.
- Diotel, Nicolas et al. (2017). “5-hydroxymethylcytosine marks postmitotic neural cells in the adult and developing vertebrate central nervous system”. In: *Journal of Comparative Neurology* 525.3, pp. 478–497. DOI: 10.1002/cne.24077.
- Doherty, Tiffany S, Amy Forster, and Tania L Roth (2016). “Global and gene-specific DNA methylation alterations in the adolescent amygdala and hippocampus in an animal model of caregiver maltreatment”. In: *Behavioural brain research* 298, pp. 55–61. DOI: 10.1016/j.bbr.2015.05.028.
- Dou, Yaqi et al. (2018). “Memory Function in Feeding Habit Transformation of Mandarin Fish (*Siniperca chuatsi*)”. In: *International Journal of Molecular Sciences* 19.4, p. 1254. DOI: 10.3390/ijms19041254.
- Duboscq, Julie et al. (2016). “Social Information Transmission in Animals: Lessons from Studies of Diffusion”. In: *Frontiers in Psychology* 7. DOI: 10.3389/fpsyg.2016.01147.
- Dugatkin, L. A. and M. S. Alfieri (2003). “Boldness, behavioral inhibition and learning”. In: *Ethology Ecology & Evolution* 15.1, pp. 43–49. DOI: 10.1080/08927014.2003.9522689.
- Duijn, Marc van (2017). “Phylogenetic origins of biological cognition: convergent patterns in the early evolution of learning”. In: *Interface Focus* 7.3. DOI: 10.1098/rsfs.2016.0158.
- Dusek, Jeffery A. and Howard Eichenbaum (1997). “The hippocampus and memory for orderly stimulusrelations”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.13, pp. 7109–7114.
- Ebbesson, L. O. E. and V. A. Braithwaite (2012). “Environmental effects on fish neural plasticity and cognition”. In: *Journal of Fish Biology* 81.7, pp. 2151–2174. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03486.x.
- Eccleston, Alex et al. (2007). “Epigenetics”. In: *Nature* 447.7143, p. 395. DOI: 10.1038/447395a.
- Edenbrow, M. and D. P. Croft (2013). “Environmental and genetic effects shape the development of personality traits in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus*”. In: *Oikos* 122.5, pp. 667–681. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2012.20556.x.
- (2011). “Behavioural types and life history strategies during ontogeny in the mangrove killifish, *Kryptolebias marmoratus*”. In: *Animal Behaviour* 82.4, pp. 731–741. DOI: 10.1016/j.anbehav.2011.07.003.
- (2012). “Sequential hermaphroditism and personality in a clonal vertebrate: The mangrove killifish”. In: *Behavioural Processes* 90.2, pp. 229–237. DOI: 10.1016/j.beproc.2012.02.001.
- Eichenbaum, H. et al. (1994). “Two functional components of the hippocampal memory system”. In: *Behavioral and brain sciences* 17.3, pp. 449–518.
- Endler, John A. (1986). *Natural Selection in the Wild*. Princeton University Press. ISBN: 978-0-691-08387-2.
- Fagherazzi, Elen V. et al. (2012). “Memory-rescuing effects of cannabidiol in an animal model of cognitive impairment relevant to neurodegenerative disorders”. In: *Psychopharmacology* 219.4, pp. 1133–1140. DOI: 10.1007/s00213-011-2449-3.
- Fan, S.-J., A.-B. Sun, and L. Liu (2018). “Epigenetic modulation during hippocampal development (Review)”. In: *Biomedical Reports* 9.6, pp. 463–473. DOI: 10.3892/br.2018.1160.
- Frankland, Paul W. et al. (2004). “The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory”. In: *Science* 304.5672, pp. 881–883. DOI: 10.1126/science.1094804.
- Fraser, Dylan J. et al. (2019). “Population correlates of rapid captive-induced maladaptation in a wild fish”. In: *Evolutionary Applications* 12.7, pp. 1305–1317. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.12649>.

- Frey, Uwe and Richard G. M. Morris (1998). “Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation”. In: *Trends in Neurosciences* 21.5, pp. 181–188. DOI: 10.1016/S0166-2236(97)01189-2.
- Frith, Uta and Francesca Happé (2005). “Autism spectrum disorder”. In: *Current biology* 15.19, R786–R790.
- Ge, Liang et al. (2014). “TET2 Plays an Essential Role in Erythropoiesis by Regulating Lineage-Specific Genes via DNA Oxidative Demethylation in a Zebrafish Model”. In: *Molecular and Cellular Biology* 34.6, pp. 989–1002. DOI: 10.1128/MCB.01061-13.
- Gene Promoter Miner (n.d.). <http://gpmminer.mbc.nctu.edu.tw/>. Accès le: 17 août 2020.
- Genzel, Lisa and John T. Wixted (2017). “Cellular and Systems Consolidation of Declarative Memory”. In: *Cognitive Neuroscience of Memory Consolidation*. Ed. by Nikolai Axmacher and Björn Rasch. Studies in Neuroscience, Psychology and Behavioral Economics. Cham: Springer International Publishing, pp. 3–16. ISBN: 978-3-319-45066-7. DOI: 10.1007/978-3-319-45066-7_1.
- Ghazizadeh, Ali, Simon Hong, and Okihide Hikosaka (2018). “Prefrontal Cortex Represents Long-Term Memory of Object Values for Months”. In: *Current Biology* 28.14, pp. 2206–2217. DOI: 10.1016/j.cub.2018.05.017.
- Girvan, J. R. and V. A. Braithwaite (1998). “Population differences in spatial learning in three-spined sticklebacks”. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265.1399, pp. 913–918. DOI: 10.1098/rspb.1998.0378.
- Goll, Mary G. and Marnie E. Halpern (2011). “Chapter 5 - DNA Methylation in Zebrafish”. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Ed. by Xiaodong Cheng and Robert M. Blumenthal. Vol. 101. Modifications of Nuclear DNA and its Regulatory Proteins. Academic Press, pp. 193–218. DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00005-6.
- Goll, Mary Grace et al. (2006). “Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2”. In: *Science* 311.5759, pp. 395–398. DOI: 10.1126/science.1120976.
- Gontier, G. et al. (2018). “Tet2 Rescues Age-Related Regenerative Decline and Enhances Cognitive Function in the Adult Mouse Brain”. In: *Cell Reports* 22.8, pp. 1974–1981. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.001.
- Gonzales, Michael L and Janine M LaSalle (2010). “The role of MeCP2 in brain development and neurodevelopmental disorders”. In: *Current psychiatry reports* 12.2, pp. 127–134. DOI: 10.1007/s11920-010-0097-7.
- Griñán-Ferré, C. et al. (2019). “Pharmacological inhibition of G9a/GLP restores cognition and reduces oxidative stress, neuroinflammation and β -Amyloid plaques in an early-onset Alzheimer’s disease mouse model”. In: *Aging* 11.23, pp. 11591–11608. DOI: 10.18632/aging.102558.
- Guan, Ji-Song et al. (2009). “HDAC2 Negatively Regulates Memory Formation and Synaptic Plasticity”. In: *Nature* 459.7243, pp. 55–60. DOI: 10.1038/nature07925.
- Guenther, Anja and Vera Brust (2017). “Individual consistency in multiple cognitive performance: behavioural versus cognitive syndromes”. In: *Animal Behaviour* 130, pp. 119–131. DOI: 10.1016/j.anbehav.2017.06.011.
- Guy, Jacky et al. (2011). “The Role of MeCP2 in the Brain”. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27.1, pp. 631–652. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154121.
- Haberman, Rebecca, Caitlin Quigley, and Michela Gallagher (2012). “Characterization of CpG island DNA methylation of impairment-related genes in a rat model of cognitive aging”. In: *Epigenetics* 7.9, pp. 1008–1019. DOI: 10.4161/epi.21291.
- Hampstead, Benjamin M. et al. (2011). “Activation and Effective Connectivity Changes Following Explicit-Memory Training for Face-Name Pairs in Patients With Mild Cognitive Impairment: A Pilot Study”. In: *Neurorehabilitation and Neural Repair* 25.3, pp. 210–222. DOI: 10.1177/1545968310382424.
- Harrington, Robert W. (1961). “Oviparous Hermaphroditic Fish with Internal Self-Fertilization”. In: *Science* 134.3492, pp. 1749–1750. DOI: 10.1126/science.134.3492.1749.

- Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. Psychology Press. ISBN: 978-1-135-63191-8.
- Herry, Cyril et al. (2010). “Neuronal circuits of fear extinction”. In: *European Journal of Neuroscience* 31.4, pp. 599–612. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07101.x.
- Hubená, Pavla, Pavel Horký, and Ondřej Slavík (2020). “Test-dependent expression of behavioral syndromes: A study of aggressiveness, activity, and stress of chub”. In: *Aggressive Behavior* 46.5, pp. 412–424. DOI: <https://doi.org/10.1002/ab.21909>.
- Ibsch, Michael, Ralf H Anken, and Hinrich Rahmann (2000). “Weightlessness during spaceflight results in enhanced synapse formation in a fish brain vestibular nucleus”. In: *Neuroscience Letters* 296.1, pp. 13–16. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01594-9.
- Ikenaga, Takanori, Masayuki Yoshida, and Kazumasa Uematsu (2006). “Cerebellar efferent neurons in teleost fish”. In: *The Cerebellum* 5.4, pp. 268–274. DOI: 10.1080/14734220600930588.
- Iurlaro, Mario et al. (2013). “A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation”. In: *Genome Biology* 14.10, R119. DOI: 10.1186/gb-2013-14-10-r119.
- Jenuwein, Thomas and C. David Allis (2001). “Translating the Histone Code”. In: *Science* 293.5532, pp. 1074–1080. DOI: 10.1126/science.1063127.
- Johansen, Joshua P. et al. (2011). “Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory”. In: *Cell* 147.3, pp. 509–524. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.009.
- Jolles, Jolle W. et al. (2019). “Personality, plasticity and predictability in sticklebacks: bold fish are less plastic and more predictable than shy fish”. In: *Animal Behaviour* 154, pp. 193–202. DOI: 10.1016/j.anbehav.2019.06.022.
- Kaas, Garrett A. et al. (2013). “TET1 Controls CNS 5-Methylcytosine Hydroxylation, Active DNA Demethylation, Gene Transcription, and Memory Formation”. In: *Neuron* 79.6, pp. 1086–1093. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.08.032.
- Kanda, L. Leann, Laura Louon, and Katherine Straley (2012). “Stability in Activity and Boldness Across Time and Context in Captive Siberian Dwarf Hamsters”. In: *Ethology* 118.6, pp. 518–533. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02038.x>.
- Kandel, Eric R., Yadin Dudai, and Mark R. Mayford (2014). “The Molecular and Systems Biology of Memory”. In: *Cell* 157.1, pp. 163–186. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.001.
- Kantak, Shailesh S., Chaithanya K. Mummidisetty, and James W. Stinear (2012). “Primary motor and premotor cortex in implicit sequence learning – evidence for competition between implicit and explicit human motor memory systems”. In: *European Journal of Neuroscience* 36.5, pp. 2710–2715. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08175.x.
- Kim, Gyutae, Kyu-Sung Kim, and Sangmin Lee (2018). “Non-associative learning processes in vestibular nucleus”. In: *Medical & Biological Engineering & Computing* 56, pp. 1841–1851. DOI: 10.1007/s11517-018-1817-0.
- King, Gwendalyn D, Douglas L Rosene, and Carmela R Abraham (2012). “Promoter methylation and age-related downregulation of Klotho in rhesus monkey”. In: *Age* 34.6, pp. 1405–1419. DOI: 10.1007/s11357-011-9315-4.
- Kiroski, Ivana et al. (2020). “Reelin Improves Cognition and Extends the Lifespan of Mutant Ndel1 Mice with Postnatal CA1 Hippocampus Deterioration”. In: *Cerebral Cortex*, bhaa088. DOI: 10.1093/cercor/bhaa088.
- Knecht, Andrea L. et al. (2017). “Transgenerational inheritance of neurobehavioral and physiological deficits from developmental exposure to benzo[a]pyrene in zebrafish”. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 329, pp. 148–157. DOI: 10.1016/j.taap.2017.05.033.
- Kriaucionis, Skirmantas and Nathaniel Heintz (2009). “The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain”. In: *Science* 324.5929, pp. 929–930. DOI: 10.1126/science.1169786.

- Kroeze, Leonie I., Bert A. van der Reijden, and Joop H. Jansen (2015). “5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer”. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1855.2, pp. 144–154. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.01.001.
- Lau, H. L. et al. (2012). “Genetic dissection of memory for associative and non-associative learning in *Caenorhabditis elegans*”. In: *Genes, Brain and Behavior* 12.2, pp. 210–223. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00863.x.
- Laurent, Nicolas (2019). *Analyse des profils d’expression protéique liés aux traits comportementaux d’audace et d’agressivité chez le rivulus des mangroves *Kryptolebias marmoratus* et expression des gènes d’intérêt*. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive.
- Lazareth, C. E et al. (2003). “High-resolution trace element profiles in shells of the mangrove bivalve *Isognomon ehippium*: a record of environmental spatio-temporal variations?” In: *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57.5-6, pp. 1103–1114. DOI: 10.1016/S0272-7714(03)00013-1.
- Lenormand, Thomas, Denis Roze, and François Rousset (2009). “Stochasticity in evolution”. In: *Trends in Ecology & Evolution* 24.3, pp. 157–165. DOI: 10.1016/j.tree.2008.09.014.
- Lester, Barry M. et al. (2011). “Behavioral epigenetics”. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1226.1, pp. 14–33. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06037.x.
- Levenson, Jonathan M., Kenneth J. O’Riordan, et al. (2004). “Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus”. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.39, pp. 40545–40559. DOI: 10.1074/jbc.M402229200.
- Levenson, Jonathan M. and J. David Sweatt (2005). “Epigenetic mechanisms in memory formation”. In: *Nature Reviews Neuroscience* 6.2, pp. 108–118. DOI: 10.1038/nrn1604.
- Lewis-Peacock, Jarrod A. and Bradley R. Postle (2008). “Temporary Activation of Long-Term Memory Supports Working Memory”. In: *The Journal of Neuroscience* 28.35, pp. 8765–8771. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1953-08.2008.
- Lio, Chan-Wang J. et al. (2020). “TET methylcytosine oxidases: new insights from a decade of research”. In: *Journal of Biosciences* 45.1, p. 21. DOI: 10.1007/s12038-019-9973-4.
- Liu, Yan et al. (2016). “Global DNA methylation in gonads of adult zebrafish *Danio rerio* under bisphenol A exposure”. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 130, pp. 124–132. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.04.012.
- Lord, Catherine et al. (2020). “Autism spectrum disorder”. In: *Nature Reviews Disease Primers* 6.5, pp. 1–23. DOI: 10.1038/s41572-019-0138-4.
- Louison, Michael J. et al. (2019). “Quick learning, quick capture: largemouth bass that rapidly learn an association task are more likely to be captured by recreational anglers”. In: *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73.2, p. 23. DOI: 10.1007/s00265-019-2634-7.
- Lyon, Pamela (2015). “The cognitive cell: bacterial behavior reconsidered”. In: *Frontiers in Microbiology* 6, p. 264. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00264.
- Manseau, Marc W. and Michael T. Compton (2018). “Chapter 1 - An Introduction to the Complex Connection Between Cannabis and Schizophrenia”. In: *The Complex Connection Between Cannabis and Schizophrenia*. Ed. by Michael T. Compton and Marc W. Manseau. San Diego: Academic Press, pp. 1–7. ISBN: 978-0-12-804791-0. DOI: 10.1016/B978-0-12-804791-0.00001-X.
- Markey, Angèle (2019). *Etude de l’effet retardé de l’exposition à la neurotoxine β -N-méthylamino-L-alanine (BMAA) durant le développement précoce du *Kryptolebias marmoratus* sur les traits comportementaux d’audace et d’agressivité chez l’adulte*. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive.
- Mayer, Ian et al. (2011). “Domestication causes rapid changes in heart and brain morphology in Atlantic cod (*Gadus morhua*)”. In: *Environmental Biology of Fishes* 92.2, pp. 181–186. DOI: 10.1007/s10641-011-9831-1.

- Mazzamuto, Maria Vittoria et al. (2019). “Rodents in the arena: a critical evaluation of methods measuring personality traits”. In: *Ethology Ecology & Evolution* 31.1, pp. 38–58. DOI: 10.1080/03949370.2018.1488768.
- McAroe, Claire L., Cathy M. Craig, and Richard A. Holland (2016). “Place versus response learning in fish: a comparison between species”. In: *Animal Cognition* 19.1, pp. 153–161. DOI: 10.1007/s10071-015-0922-9.
- McCain, Shelly C. et al. (2020). “Choice consequences: Salinity preferences and hatchling survival in the mangrove rivulus fish (*Kryptolebias marmoratus*)”. In: *Journal of Experimental Biology* 223.5. DOI: 10.1242/jeb.219196.
- McClelland, Shawn et al. (2011). “Emerging roles of epigenetic mechanisms in the enduring effects of early-life stress and experience on learning and memory”. In: *Neurobiology of Learning and Memory*. Epigenetics and memory 96.1, pp. 79–88. DOI: 10.1016/j.nlm.2011.02.008.
- Mellén, Marian et al. (2012). “MeCP2 Binds to 5hmC Enriched within Active Genes and Accessible Chromatin in the Nervous System”. In: *Cell* 151.7, pp. 1417–1430. DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.022.
- Mercer, Tim R. et al. (2008). “Noncoding RNAs in Long-Term Memory Formation”. In: *The Neuroscientist* 14.5, pp. 434–445. DOI: 10.1177/1073858408319187.
- Meshalkina, Darya A. et al. (2017). “Understanding zebrafish cognition”. In: *Behavioural Processes*. The Cognition of Fish 141, pp. 229–241. DOI: 10.1016/j.beproc.2016.11.020.
- MethPrimer* (n.d.). <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>. Accès le: 17 août 2020.
- Miller, Courtney A., Susan L. Campbell, and J. David Sweatt (2008). “DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity”. In: *Neurobiology of Learning and Memory* 89.4, pp. 599–603. DOI: 10.1016/j.nlm.2007.07.016.
- Miller, Courtney A., Cristin F. Gavin, et al. (2010). “Cortical DNA methylation maintains remote memory”. In: *Nature Neuroscience* 13.6, pp. 664–666. DOI: 10.1038/nn.2560.
- Miller, Courtney A. and J. David Sweatt (2007). “Covalent Modification of DNA Regulates Memory Formation”. In: *Neuron* 53.6, pp. 857–869. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.022.
- Molfese, David L. (2011). “Advancing Neuroscience Through Epigenetics: Molecular Mechanisms of Learning and Memory”. In: *Developmental Neuropsychology* 36.7, pp. 810–827. DOI: 10.1080/87565641.2011.606395.
- Monti, Noemi et al. (2020). “CpG and non-CpG Presenilin1 methylation pattern in course of neurodevelopment and neurodegeneration is associated with gene expression in human and murine brain”. In: *Epigenetics*, pp. 1–19. DOI: 10.1080/15592294.2020.1722917.
- Murphy, William J., Jamie E. Thomerson, and Glen E. Collier (1999). “Phylogeny of the Neotropical Killifish Family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences”. In: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13.2, pp. 289–301. DOI: 10.1006/mpev.1999.0656.
- Nadel, L. et al. (2012). “Memory formation, consolidation and transformation”. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 36.7, pp. 1640–1645. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2012.03.001.
- Nadel, Lynn and Oliver Hardt (2011). “Update on Memory Systems and Processes”. In: *Neuropsychopharmacology* 36.1, pp. 251–273. DOI: 10.1038/npp.2010.169.
- Naderi, Mohammad et al. (2020). “Chronic exposure to environmentally relevant concentrations of bisphenol S differentially affects cognitive behaviors in adult female zebrafish”. In: *Environmental Pollution* 261. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114060.
- Nagarajan, Raman et al. (2006). “Reduced MeCP2 Expression is Frequent in Autism Frontal Cortex and Correlates with Aberrant MECP2 Promoter Methylation”. In: *Epigenetics* 1.4, pp. 172–182. DOI: 10.4161/epi.1.4.3514.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (n.d.). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accès le: 17 août 2020.

- Nee, Derek Evan and John Jonides (2013). “Trisecting Representational States in Short-Term Memory”. In: *Frontiers in Human Neuroscience* 7, p. 796. DOI: 10.3389/fnhum.2013.00796.
- Norris, Dennis (2017). “Short-term memory and long-term memory are still different”. In: *Psychological Bulletin* 143.9, pp. 992–1009. DOI: <http://dx.doi.org.proxy.bib.ucl.ac.be/10.1037/bul0000108>.
- Osborne, Ashleigh L et al. (2017). “Improved Social Interaction, Recognition and Working Memory with Cannabidiol Treatment in a Prenatal Infection (poly I:C) Rat Model”. In: *Neuropsychopharmacology* 42.7, pp. 1447–1457. DOI: 10.1038/npp.2017.40.
- Öztekin, Iike, Lila Davachi, and Brian McElree (2010). “Are Representations in Working Memory Distinct From Representations in Long-Term Memory?: Neural Evidence in Support of a Single Store”. In: *Psychological Science; Thousand Oaks* 21.8, p. 1123.
- Parkel, Sven, Jose P. Lopez-Atalaya, and Angel Barco (2013). “Histone H3 lysine methylation in cognition and intellectual disability disorders”. In: *Learning & Memory* 20.10, pp. 570–579. DOI: 10.1101/lm.029363.112.
- Pavlov, P Ivan (1927). “Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex”. In: *Annals of Neurosciences* 17.3, pp. 136–141. DOI: 10.5214/ans.0972-7531.1017309.
- Peeke, Harman (2012). *Habituation, Sensitization, and Behavior*. Elsevier. ISBN: 978-0-323-14856-6.
- Peixoto, Lucia and Ted Abel (2013). “The Role of Histone Acetylation in Memory Formation and Cognitive Impairments”. In: *Neuropsychopharmacology* 38.1, pp. 62–76. DOI: 10.1038/npp.2012.86.
- Pelletier, Fanie and Dany Garant (2012). “Population consequences of individual variation in behaviour”. In: *Behavioural Responses to a Changing World*. Ed. by Ulrika Candolin and Bob B.M. Wong. United Kingdom: Oxford University Press, pp. 159–174. ISBN: 9780199602568. DOI: 10.1093/acprof:osobl/9780199602568.001.0001.
- Penner, MR et al. (2016). “Age-related changes in Egr1 transcription and DNA methylation within the hippocampus”. In: *Hippocampus* 26.8, pp. 1008–1020. DOI: 10.1002/hipo.22583.
- Pintor, Lauren M., Andrew Sih, and Marissa L. Bauer (2008). “Differences in Aggression, Activity and Boldness between Native and Introduced Populations of an Invasive Crayfish”. In: *Oikos* 117.11, pp. 1629–1636. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2008.16578.x.
- Poon, Chi-Sang and Daniel L. Young (2006). “Nonassociative learning as gated neural integrator and differentiator in stimulus-response pathways”. In: *Behavioral and Brain Functions* 2.1, p. 29. DOI: 10.1186/1744-9081-2-29.
- Portavella, Manuel, Blas Torres, and Cosme Salas (2004). “Avoidance Response in Goldfish: Emotional and Temporal Involvement of Medial and Lateral Telencephalic Pallium”. In: *The Journal of Neuroscience* 24.9, pp. 2335–2342. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4930-03.2004.
- Rai, Kunal, Stephanie Chidester, et al. (2007). “Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish”. In: *Genes & Development* 21.3, pp. 261–266. DOI: 10.1101/gad.1472907.
- Rai, Kunal, Ian J. Huggins, et al. (2008). “DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45”. In: *Cell* 135.7, pp. 1201–1212. DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.042.
- Raichle, Marcus E. and Debra A. Gusnard (2002). “Appraising the brain’s energy budget”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.16, pp. 10237–10239. DOI: 10.1073/pnas.172399499.
- Rassoulzadegan, Minoo and François Cuzin (2015). “Epigenetic heredity: RNA-mediated modes of phenotypic variation”. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1341.1, pp. 172–175. DOI: 10.1111/nyas.12694.

- Rödel, Heiko G. and Susann Meyer (2011). “Early development influences ontogeny of personality types in young laboratory rats”. In: *Developmental Psychobiology* 53.6, pp. 601–613. DOI: <https://doi.org/10.1002/dev.20522>.
- Rodríguez, F. et al. (2005). “Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum”. In: *Brain Research Bulletin*. Evolution and Development of Nervous Systems 66.4-6, pp. 365–370. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2004.11.026.
- Rodriguez, Fernando et al. (2002). “Conservation of Spatial Memory Function in the Pallial Fore-brain of Reptiles and Ray-Finned Fishes”. In: *Journal of Neuroscience* 22.7, pp. 2894–2903. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-07-02894.2002.
- Roth, Gerhard (2013). “Comparing Vertebrate Brains”. In: *The Long Evolution of Brains and Minds*. Ed. by Gerhard Roth. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 223–242. ISBN: 978-94-007-6259-6. DOI: 10.1007/978-94-007-6259-6_14.
- Rudenko, Andrii et al. (2013). “Tet1 Is Critical for Neuronal Activity-Regulated Gene Expression and Memory Extinction”. In: *Neuron* 79.6, pp. 1109–1122. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.08.003.
- Rupia, Emmanuel J. et al. (2016). “Fight-flight or freeze-hide? Personality and metabolic phenotype mediate physiological defence responses in flatfish”. In: *Journal of Animal Ecology* 85.4. Ed. by Julie Morand-Ferron, pp. 927–937. DOI: 10.1111/1365-2656.12524.
- Saban, William et al. (2017). “Endogenous orienting in the archer fish”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114.29, pp. 7577–7581. DOI: 10.1073/pnas.1700574114.
- Salgado, C. et al. (2020). “Genome-wide characterization of 5-hydroxymethylcytosine in melanoma reveals major differences with nevus”. In: *Genes Chromosomes and Cancer* 59.6, pp. 366–374. DOI: 10.1002/gcc.22837.
- Santiago, Mafalda et al. (2014). “TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function — How critical are they?” In: *Genomics*. 5-hydroxymethylation 104.5, pp. 334–340. DOI: 10.1016/j.ygeno.2014.08.018.
- Schacter, Daniel L. (1987). “Implicit Memory: History and Current Status”. In: *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 13.3, pp. 501–518. DOI: 10.1037/0278-7393.13.3.501.
- Schafe, Glenn E. (2016). “Epigenetics and Memory”. In: *Novel Mechanisms of Memory*. Ed. by Karl Peter Giese and Kasia Radwanska. Cham: Springer International Publishing, pp. 141–160. ISBN: 978-3-319-24364-1. DOI: 10.1007/978-3-319-24364-1_8.
- Scoville, William Beecher and Brenda Milner (1957). “Loss of Recent Memory After Bilateral Hippocampal Lesions”. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20.1, pp. 11–21. DOI: 10.1136/jnnp.20.1.11.
- Sessa, Alessandro et al. (2019). “SETD5 Regulates Chromatin Methylation State and Preserves Global Transcriptional Fidelity during Brain Development and Neuronal Wiring”. In: *Neuron* 104.2, 271–289.e13. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.07.013.
- Shen, Q. et al. (2018). “Tet2 promotes pathogen infection-induced myelopoiesis through mRNA oxidation”. In: *Nature* 554.7690, pp. 123–127. DOI: 10.1038/nature25434.
- Shettleworth, Sara J. (2009). *Cognition, Evolution, and Behavior*. Oxford University Press. ISBN: 978-0-19-988638-8.
- Shimoda, Nobuyoshi et al. (2005). “Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene”. In: *Developmental Dynamics* 233.4, pp. 1509–1516. DOI: 10.1002/dvdy.20455.
- Siedlecki, Pawel and Piotr Zielenkiewicz (2006). “Mammalian DNA methyltransferases.” In: *Acta Biochimica Polonica* 53.2, pp. 245–256. DOI: 10.18388/abp.2006_3337.
- Sih, Andrew, Alison M Bell, et al. (2004). “Behavioral Syndromes: An Integrative Overview”. In: *The Quarterly Review of Biology* 79.3, pp. 241–277. DOI: 10.1086/422893.

- Sih, Andrew and Marco Del Giudice (2012). "Linking behavioural syndromes and cognition: a behavioural ecology perspective". In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367.1603, pp. 2762–2772. DOI: 10.1098/rstb.2012.0216.
- Sison, Margarette and Robert Gerlai (2010). "Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze". In: *Behavioural Brain Research* 207.1, pp. 99–104. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.09.043.
- Sommer-Trembo, Carolin and Martin Plath (2018). "Consistent individual differences in associative learning speed are not linked to boldness in female Atlantic mollies". In: *Animal Cognition* 21.5, pp. 661–670. DOI: 10.1007/s10071-018-1201-3.
- Spruijt, Cornelia G. et al. (2013). "Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives". In: *Cell* 152.5, pp. 1146–1159. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.004.
- Squire, Larry R., Craig E.L. Stark, and Robert E. Clark (2004). "The medial temporal lobe". In: *Annual Review of Neuroscience* 27, pp. 279–306. DOI: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130.
- Stafford, James M. and K. Matthew Lattal (2011). "Is an epigenetic switch the key to persistent extinction?" In: *Neurobiology of Learning and Memory*. Epigenetics and memory 96.1, pp. 35–40. DOI: 10.1016/j.nlm.2011.04.012.
- Stamps, Judy and Ton G.G. Groothuis (2010). "The development of animal personality". In: *Biological Reviews* 85.2, pp. 301–325. DOI: 10.1111/j.1469-185x.2009.00103.x.
- Stilling, Roman Manuel and André Fischer (2011). "The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease". In: *Neurobiology of Learning and Memory*. Epigenetics and memory 96.1, pp. 19–26. DOI: 10.1016/j.nlm.2011.04.002.
- Suomi, Stephen J, Melinda A Novak, and Arnold Well (1996). "Aging in Rhesus Monkeys: Different Windows on Behavioral Continuity and Change". In: *Developmental Psychology* 32.6, pp. 1116–1128. DOI: 10.1037/0012-1649.32.6.1116.
- Swanson, H. Lee, Xinhua Zheng, and Olga Jerman (2009). "Working Memory, Short-Term Memory, and Reading Disabilities: A Selective Meta-Analysis of the Literature". In: *Journal of Learning Disabilities* 42.3, pp. 260–287. DOI: <http://dx.doi.org.proxy.bib.ucl.ac.be/10.1177/0022219409331958>.
- Tahiliani, Mamta et al. (2009). "Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1". In: *Science* 324.5929, pp. 930–935. DOI: 10.1126/science.1170116.
- Takaki, Nozomu et al. (2020). "Effect of postnatal photoperiod on DNA methylation dynamics in the mouse brain". In: *Brain Research* 1733, p. 146725. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.146725.
- Tatarenkov, Andrey et al. (2015). "Genetic Subdivision and Variation in Selfing Rates Among Central American Populations of the Mangrove Rivulus, *Kryptolebias marmoratus*". In: *Journal of Heredity* 106.3, pp. 276–284. DOI: 10.1093/jhered/esv013.
- Taylor, D. Scott (2000). "Biology and ecology of rivulus marmoratus: new insights and a review". In: *Florida Scientist* 63.4, pp. 242–255.
- Thompson, R. F. and J. E. Steinmetz (2009). "The role of the cerebellum in classical conditioning of discrete behavioral responses". In: *Neuroscience*. New Insights in Cerebellar Function 162.3, pp. 732–755. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.041.
- Thomson, John P. et al. (2010). "CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1". In: *Nature* 464.7291, pp. 1082–1086. DOI: 10.1038/nature08924.
- Torres, B. et al. (2005). "Visual orienting response in goldfish: a multidisciplinary study". In: *Brain Research Bulletin*. Evolution and Development of Nervous Systems 66.4-6, pp. 376–380. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2005.02.002.
- Trompf, Larissa and Culum Brown (2014). "Personality affects learning and trade-offs between private and social information in guppies, *Poecilia reticulata*". In: *Animal Behaviour* 88, pp. 99–106. DOI: 10.1016/j.anbehav.2013.11.022.

- Turner, B. J., W. P. Davis, and D. S. Taylor (1992). “Abundant males in populations of a selfing hermaphrodite fish, *Rivulus marmoratus*, from some Belize cays”. In: *Journal of Fish Biology* 40.2, pp. 307–310. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb02576.x.
- Uribe-Lewis, S. et al. (2020). “5-hydroxymethylcytosine and gene activity in mouse intestinal differentiation”. In: *Scientific Reports* 10.1, p. 546. DOI: 10.1038/s41598-019-57214-z.
- Vaynman, Shoshanna, Zhe Ying, and Fernando Gomez-Pinilla (2004). “Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition”. In: *European Journal of Neuroscience* 20.10, pp. 2580–2590. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x.
- Venegas, D. et al. (2016). “Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*”. In: *General and Comparative Endocrinology* 236, pp. 35–41. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.06.026.
- Voisin, Anne-Sophie (2018). “Delayed effects of early-life exposure to 17 α -ethinylestradiol on the DNA methylation landscape, proteome and physiology of the self-fertilizing mangrove *rivulus* *Kryptolebias marmoratus*”. PhD thesis. UNamur, Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive, Laboratory of Evolutionary and Adaptative Physiology.
- Wang, Jin-Hui (2019). *Associative Memory Cells: Basic Units of Memory Trace*. Singapore: Springer. ISBN: 9789811395017.
- Wang, L. et al. (2016). “DNA methylation regulates *gabrb2* mRNA expression: developmental variations and disruptions in l-methionine-induced zebrafish with schizophrenia-like symptoms”. In: *Genes, Brain, and Behavior* 15.8, pp. 702–710. DOI: 10.1111/gbb.12315.
- Warden, Melissa R. and Earl K. Miller (2010). “Task-Dependent Changes in Short-Term Memory in the Prefrontal Cortex”. In: *The Journal of Neuroscience* 30.47, pp. 15801–15810. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1569-10.2010.
- Weber, Michael et al. (2007). “Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome”. In: *Nature Genetics* 39.4, pp. 457–466. DOI: 10.1038/ng1990.
- Wibbrand, Karin et al. (2010). “Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo”. In: *European Journal of Neuroscience* 31.4, pp. 636–645. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07112.x.
- Wilson, Alexander D.M. and Jean-Guy J. Godin (2009). “Boldness and behavioral syndromes in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*”. In: *Behavioral Ecology* 20.2, pp. 231–237. DOI: 10.1093/beheco/arp018.
- Wolf, Max and Franz J. Weissing (2012). “Animal personalities: consequences for ecology and evolution”. In: *Trends in Ecology & Evolution* 27.8, pp. 452–461. DOI: 10.1016/j.tree.2012.05.001.
- Woodruff-Pak, Diana S. and John F. Disterhoft (2008). “Where is the trace in trace conditioning?” In: *Trends in Neurosciences* 31.2, pp. 105–112. DOI: 10.1016/j.tins.2007.11.006.
- Wullimann, Mario F. and Thomas Mueller (2004). “Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior”. In: *Journal of Comparative Neurology* 475.2, pp. 143–162. DOI: 10.1002/cne.20183.
- Yasui, Dag H. et al. (2007). “Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.49, pp. 19416–19421. DOI: 10.1073/pnas.0707442104.
- Young, Suzanne R. L. et al. (2006). “Antisense Targeting of CXXC Finger Protein 1 Inhibits Genomic Cytosine Methylation and Primitive Hematopoiesis in Zebrafish”. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.48, pp. 37034–37044. DOI: 10.1074/jbc.M604546200.
- Zentall, T. R., P. Craddock, and M. Molet (2008). “Apprentissage de concepts perceptuels, associationnels et relationnels chez le pigeon”. In: *Psychologie Française. La mémoire de travail : approche théorique et développement* 53.3, pp. 411–436. DOI: 10.1016/j.psfr.2008.02.003.

Zhang, Run-Rui et al. (2013). “Tet1 Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognition”.
In: *Cell Stem Cell* 13.2, pp. 237–245. DOI: 10.1016/j.stem.2013.05.006.

Annexes

Annexe 1

Cette annexe reprend des compléments d'information concernant des types d'apprentissage et de mémoire qui n'ont pas été détaillés dans l'introduction, car pas directement liés aux expériences réalisées.

Conditionnement classique

Dans le cadre du conditionnement classique, ce stimulus inconditionnel est lié à un stimulus conditionnel (qui n'induit pas automatiquement une réponse (J.-H. Wang 2019)). Ce stimulus conditionnel peut être une lumière, une forme, une couleur, etc. Un exemple de conditionnement classique est l'expérience de Pavlov sur les chiens (Pavlov 1927). En effet, il a associé le son de la cloche (stimulus conditionnel) à l'apport de nourriture (stimulus inconditionnel), ce qui a déclenché la réponse réflexe de salivation chez les animaux à la seule entente du son de cloche. Le conditionnement classique peut être subdivisé en deux parties. D'une part, on retrouve le conditionnement retardé (delay conditioning), s'il y a un recouvrement dans le temps de l'exposition aux stimuli conditionnel et inconditionnel (Woodruff-Pak and Disterhoft 2008). À l'inverse, on parle de conditionnement trace (trace conditioning), s'il n'y a pas de recouvrement dans le temps des deux stimuli (Woodruff-Pak and Disterhoft 2008). Il est alors nécessaire que l'individu garde une "trace" du stimulus conditionnel pendant l'exposition au stimulus inconditionnel pour pouvoir associer les deux.

Processus d'apprentissage Le siège du conditionnement classique est le cervelet et les structures qui y sont associées (Brown, Krause, and Laland 2011). Cette structure est commune aux vertébrés terrestres et aux poissons. Bien qu'il manque à ces derniers les noyaux cérébelleux, leur rôle est remplacé par la couche ganglionnaire (Ikenaga, Yoshida, and Uematsu 2006). Chez les mammifères, cette seule zone est nécessaire et suffisante au conditionnement classique. Les détails du mécanisme ne seront pas développés, car relativement complexes (pour plus de détails, voir Christian and Richard F. Thompson 2003; R. F. Thompson and Steinmetz 2009), mais la base cellulaire de ce mécanisme chez les mammifères serait due à la convergence des voies liées au traitement du stimulus inconditionnel et du stimulus conditionnel (Christian and Richard F. Thompson 2003). Une stimulation conjointe des 2 voies pourrait en effet les associer, ce qui permettrait à la seule présence du stimulus conditionnel de déclencher la réponse au stimulus inconditionnel (R. F. Thompson and Steinmetz 2009). Il est probable que ces mécanismes neuronaux du conditionnement classique soient similaires chez les téléostéens (Brown, Krause, and Laland 2011). Mais il est nécessaire de distinguer conditionnement classique retardé et trace. En effet, dans ce dernier, le décalage temporel entre les stimuli conditionnels et inconditionnels nécessite une nouvelle structure, qui permettrait une forme de mémoire de la "trace" laissée par le stimulus conditionnel. Il s'agit ici d'une structure du télencéphale, l'hippocampe des mammifères (Woodruff-Pak and Disterhoft 2008), dont l'homologue chez les poissons est le pallium latéral (Brown, Krause, and Laland 2011).

Généralisation et discrimination

Par exemple, l'article "Apprentissage de concepts perceptuels, associationnels et relationnels chez le pigeon" de Zentall, Craddock, and Molet 2008 ajoute des termes pour distinguer de nouveaux types d'apprentissages. Ils parlent d'apprentissage de concepts perceptuels, qu'ils définissent comme le fait de ranger des stimuli dans des catégories sur base d'une ou plusieurs propriétés communes. Il y a également les concepts associationnels, qui sont la création arbitraire de catégories de stimuli sur base du fait qu'ils sont associés à un même événement ou stimulus inconditionnel. Un dernier type dont ils parlent est l'apprentissage de concepts relationnels qui impliquent la présence d'une

relation déjà existante entre les objets. Ces trois nouveaux types d'apprentissages nécessitant des associations, ils font partie de la classe "apprentissage associatifs", mais ne rentrent pas directement dans les classes conditionnements classique et opérant. Il ne s'agit pas ici de lier un stimulus inconditionnel à un stimulus conditionnel ou une action, mais de rassembler des stimuli en classes en fonction de leurs propriétés, ou des liens entre eux ou avec d'autres stimuli. Ils appartiennent donc à une nouvelle catégorie de classes, la généralisation, et son opposé, la discrimination. Il s'agit ici de voir si un nouveau stimulus conditionnel va être associé à un stimulus conditionnel déjà existant, et donc que la réponse fournie par l'organisme sera la même pour les deux stimuli (généralisation), ou non (discrimination) (Barak, Rigotti, and Fusi 2013). Ce concept est important, car il faut que deux stimuli qui signifient la même chose, même légèrement différents à cause de la variation "bruit", produisent la même réponse, alors que si la différence augmente, la probabilité qu'ils soient liés au même stimulus inconditionnel diminue, et donc il ne faut plus déclencher une réponse (Barak, Rigotti, and Fusi 2013). Il est intéressant de constater que ce principe de généralisation peut être adapté à plusieurs types d'apprentissage. Il serait possible d'associer le nouveau stimulus à un stimulus conditionnel du conditionnement classique, mais on peut aussi imaginer qu'un animal pourrait associer deux comportements du conditionnement opérant, voire même deux stimulus dont l'un fait l'objet d'habituation lors d'un apprentissage non-associatif.

Processus d'apprentissage Cet apprentissage utilise un mécanisme similaire à l'habituation et la sensibilisation. En effet, lors de la généralisation/discrimination, un continuum dans la variation du stimulus doit produire une réaction binaire (même réponse que le stimulus connu ou pas). Il faut donc placer un seuil subjectif de variation, comme il faut placer un seuil de nocivité pour passer de l'habituation à la sensibilisation. Il est donc cohérent que l'on retrouve un mécanisme semblable chez les deux types d'apprentissage. Ici aussi, une série de voies comprenant les informations de plusieurs sources sensorielles provenant de partout dans le cerveau, traduisent le contexte et la variation du stimulus par rapport au stimulus "appris". Toutes ces voies sont alors intégrées par un neurone qui déclenchera ou non la réponse (Barak, Rigotti, and Fusi 2013).

Autres types de mémoire

J.-H. Wang 2019 ajoute de nombreux autres types de mémoire, et les organise légèrement différemment. En partant de la mémoire associative, il crée plusieurs classements différents contenant chacun 2 catégories. Il oppose par exemple mémoire implicite et explicite, mais divise également cette dernière en mémoire sémantique (liée au savoir et à la compréhension) et mémoire épisodique (liée aux émotions et aux expériences). Il sépare aussi mémoire de travail, qu'il définit comme la mémoire à court terme, qui joue un rôle dans la sélection et le traitement des informations, et mémoire perceptive, qui est, elle, la mémoire à long terme des expériences vécues par une personne d'un point de vue sensoriel, et qu'il sépare à nouveau en plusieurs catégories. Il distingue également la mémoire spatiale, qui stocke l'information en lien avec la localisation et l'orientation des objets, de la mémoire temporelle, qui gère les informations liées à l'ordre et la localisation dans le temps, ainsi que la mémoire à signaux exogènes et endogènes, respectivement la mémoire liée aux sens et aux expériences, et la mémoire liée à des processus de réflexion et émotions. On retrouve aussi la mémoire eidétique, aussi appelée mémoire photographique, qui est la capacité de se souvenir d'un lieu, d'un objet, d'un son avec une extrême précision, et la fausse mémoire, correspondant à des souvenirs transformés, voire de moments qui n'ont jamais existés. Enfin on retrouve la mémoire de signaux unitaires, qui sont simplement les signaux acquis, à différencier de la mémoire de signaux complexes réorganisés depuis des signaux unitaires, quand ces signaux sont réorganisés afin de créer des liens entre eux. Cependant, la plupart de ces types de mémoires sont valables surtout chez les êtres humains, et plus difficilement testables chez les animaux. C'est pourquoi ces points ne seront pas plus développés.

Annexe 2

Cette annexe reprend les étapes précises de l'extraction d'ADN. Le protocole et les produits proviennent du kit NucleoSpin[®] Tissue XS de l'entreprise Macherey-Nagel.

1. Placer l'échantillon de cerveau dans un eppendorf de 1,5mL
2. Ajouter 80 μ L de buffer T1 et 8 μ L de protéinase K
3. Vortexer 2 fois 5 secondes, puis centrifuger à l'aide d'un spin pendant 7 secondes
4. Incuber pendant 4h dans un thermomixer à 56°C avec 350 rpm. Au milieu de l'incubation, dissoudre les organes à l'aide d'ups and downs
5. Ajouter 80 μ L de buffer B3
6. Vortexer 2 fois 5 secondes, puis centrifuger à l'aide d'un spin pendant 7 secondes
7. Incuber pendant 5 minutes dans un thermomixer à 70°C avec 350 rpm.
8. Vortexer à la fin de l'incubation
9. Ajouter 80 μ L d'éthanol absolu
10. Vortexer 2 fois 5 secondes, puis centrifuger à l'aide d'un spin pendant 7 secondes
11. Déposer l'échantillon dans une colonne NucleoSpin[®] Tissue XS placée dans un tube collecteur.
12. Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g
13. Ajouter 50 μ L de buffer B5 (changer de tube collecteur)
14. Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g
15. Ajouter 50 μ L de buffer B5
16. Centrifuger pendant 2 minutes à 11 000 x g
17. Placer la colonne sur un eppendorf 1,5mL
18. Ajouter 20 μ L de buffer BE
19. Centrifuger pendant 1 minute à 11 000 x g
20. Stocker l'échantillon au congélateur à -80°C

Annexe 3

Cette annexe reprend les différents gènes qui ont été étudiés d'un point de vue épigénétique. On retrouve sur la figure 28 la structure de *BDNF*, *EGR-1*, *GRIN1B* et *MECP2* ainsi que la localisation par rapport à ces gènes de la ou des séquence(s) utilisée(s) lors de l'analyse. Ces séquences sont détaillées dans le tableau 3 avec les primers correspondants qui ont été utilisés ainsi que leurs caractéristiques.

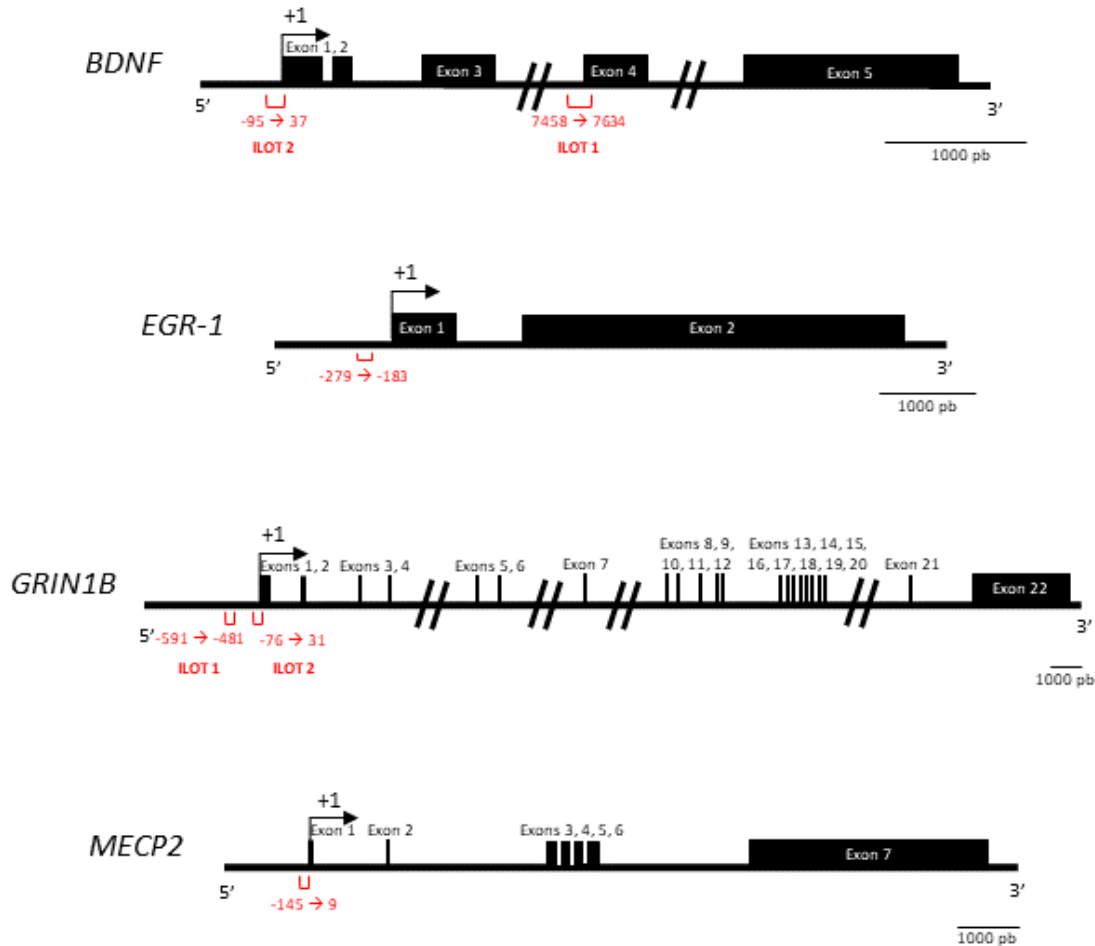


Figure 28: Structure des 4 gènes étudiés comprenant la taille et la localisation des exons à l'échelle (l'échelle est différente pour chaque gène). Le symbole // signifie que l'intron représenté a été raccourci par souci de place. Sur chaque gène, la ou les séquence(s) étudiée(s) a (ont) été représentée(s) en rouge. Les nombres rouges représentent le début et la fin de la séquence en nombres de paires de bases avant ou après la première paire de bases de l'exon 1.

Gène	Primer	Séquence	Biotinylé	T _m (°C)	%GC	Séquence à analyser
BDNF ilot1	Forward	AAATTTTGGAGGAA AAAAAAAAGTGT	Non	60	21,4	TATATAYGYG YGYGYGYGTA TTATTGTGTG TGTGTGTGTG TAGGTAGGTT GYGYGGTATG YGGATAAATA AAAGYGYGTA GYGTAYGTTG GAAGYGTAGA AGTAGTTGYG TTTTGGGTT GTTGGATAG GTAGTTTAG YGGYGGGTA TATGTTGTAG YGTATYGTG TAGTAAAGTT ATTGTAGTTG TAA
	Reverse	AAATAAAAAACCTCT TTACAACACTACAAT	Oui	57,2	21,4	
	Synthèse	GGAGAGGTTTATTT TTGTTTA	Non	46,0	26,1	
BDNF ilot2	Forward	TTGGTGAGGATTTGA GGATTTGAGTAA	Non	59	37	TGAAYGAGTT TTYGGAATAT AAGTATTTTT ATAAAAATTG YGATTGTGYG TYGTTTATTT TAATTAYGTA AGATTTTAA TGGYGTGTT YGGYGAGGG TGTTAYGTAT ATTTGTAGAA GTTTTTTTGA TA
	Reverse	TCCACTCACTCCAAC AAATACTA	Oui	58,1	39,1	
	Synthèse	ATTTGAGGATTTGAG TTAG	Non	44,7	31,6	
EGR1	Forward	AGTTTGTGTATAGA TGGGAAAATTAA	Non	57,7	25,9	AAATTATGGT GYGAGYGGGA TAGAGYGAGA GTTATGYGGT TGTTYGTTYG AGTYGTTYGG YGATGAAGAT ATATTTATTY GGGATAGAGA GGAGAG
	Reverse	AAAAAAAGCCATATT TAAACACTACAAT	Oui	57,7	21,4	
	Synthèse	TTGTATAGATGGGAA ATTTAAATTA	Non	43,9	20,0	
GRIN1B ilot1	Forward	GGTAATAGGGTTGGA GATGTT	Non	58,2	42,9	TTTYGTGGA ATTATATTYG GGAGGAGYGG AGTTGYGTTT TTTTYGTGTT TTTGGTAATY GGAGYGTGTT TTTGGAAGYG TYGGAGTTGA TGTGAAGAGT ATATATATAT
	Reverse	ACATTATCACCCCC TTCACCTTAAAC	Oui	58,4	40,7	
	Synthèse	GGTTGGAGATGTTG T	Non	46,1	43,8	
GRIN1B ilot2	Forward	AATTAGTTGATTGAT TTAAATATGG	Non	53,13	40	GYGTTYGTGG TYGYGTTTAG TTYGGYGGA YGYGYGTTTG TTTTGAGAGY GYGTAAAT TYGGGAGYGY GTTTATATGA TTTAAGGATA GAGTYGYGG YGYGYGA
	Reverse	AAAAACTTTCAAATA ACCTAATACTC	Oui	53,33	53,85	
	Synthèse	TTAGTTGATTGATTT AAATATG	Non	42,9	18,2	
MECP2	Forward	GGTTGGTTGATTAA GATAATTATGAA	Non	56,4	25,9	TATTTYGAG TYGGATTAAA AYGTTTTATY GTATTGGGT TTAGGTTTTYG YGGGATTTYG TYGTTTTAYG TTGTGTTTAA TTTGAGATTT YGYGGTATTT TGGAGTTGAY GGAGGGGYG GTGTGTAGTA TAGATGTTTG GAGTTTTTTT AATA
	Reverse	ATTTTATATTA AAA AACTCCAAACATCT	Oui	56	17,2	
	Synthèse	GGTAGTTGGTTAAG AAGTTTATA	Non	44,4	29,2	

Table 3: Liste des différentes séquences étudiées, avec pour chacune les primers forward, reverse et synthèse utilisés. Pour chaque primer a été précisé s'il était biotinylé, la température de fusion (T_m) en °C et le % de GC de la séquence. La dernière colonne représente la séquence étudiée après traitement bisulfite (les C sont donc convertis soit en T, soit en Y s'ils sont suivis d'un G)

Annexe 4

Cette annexe reprend les étapes précises du traitement bisulfite. Le protocole et les produits proviennent du kit EZ DNA Methylation-GoldTM de l'entreprise Zymo Research.

Préparation des buffers:

- Réactif de conversion CT: Ajouter 900 μ L d'eau nucléase Free, 300 μ L de buffer M-Dilution et 50 μ L de buffer M-Dissolving au tube contenant la poudre du réactif de conversion CT. Mélanger pendant 10 minutes.
- Buffer M-Wash: Ajouter 96mL d'éthanol absolu aux 24 mL du buffer M-Wash concentré.

Traitement bisulfite:

1. Ajouter 130 μ L de réactif de conversion CT à 20 μ L de l'échantillon (solution d'ADN 25ng/ μ L)
2. Placer les échantillons dans un thermocycler avec le programme suivant
 - (a) 98°C pendant 10 minutes
 - (b) 64°C pendant 2h30
 - (c) 4°C pour stocker (max 20h)
3. Dans une colonne Zymo-SpinTM IC posée sur un tube collecteur, ajouter 600 μ L de buffer M-Binding et les échantillons
4. Mélanger en retournant la colonne plusieurs fois
5. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
6. Ajouter 100 μ L de buffer M-Wash (changer de tube collecteur)
7. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
8. Ajouter 200 μ L de buffer M-Desulphonation et laisser reposer pendant 15-20 minutes
9. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
10. Ajouter 200 μ L de buffer M-Wash
11. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
12. Ajouter 200 μ L de buffer M-Wash
13. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
14. Placer la colonne dans un eppendorf d'1,5mL et ajouter 10 μ L de buffer M-Elution
15. Centrifuger 30 secondes à 11 000 x g
16. Stocker l'échantillon au frigo à 4°C (utiliser rapidement)

Annexe 5

Cette annexe reprend les étapes précises de la PCR. Le protocole et les produits proviennent du kit PyroMark® PCR de l'entreprise Qiagen.

1. Mélanger tous les produits ci-dessous dans les quantités indiquées (quantités pour un échantillon)

Produit	Quantité
Master Mix PyroMark PCR	12,5 μ L
CoralLoad concentré	2,5 μ L
Eau Nucléase Free	6,5 μ L

2. Ajouter 2,5 μ L du mix de primers forward et reverse en concentration 2 μ M. Voir le tableau de l'Annexe 3 pour les primers utilisés pour chaque gènes.
3. Ajouter 1 μ L de l'échantillon d'ADN issu du traitement bisulfite
4. Placer les échantillons dans un thermocycler avec le programme suivant (répéter 50 fois les étapes de (b) à (d) avant de passer à (e))
 - (a) 95°C pendant 15 minutes
 - (b) 94°C pendant 30 secondes
 - (c) 56°C pendant 30 secondes
 - (d) 72°C pendant 30 secondes
 - (e) 72°C pendant 10 minutes
 - (f) 4°C pour stocker
5. Stocker l'échantillon au frigo à 4°C (si pas utilisé rapidement, au congélateur à -20°C)

Annexe 6

Cette annexe reprend les étapes précises du pyroséquençage. Le protocole et les produits proviennent du kit PyroMark[®] Q24 Advanced CpG Reagents de l'entreprise Qiagen.

Immobilisation du produit PCR sur des billes de sépharose

1. Préparer une plaque PCR 24 puits (3x8) contenant les différents échantillons d'ADN utilisés
2. Secouer la bouteille contenant les billes de sépharose de sorte à obtenir une solution homogène
3. Préparer un master mix contenant les proportions suivantes des différents réactifs (quantités pour un échantillon)

Produit	Quantité
Streptavidine Sépharose HP	1 μ L
Buffer PyroMark Binding	40 μ L
Eau MilliQ	29 μ L

4. Vortexer et ajouter 70 μ L du master mix à chaque échantillon de la plaque préparée en (1)
5. Sceller la plaque PCR et placer sur un agitateur à 1400 rpm pendant 10 minutes à température ambiante

Préparation du PyroMark Q24 Cartridge

1. Placer le Cartridge en face de soi avec l'étiquette visible, les différents éléments sont alors disposés comme suit dans les puits (E = enzyme et S = substrat)

E	A	S
T		C
	G	

2. Remplir le Cartridge avec les quantités de nucléotides, enzyme et substrat indiquées dans le fichier "Pre Run Information" fourni lors de la création d'un "Run" par le logiciel PyroMark Q24 Advanced
3. Placer le Cartridge dans l'instrument PyroMark Q24 Advanced

Préparation de l'ADN et annelage au primer

1. Diluer les primers synthèses préalablement dissous dans le Buffer Annealing, de sorte à obtenir une concentration finale de 0,375 μ M (voir l'Annexe 3 pour les détails des primers utilisés)
2. Placer 20 μ L de la solution de primer dans chaque puits d'une plaque PyroMark Q24 (choisir le primer synthèse en fonction du gène étudié, voir Annexe 3)
3. Placer la plaque PCR et la plaque PyroMark Q24 sur le poste de travail PyroMark Q24 (figure 29)

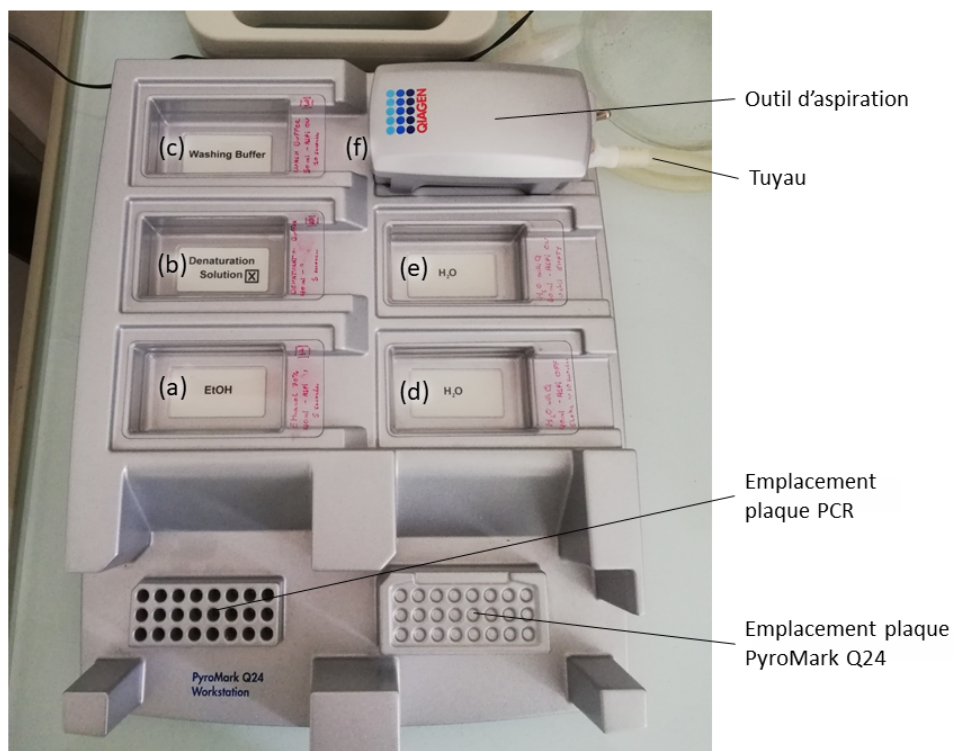


Figure 29: Poste de travail PyroMark Q24. Sont indiqués les emplacements des plaques PCR et PyroMark Q24, de l'outil d'aspiration et de son tuyau, ainsi que des différents bacs (a) d'éthanol, (b) de solution Denaturation, (c) de buffer Wash, (d) et (e) d'eau MilliQ, et (f) le parking.

4. Remplir les bacs du poste de travail (figure 29) de :
 - (a) 40mL d'éthanol 70%
 - (b) 40mL de solution Denaturation
 - (c) 50mL de buffer Wash
 - (d) 70mL d'eau MilliQ
 - (e) 70mL d'eau MilliQ
5. Allumer l'outil d'aspiration et vérifier que le tuyau soit vide
6. Placer l'outil d'aspiration dans les puits de la plaque PCR, et s'assurer qu'ils soient tous vidés
7. Placer l'outil d'aspiration dans le bac (a) contenant l'éthanol pendant 5 secondes
8. Placer l'outil d'aspiration dans le bac (b) contenant la solution Denaturation pendant 5 secondes
9. Placer l'outil d'aspiration dans le bac (c) contenant le buffer Wash pendant 10 secondes
10. S'assurer que le tuyau est vide, et placer l'outil d'aspiration au dessus de la plaque PyroMark Q24
11. Eteindre l'outil d'aspiration et plonger les embouts dans les puits contenant les primers synthèse, en remuant légèrement afin de détacher les billes.

12. Placer l'outil d'aspiration dans le bac (d) contenant de l'eau MilliQ pendant 10 secondes
13. Rallumer l'outil d'aspiration et le placer dans le bac (e) contenant de l'eau MilliQ jusqu'à aspiration de l'entièreté du contenu du bac
14. S'assurer que le tuyau est vide, puis éteindre l'outil d'aspiration et le placer sur le parking (bac (f))
15. Faire chauffer la plaque PyroMark Q24 pendant 5 minutes à 80°C
16. Placer rapidement la plaque dans l'instrument PyroMark Q24 Advanced et le refermer
17. Insérer la clé USB et sélectionner le programme préalablement créé sur le logiciel PyroMark Q24 Advanced

Annexe 7

Cette annexe montre le tableau des résultats fournis par le Nanodrop quant à la quantité et la pureté de l'ADN extrait (table 4). On observe une concentration en acide nucléique moyenne de $125\text{ng}/\mu\text{L}$ avec un écart-type de ± 34 . On constate aussi que les rapports entre l'absorbance à 260nm et 280nm, ainsi qu'entre 260nm et 230nm sont toujours proche de 2 (respectivement $1,98 \pm 0,04$ et $2,09 \pm 0,19$). On en conclut que la pureté et la quantité d'ADN contenu dans les échantillons est suffisant pour la suite des manipulations moléculaires.

Numéro poisson	Conc. acides nucléiques (ng/ μL)	A260	A280	260/280	260/230
20-1	78,1	1,562	0,793	1,97	1,85
20-2	133,3	2,667	1,352	1,97	2,07
20-3	135	2,7	1,375	1,96	2,11
20-4	89,1	1,782	0,934	1,91	1,64
20-5	63,4	1,269	0,637	1,99	1,7
20-6	130,9	2,618	1,29	2,03	2,02
20-7	203,9	4,078	2,113	1,93	2,03
20-8	98,9	1,979	1,002	1,98	2,16
20-9	67,3	1,346	0,659	2,04	2,16
20-10	113,1	2,262	1,134	1,99	2,04
20-11	243,6	4,873	2,566	1,90	1,82
20-13	137,7	2,754	1,369	2,01	2,25
20-14	156,9	3,137	1,591	1,97	2,08
20-15	104,5	2,089	1,144	1,83	2,12
20-16	127,4	2,548	1,339	1,90	1,75
20-17	121,7	2,433	1,225	1,99	2,2
20-18	195	3,9	1,944	2,01	2,09
20-19	149,9	2,997	1,494	2,01	2,1
20-20	169	3,38	1,723	1,96	2,25
20-21	134,8	2,696	1,368	1,97	2,1
20-22	122,2	2,445	1,244	1,97	2,31
20-23	122,9	2,458	1,256	1,96	2,26
20-24	118,4	2,367	1,246	1,90	1,83
20-25	115,4	2,308	1,16	1,99	2,2
20-26	137,8	2,756	1,405	1,96	2,03
20-27	116,3	2,327	1,178	1,98	2,21
20-28	138,1	2,762	1,402	1,97	2,23
20-30	101,9	2,038	1,037	1,97	2,22
20-32	99,9	1,998	1,085	1,84	1,66
20-33	152,2	3,044	1,562	1,95	2,07
20-34	150,5	3,01	1,537	1,96	1,87
20-35	140,3	2,805	1,395	2,01	2,23
20-36	89,6	1,792	0,886	2,02	2,14
20-37	141,2	2,824	1,402	2,01	2,02
20-38	123	2,461	1,24	1,98	2,08
20-39	125,4	2,508	1,254	2,00	1,75
20-40	91,1	1,822	0,908	2,01	2,16
20-41	148,3	2,966	1,48	2,00	2,28
20-42	135,3	2,705	1,341	2,02	2,21
20-45	153	3,06	1,54	1,99	2,21
20-46	178,5	3,57	1,79	1,99	2,12
20-47	123,6	2,472	1,209	2,04	2,22
20-49	86,6	1,732	0,853	2,03	2,36

Numéro poisson	Conc. acides nucléiques (ng/ μ L)	A260	A280	260/280	260/230
20-50	151,4	3,027	1,534	1,97	2,18
20-51	85,1	1,702	0,85	2,00	2,34
20-52	116,7	2,334	1,172	1,99	2,24
20-53	91,3	1,826	0,912	2,00	2,06
20-54	141,4	2,828	1,425	1,98	2,27
20-55	88,8	1,776	0,892	1,99	2,13
20-56	114,2	2,284	1,148	1,99	2,3
20-57	112,5	2,25	1,141	1,97	2,11
20-58	91,4	1,828	0,909	2,01	2,22
20-59	70,7	1,415	0,696	2,03	2,28
20-60	96,4	1,928	0,966	2,00	2,21
20-61	177,9	3,559	1,773	2,01	2,24
20-62	116,1	2,322	1,143	2,03	2,07
20-63	153,9	3,077	1,521	2,02	2,03
20-64	127	2,54	1,305	1,95	1,6
20-65	122,3	2,446	1,224	2,00	2
20-84	83,1	1,661	0,817	2,03	1,74
20-85	92,2	1,843	0,908	2,03	2,12

Table 4: Tableau des résultats issus du Nanodrop. On y observe la concentration en acides nucléiques pour chaque échantillon, ainsi que l'absorbance à 260nm et 280nm et les rapports d'absorbance entre 260nm et 280nm, et entre 260nm et 230nm.

Annexe 8

Cette annexe vise à décrire le protocole des gels d'électrophorèse réalisés, ainsi qu'à montrer les résultats obtenus pour les vérifications de la qualité de l'ADN extrait et de l'efficacité des couples de primers utilisés pour l'amplification.

Protocole

Le gel est préparé avec 50mL de tampon TAE en concentration 0,5% auquel on ajoute 0,5g (pour un produit d'extraction) ou 1g (pour un produit PCR) d'agarose. Après avoir porté à ébullition, 2,5 μ L de Syber safe sont ajoutés, puis le gel est coulé. Après 30 minutes, les échantillons sont déposés dans les puits et l'électrophorèse est lancée: à 100V pendant 30 minutes pour le produit de l'extraction ou à 80V pendant 1h pour un produit PCR. Le résultat du gel est ensuite visualisé à l'aide d'une caméra Biorad et du logiciel ImageLab.

Résultat de l'extraction

La figure 30 montre le résultat du gel visant à vérifier la qualité de l'ADN extrait. Le gel a été réalisé sur 20 échantillons parmi les 60, supposés représenter l'ensemble de la population. On remarque une bande principale à la même hauteur pour l'ensemble des échantillons testés, plus ou moins visible, représentant l'ADN entier. On observe également une faible trainée en dessous de ses bandes. Celles-ci ont cependant été jugées suffisamment faibles pour être négligées et l'ADN a été considéré comme étant de qualité suffisante pour poursuivre les manipulations.

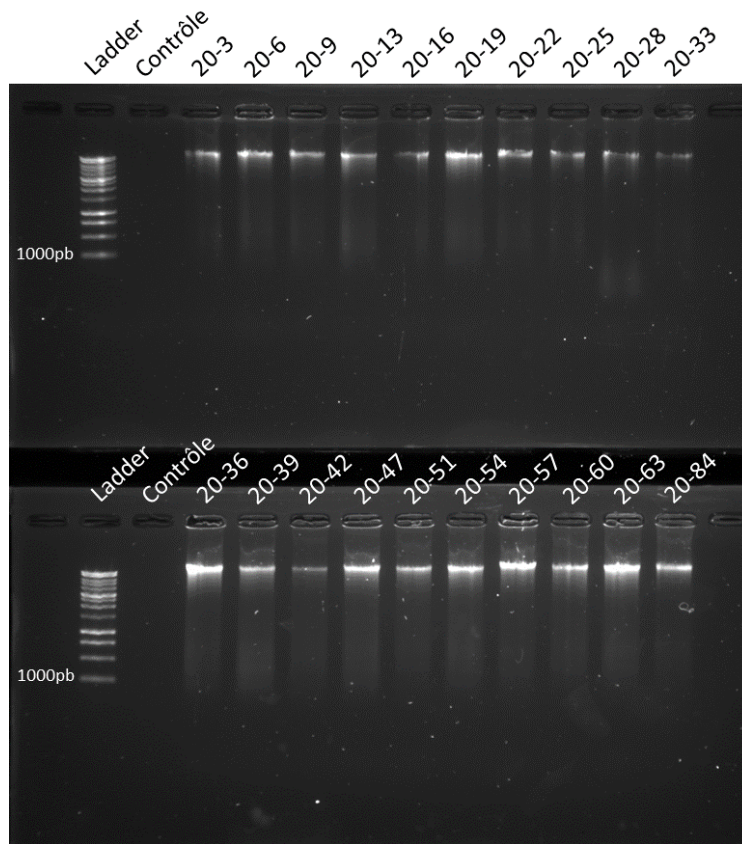


Figure 30: Résultat du gel d'électrophorèse pour la vérification de la qualité de l'ADN après extraction. Le numéro indiqué au dessus des colonnes indique le numéro du poisson.

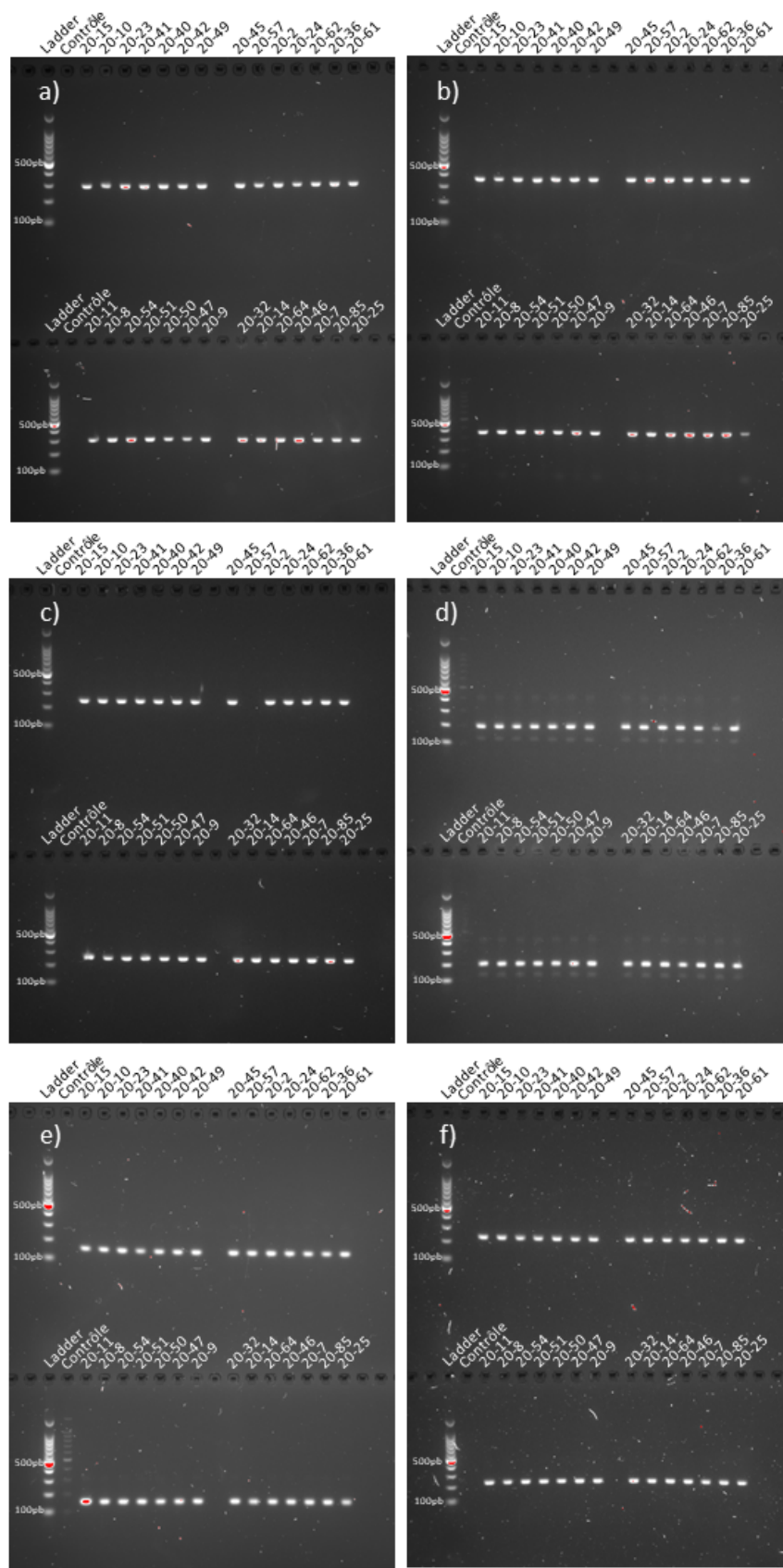


Figure 31: Résultats des gels d'électrophorèse pour la vérification de l'amplification des gènes cibles pour chaque individu. a) *bdnf* ilot 1 ; b) *bdnf* ilot 2 ; c) *egr1* ; d) *grin1b* ilot 1 ; e) *grin1b* ilot 2 ; f) *mecp2*. Le numéro indiqué au dessus des colonnes indique le numéro du poisson.

Résultat de la PCR

La figure 31 montre les gels d'électrophorèses réalisés sur les échantillons après les amplifications des différents gènes d'intérêt. Les 14 échantillons du haut représentent les 14 individus ayant le mieux réussi le test d'apprentissage spatial en ordre décroissant, et ceux du bas, ayant le moins bien réussi en ordre décroissant également (les individus les plus extrêmes se trouvent à gauche).

Pour la plupart des gènes, l'amplification a fonctionné pour l'ensemble des échantillons, montrant l'efficacité de la majorité des couples de primers utilisés. Les 12 premiers échantillons des 2 lignes ont donc été utilisés pour le pyroséquençage, à l'exception de l'échantillon 20-2, qui a été contaminé par de l'ADN d'un autre individu lors d'une erreur de manipulation. L'individu 20-57 a également été écarté pour le gène *egr1* et 20-36 pour l'îlot 1 de *grin1b*, car l'amplification n'a pas ou peu fonctionné pour ces échantillons.

On peut également constater la présence de 2 autres amplicons sur le gel de l'îlot 1 de *grin1b*, ce qui aurait pu traduire la présence de séquences différentes de celle d'intérêt, qui auraient pu altérer les résultats du pyroséquençage. Cependant, aucun problème n'a été détecté par le logiciel, et cette séquence a donc aussi pu être utilisée.

Annexe 9

Cette annexe reprend le tableau 5 comprenant toutes les valeurs de méthylation obtenues par pyroséquençage pour le gène *mecp2*.

Fish_ID	Apprentissage	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9
20-8	Lent	11,35	13,25	6,97	10,39	10,75	7,96	10,7	11,03	5,66
20-9	Lent	6,78	6,76	3,71	5,43	6,64	4,37	6,01	5,86	3,3
20-11	Lent	17,26	21,82	11,86	15,97	18,83	12,38	16,55	18,45	7
20-14	Lent	5,67	6,83	4,05	4,95	5,75	4,36	5,63	6	2,62
20-32	Lent	13,09	15,41	8,21	13,01	12,27	9,04	12,26	12,82	5,73
20-46	Lent	2,89	2,12	1,55	2,36	2,09	1,57	2,65	2,3	1,58
20-47	Lent	3,26	2,34	1,76	2,86	2,51	1,67	3,34	2,44	1,44
20-50	Lent	2,63	2,33	2,11	2,4	2,68	1,9	4,14	2,76	1,39
20-51	Lent	2,99	2,92	2,49	3,07	2,93	2,16	3,81	3,06	2,68
20-54	Lent	3,52	2,51	2,64	2,24	3,72	1,82	3,74	2,74	2,27
20-10	Rapide	13,32	15,33	7,84	10,53	12,69	9,54	12,83	13,28	6,43
20-24	Rapide	2,76	3,44	3,3	2,66	2,9	0	4,03	3,13	2,76
20-36	Rapide	3,26	2,14	2,71	2,51	2,47	2,22	3,42	3	1,61
20-40	Rapide	2,58	2,08	2,23	1,84	2,49	1,06	2,11	2,09	1,35
20-41	Rapide	2,7	2,54	1,93	2,09	3,36	1,7	3	2,38	1,9
20-45	Rapide	18,3	21,02	10,71	16,44	15,34	11,81	17,04	17,75	7,69
20-49	Rapide	3,6	3,85	2,26	3,39	3,19	2,32	3,67	3,44	1,89
20-57	Rapide	13,48	14,34	7,57	11,35	10,74	8,62	11,55	12,58	6,14
20-62	Rapide	3,35	2,87	2,07	2,34	3,07	2,04	3,05	3,24	2,32

Table 5: Tableau des pourcentages de méthylation des CpG. Pour chaque poisson, est indiqué s'il a été considéré comme ayant un apprentissage lent (n=10) ou rapide (n=9), ainsi que la proportion mesurée de méthylation (en %) pour les 9 CpG de la séquence étudiée de *mecp2*

Annexe 10

Cette annexe reprend l'ensemble des limitations de l'expérience réalisée dans le cadre de ce mémoire.

Pour ce qui est de la mesure des capacités cognitives, un maximum a été fait afin de vérifier que le test était fiable, et que les comportements observés dans le labyrinthe correspondent bien à de l'apprentissage. Le score utilisant les pentes de temps représente cependant une simplification d'une réalité plus complexe, on réduit donc beaucoup l'information et il y a également un risque de biais. Il a également été constaté que le choix de la chambre au dernier essai pouvait être dû au hasard. Cependant, ces deux scores d'apprentissage étaient significativement corrélés, ce qui pouvait impliquer qu'ils avaient tendance à montrer la même information, mais avec un coefficient de corrélation suffisamment bas (0,29), pour indiquer que les informations que chacun apporte sont complémentaires.

On peut également critiquer le fait qu'aucune répétition n'a été faite, ce qui empêche de vérifier que cette mesure est répétable dans le temps et constante chez l'individu. Cette répétition aurait cependant apporté des complications à l'expérience, car les différences de capacités de mémorisation auraient biaisé les résultats du deuxième test. Une mesure de cette mémoire aurait dû également être faite, ce qui aurait néanmoins permis d'ajouter de l'information quant aux capacités cognitives des individus. Une autre solution aurait été d'utiliser plusieurs tests différents, comme ce qu'il avait été prévu de faire avec le test d'habituation. Dans ce cas, si les capacités entre les 2 tests sont similaires, on pourrait supposer une certaine constance dans les capacités d'apprentissage. Cependant, si le résultat montre des capacités d'apprentissage différentes, cela ne montre pas pour autant qu'elles ne sont pas répétables. Il se pourrait également que les capacités des individus soient différentes pour chaque test. Cela aurait donc également pu fournir de l'information afin de constater les capacités d'apprentissage des poissons sont similaires entre tests ou non.

Pour ce qui est du test d'habituation, le principal problème qui avait été observé est que certains poissons percevaient la colonne comme un abri, et ils y retournaient donc régulièrement après l'apprentissage pour se réfugier. Une solution à ce problème serait d'utiliser un objet moins haut, qui ne ferait pas de l'ombre derrière laquelle les poissons peuvent se cacher.

Ensuite, certains syndromes comportementaux ont pu être détectés chez *K. marmoratus*. Ces traits de personnalités ne semblaient cependant pas corrélés aux capacités d'apprentissage, contrairement à ce qui a pu être observé chez d'autres espèces. Toutefois, seul l'apprentissage spatial et certains traits de personnalité ont été testés, et il serait donc important de vérifier si des corrélations pourraient être observées entre personnalité et cognition chez cette espèce. D'autant plus que certains facteurs liés à la personnalité (comme l'attractivité de la récompense) peuvent influencer l'apprentissage observé, de sorte à ce qu'il ne soit plus représentatif des capacités d'apprentissage réelles.

L'importance d'inclure la personnalité dans l'expérience peut dépendre des objectifs expérimentaux. Pour comprendre les mécanismes de l'apprentissage, il est primordial de différencier les 2 afin de distinguer ce qui est causé par les capacités cognitives de l'effet de la personnalité. Mais d'un point de vue écologique, qu'un individu ne sache pas où se localise un abri parce qu'il n'a pas exploré, ou parce qu'il n'a pas retenu où il était, le résultat sera le même, il ne saura pas où se réfugier en cas d'attaque. La personnalité pourrait donc influencer les résultats d'une expérience sur l'apprentissage. Mais il est également possible qu'elle influence d'autres expériences qui ne sont pas en lien avec les capacités cognitives, par exemple, si un certain traitement expérimental affectait différemment les individus en fonction de leur personnalité (Carere and Locurto 2011).

Ensuite, il n'a été montré dans cette expérience que des corrélations entre différents traits. Il pourrait donc également être intéressant d'essayer de comprendre quelles sont les relations entre les traits de personnalité et avec la cognition. Cela représenterait cependant un challenge expérimental, car il est compliqué de manipuler la personnalité chez un animal, et une plus ample compréhension des mécanismes sous-jacents serait sans doute nécessaire.

En ce qui concerne les possibles causes de la variabilité des capacités cognitives chez *K. marmoratus*, la méthylation des CpG d'aucune séquence étudiée ne semble correspondre aux capacités d'apprentissage mesurées. Plus d'études sont donc nécessaires pour comprendre comment l'origine et les mécanismes possibles de cette variabilité. Cela peut se faire en étudiant d'autres séquences sur les gènes étudiés, d'autres gènes ou d'autres mécanismes épigénétiques sur ces séquences.

On a cependant tout de même observé une variation importante dans la méthylation des CpG de *mecp2* entre les individus qui devrait probablement avoir un effet biologique. Il faudrait donc vérifier s'ils sont en effet exprimés différemment entre les individus au taux de méthylation élevé et bas. Si c'est le cas, il serait alors intéressant d'essayer de trouver quels sont les impacts sur cette espèce, car comprendre le rôle de MeCP2 chez poisson pourrait aider à comprendre le rôle de MeCP2 chez l'homme. Or des mutations et variations de l'expression de ce gène chez les êtres humains peuvent mener à des déficiences mentales importantes.

Enfin, cette expérience a été réalisée en laboratoire sur des individus d'une seule lignée, élevés en captivité depuis de nombreuses générations. Il ne peut donc pas être certain que ces résultats s'appliquent également à l'espèce entière dans son milieu naturel. Des études sur le terrain sont donc nécessaires afin de vérifier si les résultats sont extrapolables ou non.