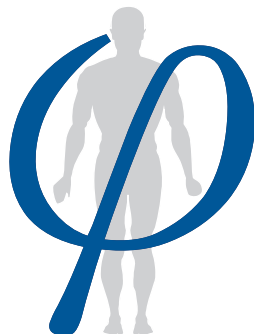


Annales  
de la  
Fondation Fyssen

N° 35



---

Annales  
de la Fondation  
Fyssen

---

2020

Directeur de la publication : Daniel LALLIER

Administration : 194, rue de Rivoli – Paris 1<sup>er</sup>

Tél : 01 42 97 53 16

Secrétariat de rédaction : Louise WASTIN

e-mail : l.wastin@fondationfyssen.fr

Copyright : Les Annales de la Fondation Fyssen 2020  
Cette publication ne peut être vendue / *Publication not for sale*

Tous droits réservés pour tous pays : toute reproduction, diffusion ou représentation, en tout ou partie, sous quelque forme que ce soit, est interdite sans accord préalable et écrit de la Fondation Fyssen.

*All rights reserved for all countries : no part of this publication may be reproduced or distributed in any form or by any means without the prior written permission of the Fyssen Foundation.*

## Activités de la FONDATION FYSSSEN

La FONDATION FYSSSEN a pour objectif de promouvoir la recherche et l'étude scientifique des mécanismes logiques du comportement chez les êtres vivants et leur développement ontogénétique et phylogénétique. Elle s'intéresse plus particulièrement aux processus cognitifs chez l'homme et chez les animaux, ainsi qu'aux fondements biologiques et culturels de ces processus.

Cette Fondation soutient toutes les recherches qui permettront de rendre rigoureux et précis ce domaine fondamental qui fait appel à des disciplines telles que l'éthologie, la paléontologie, l'archéologie, l'anthropologie, la psychologie, la logique et les sciences du système nerveux.

La Fondation Fyssen a été reconnue d'utilité publique par décret du 20 mars 1979 et porte le nom de son Fondateur, Monsieur Fyssen, intéressé depuis toujours par la compréhension scientifique de ces questions.

En 1982, Madame A.H. Fyssen lui a succédé à la Présidence de la Fondation. Elle est décédée en 2003.

La Fondation Fyssen a mis au point un dispositif original pour soutenir les sciences cognitives dans les domaines définis plus haut. Il comprend :

- des **ALLOCATIONS POST-DOCTORALES**, qui permettent la formation de jeunes chercheurs français ou étrangers, titulaires d'un doctorat étranger, qui souhaitent réaliser leur projet dans des laboratoires en France ou à des chercheurs, français ou étrangers et titulaires d'un doctorat français, qui souhaitent réaliser leur projet dans un laboratoire étranger ;

- des **SUBVENTIONS DE RECHERCHE**, destinées à des chercheurs français ou étrangers, pour réaliser un projet scientifique collectif au sein d'un laboratoire d'accueil en France dont l'activité entre dans les objectifs de la Fondation ;

Toutes les modalités de ces deux programmes sont disponibles sur le site internet de la Fondation.

- des **COLLOQUES**, des **SÉMINAIRES**, des **PUBLICATIONS** sur des thèmes jugés importants pour atteindre les buts de la Fondation ;

- la parution annuelle des « **ANNALES FYSSSEN** » qui comportent des articles originaux dans les domaines soutenus par la Fondation ;

- un **PRIX SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL** destiné à couronner une découverte, ou l'ensemble d'une œuvre scientifique, ayant contribué d'une manière décisive aux progrès de la connaissance dans les domaines de recherche soutenus par la Fondation. Ce Prix est attribué chaque année à un chercheur de réputation internationale.

L'ensemble de ce dispositif doit permettre à la Fondation Fyssen de soutenir efficacement la recherche dans les sciences cognitives. Pour sa mise en œuvre, la Fondation dispose d'un Conseil d'Administration composé de scientifiques, juristes, financiers et hauts fonctionnaires, et d'un Conseil Scientifique.

Le Conseil Scientifique est chargé de lancer les appels à projets, d'évaluer la qualité des dossiers qui lui sont soumis, de suivre le déroulement des travaux qui bénéficient du soutien de la Fondation et enfin de désigner le lauréat du Prix International de la Fondation Fyssen.

## CONSEIL D'ADMINISTRATION AU 01/01/2022

**Monsieur Daniel LALLIER, Président,**  
Inspecteur Général des Finances honoraire

**Monsieur Bernard ZALC, Vice-Président,**  
Directeur de Recherche Emérite à l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière

**Madame Jeanne-Marie PARLY, Trésorière,**  
Ancien Recteur et professeur d'Université Honoraire

**Monsieur Jean-Claude HASSAN, Conseiller d'État,**  
Membre du Collège de l'Autorité des Marchés Financiers

**Madame Catherine BRUN LORENZI,**  
Avocate au Barreau de Paris, ancien membre du Conseil de l'Ordre

**Monsieur Pierre JACQUET,**  
Économiste, Professeur de politique économique à l'École des Ponts – Paris Tech, membre du Cercle des économistes.

**COLLÈGE DE FRANCE,**  
**Représenté par Monsieur Philippe DESCOLA,**  
Professeur, Chaire d'Anthropologie de la nature

**MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE,**  
**Représenté par Monsieur Bruno DAVID,**  
Président

**UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE,**  
**Représenté par Monsieur Bernard CAPELLE,**  
Professeur, chargé de mission auprès du Président de l'UPMC

## CONSEIL SCIENTIFIQUE AU 01/01/2022

**Monsieur Daniel LALLIER, Président,**

**Madame Ghislaine DEHAENE-LAMBERTZ (Psychologie Cognitive), Vice-Présidente,**

Directrice de Recherche CNRS, Laboratoire de Neuroimagerie,  
Neurospin, Université Paris Saclay, France

**Monsieur Brice BATHELLIER (Neurobiologie)**

Directeur de Recherche CNRS, Neurobiologie, Institut de l'Audition, Paris, France

**Monsieur Andrew BEVAN (Technologie et Histoire des Techniques),**

Professeur d'Archéologie comparative à l'Institut d'Archéologie,  
University College de Londres, Grande-Bretagne

**Monsieur Joël FAGOT (Primatologie),**

Directeur de Recherche, Laboratoire de Psychologie Cognitive, Marseille, France

**Monsieur Jean-Antoine GIRAULT (Neurobiologie),**

Directeur de Recherche à l'INSERM  
« Classe exceptionnelle » (DRCE), Institut de Fer à Moulin, Paris, France

**Madame Susanne KUECHLER (Anthropologie Sociale),**

Professeur à l'University College de Londres, Grande-Bretagne

**Monsieur Jean-Christophe SANDOZ (Ethologie),**

Directeur de Recherche CNRS,  
Directeur du Programme de Recherche EVOLBEE,  
Laboratoire Évolution, Génomes, Comportement, Écologie, Gif-sur-Yvette, France

**Madame Angela SIRIGU (Neurobiologie)**

Directrice de Recherche, CNRS,  
Directrice de l'Institut des Sciences Cognitives Marc Jeannerod, Bron, France

**Madame Marie SORESSI (Archéologie-Hominim Diversity Archaeology),**

Professeur à l'Université de Leiden, Pays-Bas

**Monsieur Manos TSAKIRIS (Neurosciences Cognitives),**

Professeur à Royal Holloway, University of London, Grande-Bretagne

**Monsieur Thomas WIDLAK (Anthropologie Sociale),**

Professeur d'Anthropologie, Université de Cologne, Allemagne

## COMITÉ DE LECTURE

**Professeur Laurent COHEN,**

Professeur de Neurologie,  
Hôpital de la Salpêtrière, ICM, Paris

**Docteur Rémy CRASSARD,**

Chargé de Recherche,  
Directeur adjoint d'Archéorient,  
CNRS - Université Lyon 2, UMR 5133, Lyon

**Professeur Martin GIURFA,**

Professeur de Classe Exceptionnelle de Neurosciences  
Centre de Recherches sur la Cognition Animale  
CNRS - Université de Paul Sabatier Toulouse

**Docteur Julie GREZES,**

Directrice de Recherche INSERM,  
Laboratoire de Neurosciences Cognitives INSERM U960,  
Institut des Sciences Cognitives, École Normale Supérieure, Paris

**Docteur Hélène ROCHE,**

Directrice de Recherche Émérite,  
UMR 7055, CNRS Université Paris Ouest Nanterre

**Docteur Cédric SUEUR,**

Maître de Conférences en Éthologie, Éthique et Primatologie  
Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, CNRS-Université de Strasbourg

**Stéphanie TROUCHE**

Chargée de recherche INSERM, Institut de Génomique Fonctionnelle,  
Département de Neurosciences, Montpellier

**Valentina VAPNARSKY,**

Directrice de Recherche CNRS  
Sous-directrice du Laboratoire d'Ethnologie et de Sociologie Comparative, Nanterre



**Valentin WYART,**

Chercheur en Neurosciences Cognitives, INSERM, École Normale Supérieure, Paris

**ANTHROPOLOGIE SOCIALE – SOCIAL ANTHROPOLOGY****MARMONE Giordano** (Allocation post-doctorale 2019)

Partager le rythme des institutions. Influence musicale et assimilation générationnelle chez deux populations pastorales d’Afrique de l’Est .....	11
Sharing the rhythm of institutions. Musical influence and generational assimilation in two East African pastoral populations .....	22

**ETHOLOGIE / PSYCHOLOGIE – ETHOLOGY / PSYCHOLOGY****BAS Jésus** (Allocation post-doctorale 2018)

La représentation du leadership chez le nourrisson humain .....	32
Infants’ representation of leader-follower relations .....	41

**BUATOIS Alexis** (Allocation post-doctorale 2018)

L’aquarium automatisé : une innovation nécessaire pour explorer la cognition chez le poisson zèbre ( <i>Danio rerio</i> ) ? .....	47
Automated tank : a needed tool to explore cognition in zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) ? .....	57

**TRANNOY Séverine** (Subvention de Recherche 2018)

Apprendre des combats : comprendre l’avantage évolutif de la communication du statut de dominance .....	65
Learning from fights : understand the evolutionary benefit of dominance status communication .....	75

**NEUROBIOLOGIE – NEUROBIOLOGY****CORBO Julien** (Allocation post-doctorale 2018)

Impact de l’apprentissage associatif sur les représentations corticales de stimuli visuels .....	83
Impact of associative learning on the cortical representation of visual stimuli .....	92

**GANGAROSSA Giuseppe** (Subvention de Recherche 2018)

Exploring the role of the paraventricular thalamus in the regulation of feeding and energy balance .....	99
--	----

**LAWLOR Jennifer** (Allocation post-doctorale 2018)

Circuits longs pour l’apprentissage d’une tâche audio-motrice : étude du contrôle cholinergique de l’apprentissage sensorimoteur .....	110
Long-range circuits for learning of audiomotor tasks : investigating cholinergic control of sensorimotor learning .....	118

**TRÜBUTSCHEK Darinka** (Allocation post-doctorale 2018)

Représentations d’objets indépendantes du contexte dans la mémoire de travail humaine ....	124
Context-independent item representations in human working memory .....	135

***PALÉONTOLOGIE / ARCHÉOLOGIE – PALEONTOLOGY / ARCHAEOLOGY***

<b>BOUDADI-MALIGNE Myriam</b> (Subvention de Recherche 2018)	
La Domestication du loup au cours du Paléolithique – Apport de l’approche croisée de la Paléogénomique et la Morphométrie .....	143
Wolf domestication during Palaeolithic – Cross approach using palaeogenomics and morphometry .....	152
<b>LEDOUX Lysianna</b> (Allocation post-doctorale 2019)	
Ichnologie en milieu souterrain. Les empreintes comme marqueur des comportements humains en grotte .....	160
Ichnology in subterranean environment. Tracks as a marker of human behaviour in caves ..	171
<b>PESCHAUX Caroline</b> (Allocation post-doctorale 2019)	
La parure en « pierres tendres noires » à la fin du Magdalénien dans l’Arc jurassien .....	181
Adornment in ‘black soft stones’ at the end of the Magdalenian period in the Jura Arc .....	194
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	204

## Partager le rythme des institutions. Influence musicale et assimilation générationnelle chez deux populations pastorales d'Afrique de l'Est

Giordano MARMONE

*ATER, Département d'anthropologie, Université Paris Nanterre, LESC-CREM*

Le système social à classes d'âge et de génération des pasteurs Rendille du Kenya est synchronisé probablement depuis au moins un siècle avec celui de leurs voisins Samburu. Au cours des trente dernières années cette synchronisation s'est de plus en plus transformée en une identification tout court : les classes générationnelles des Rendille et des Samburu partagent désormais les mêmes noms et leurs membres se perçoivent comme les recrues d'une même cohorte intercommunautaire. Selon l'hypothèse proposée dans cet article, ce phénomène se fonde en partie sur un processus d'uniformisation esthétique favorisé par l'appropriation, de la part des Rendille, des chants générationnels et statutaires des Samburu. Leur performance entraîne, chez les Rendille, une série d'aménagements sociaux, rituels et linguistiques. L'assimilation des nouveaux répertoires musicaux impose en effet l'intégration graduelle des catégories sociales et générationnelles samburu auxquelles ces chants sont associés. Les téléphones portables sont aujourd'hui les moyens principaux de construction de ces réseaux de partage musical. Ils jouent ainsi un rôle crucial dans la consolidation de l'hégémonie esthétique et culturelle des Samburu au nord du Kenya.

### Mots clés

Pouvoir, institutions, musique, téléphones portables, langage, générations, âge, pastoralisme, Afrique de l'Est

## Sharing the rhythm of institutions. Musical influence and generational assimilation in two East African pastoral populations

The age and generation social system of the pastoral Rendille of northern Kenya has been synchronized with that of their Samburu neighbours for at least a century. Over the last thirty years this synchronisation has increasingly turned into an identification: the Rendille and Samburu generational groups now have the same names and their members perceive themselves as recruits of the same cross-community cohort. In this article I argue that this phenomenon is based in part on a process of aesthetic uniformization fostered by the appropriation of Samburu songs by the Rendille. The performance of these songs leads to a series of social, ritual, and linguistic adjustments among the Rendille. The assimilation of the new musical repertoires imposes the gradual integration of the Samburu social and generational categories with which these songs are associated. Today, mobile phones are the main tools for the construction of these musical sharing networks. They thus play a crucial role in the consolidation of the aesthetic and cultural hegemony of the Samburu in northern Kenya.

### Keywords

Power, institutions, music, mobile phones, language, generations, age, pastoralism, East Africa

« **L**a langue des Samburu est en train d'entrer parmi nous. [...] La culture des Samburu [...]. Nous allons dans cette direction-là. Nous chantons en samburu. Il n'y a pas de langue rendille. [...] Maintenant la langue

samburu est arrivée, elle est entrée parmi nous et nous tous [la] comprenons. Qu'est-ce qui est entré [parmi nous] ? Les chants des Samburu<sup>1</sup> ».

<sup>1</sup> Entretien 04HS2021. Marsabit County, Kenya, 07/2021.

Le Marsabit County, une des régions les plus arides du Kenya. Un après-midi torride de juillet dans le petit village rendille de Hal Surua, à quelque kilomètre de Korr. Pas un bruit, pas une voix. Toute la communauté qu'y habite semble s'être volatilisée. Les jeunes hommes circoncis<sup>2</sup> et les filles célibataires sont partis avec les dromadaires de leurs familles pour atteindre les campements saisonniers dans les territoires de pâturage. Anciens, femmes mariées et enfants sont restés avec quelques chèvres et moutons mais apparemment le chaud a déposé un voile de silence sur les humains et sur les animaux. Dans ma hutte, un ancien junior rendille d'environ 35 ans répond en samburu à une série de questions que je lui pose à propos des relations avec leurs voisins et alliés. Ses paroles laissent transparaitre une certaine résignation, un sens d'impuissance vis-à-vis d'un processus irrésistible qu'il a pourtant contribué à reproduire. Tout le monde aime les chants des Samburu au Kenya du nord-ouest. Sauf peut-être les Turkana, qui sont leurs ennemis jurés. Mais presque toutes les autres communautés pastorales et agro-pastorales de cette partie du pays ont adopté intégralement ou en partie les répertoires musicaux et la langue samburu. Rendille, Ariaal, El Molo, Ndorrobo. Les chants de leurs voisins Samburu, plus célèbres et nombreux, font désormais partie du quotidien de ces communautés qui les exécutent tant en contexte formel (cérémonies, initiations, etc.) qu'informel. À chaque performance, à chaque rituel accompagné par ces répertoires, leurs membres s'approchent d'une identité samburu qui semble désormais dominer cette partie du Kenya.

L'ancien junior avec lequel je suis en train de discuter ne se souviens plus du nom rendille de la promotion générationnelle à laquelle il appartient. Il s'identifie désormais complètement avec le système générationnel des Samburu. « Je suis un Lkishami » me dit-il. Il s'agit du nom de la

promotion ouverte en 2005 chez les Samburu<sup>3</sup> et environ deux ans après chez les Rendille. « Quel est le nom rendille de ta promotion ? » je lui demande. « Je l'ai entendu mais je l'ai oublié ». L'ancien senior assis à son côté s'identifie lui aussi avec une génération samburu. Il est un Lkuroro<sup>4</sup> mais il se souvient aussi du nom de sa promotion rendille (« Difikuto<sup>5</sup> »). Par contre il ne connaît pas le nom générationnel des Lkishami en langue rendille. Mon assistant de terrain lui demande :

Q : « Dans le passé les personnes [les anciens] apprenaient [aux jeunes] les noms des promotions générationnelles. Dans le cas des Lkishami personne [ne l'a fait] ? »

R : « On le leur a dit à eux aussi ! Il n'y a pas de personne à qui on n'apprend pas le nom de sa génération »

Q : « Ils ne veulent pas [un nom générationnel rendille] ? »

R : « Ce n'est pas qu'ils ne le veulent pas »

L'ancien junior de la génération Lkishami reprend la parole :

« Maintenant que nous entrons dans la langue samburu, nous sommes en train de tuer la culture rendille ».

Les réflexions de ces deux hommes montrent que l'acquisition et l'assimilation des noms générationnels en provenance d'une communauté externe ne représentent pas, dans ce cas, des phénomènes exclusivement linguistiques même si la langue parlée et chantée semble jouer un rôle crucial dans ce parcours d'uniformisation des systèmes sociaux. Les dénominations générationnelles ont toujours fait l'objet d'une large circulation parmi les populations pastorales et agro-pastorales du Kenya actuel, surtout en

<sup>2</sup> Les membres de ce statut d'âge sont souvent appelés « guerriers », même dans la littérature scientifique. Le terme « guerrier » peut être trompeur car la principale occupation de ces jeunes n'est pas le conflit mais le soin du bétail. Il faut cependant noter que les razzias sont encore très courantes dans cette partie du Kenya et que les jeunes hommes circoncis sont en première ligne de cette activité.

<sup>3</sup> Cette promotion générationnelle, chez les Samburu, a été « fermée » en 2019. Cela veut dire qu'elle ne peut plus accueillir des nouveaux recrues et ses membres sont passés au statut d'âge des Pères. Parmi les Rendille la fermeture de cette promotion a eu lieu au début de 2021.

<sup>4</sup> Promotion générationnelle ouverte en 1976 et fermée en 1990 chez les Samburu. Environ deux ans après chez les Rendille.

<sup>5</sup> Comme nous le verrons plus loin, ce nom de promotion générationnelle n'est pas, selon Kurimoto (1998), celui qui correspond à la promotion Lkuroro. À partir des recherches de l'anthropologue japonais ce nom correspondrait plutôt à la promotion samburu précédente, Lkishili.



**Figure 1** : Vue nocturne du village d'Hal Surua. Photo de l'auteur. Marsabit County, Kenya, Juillet 2021.

époque précoloniale. Cependant, dans ce cas, nous assistons à un processus quelque peu différent. Les membres les plus jeunes du peuple rendille ne sont pas seulement en train d'oublier le nom de leurs promotions générationnelles dans leur propre langue. Ils sont en train d'intégrer de nouvelles catégories générationnelles et un nouveau parcours d'ontogénèse fondés sur une organisation sociale allochtone : en l'occurrence, celle de leurs voisins Samburu. La synchronisation des temporalités initiatiques des Rendille avec celles des Samburu n'est pas récente (Spencer 1973) mais ce n'est qu'au cours des trois dernières décennies que ce dispositif d'uniformisation générationnelle a commencé à prendre l'ampleur que nous pouvons observer aujourd'hui. Il ne s'agit pourtant pas d'un rapport égalitaire. Les Rendille sont parfaitement conscients de la pénétration progressive au sein de leur communauté du *lkerreti*, la « culture », de leurs voisins. Et toutefois ils n'ont aucune intention de mettre un frein à ces pratiques linguistiques, rituelles et musicales quotidiennes qui les amènent à se rapprocher de plus en plus du système d'âges et de génération des Samburu. De quelle manière ces relations politiques asymétriques ont pu s'instaurer, se perpétuer et se renforcer ?

À partir de l'exemple des pasteurs Samburu et Rendille du Kenya, nous allons observer com-

ment la construction d'une co-temporalité générationnelle<sup>6</sup> intercommunautaire et l'uniformisation de systèmes sociaux aux caractéristiques différentes peut se fonder sur le partage d'artefacts esthétiques associés à des catégories institutionnelles et statutaires. L'assimilation linguistique et musicale évoquée par mes interlocuteurs est, selon l'hypothèse que je vais proposer ici, la manifestation d'un pouvoir symbolique exercé à travers la transmission d'objets et de musiques qui incarnent une conception spécifique des classements des individus. Au cours des dernières années, ces processus d'uniformisation culturelle semblent dépendre de plus en plus de l'usage des technologies de communication numériques qui étendent l'influence politique de certaines communautés pastorales en instaurant des nouvelles modalités de proximité et d'interaction.

<sup>6</sup> La notion de « temporalité générationnelle » désigne ici le parcours de maturation d'individus qui partagent à peu près le même âge, à partir du recrutement au sein d'une promotion générationnelle jusqu'à l'accès au statut d'âge des Pères. Cette phase correspond approximativement à la période de l'état de « guerrier », quand les membres d'une promotion sont de jeunes hommes circoncis. Cette phase peut être synchronisée entre plusieurs communautés. Les membres de ces promotions synchronisées peuvent (ou non) se percevoir comme faisant partie de la même cohorte, du même groupe générationnel intercommunautaire.

### **Aetas : des ères générationnelles partagées**

Samburu et Rendille parlent deux langues différentes qui appartiennent à deux familles éloignées : les premières sont locuteur d'une langue *maa* de la famille nilo-saharienne ; les deuxièmes parlent une langue d'origine couchitique proche du somalien. Comme il est le cas pour beaucoup de populations pastorales d'Afrique de l'Est, leurs systèmes sociaux se caractérisent par la présence d'une série de classes d'âges qui produisent une hiérarchisation des individus sur la base de leur appartenance à une promotion générationnelle et un statut d'âge déterminés. Chez les Samburu, à la suite de la circoncision, autour des 13-20 ans, les jeunes hommes rejoignent une promotion, un groupe générationnel, composé d'individus qui ont à peu près le même âge. Les membres d'une promotion sont intégrés, au cours de leur vie et tous ensemble, dans une série successive de statuts d'âge : de celui des jeunes hommes circoncis au statut final des Pères<sup>7</sup> seniors. Tous les 14 ans environ, les Samburu instaurent une nouvelle promotion générationnelle à laquelle ils donnent un nom distinctif (Marmone 2021).

Le système d'âge des Rendille présente des points en commun avec l'organisation sociale des Samburu (trois statuts d'âge : garçons non-circoncis, jeunes circoncis, Pères ou anciens ; l'ouverture d'une nouvelle promotion générationnelle tous les quatorze ans) mais aussi avec le système *gada* des peuples de langue couchitique comme les Borana. En effet, différemment du système samburu, l'organisation générationnelle des Rendille est généalogique, c'est-à-dire que les hommes sont recrutés dans une promotion déterminée sur la base du positionnement générationnel de leur père (Baxter 1979)<sup>8</sup>. Les jeunes hommes rendille doivent impérativement rejoindre une promotion qui se trouve à trois promotions de distance de celui du père et six de

celui du grand-père<sup>9</sup>. Cette fixité dans le recrutement générationnel produit des incongruités. Les enfants cadets d'un homme âgé se retrouvent souvent à rejoindre un groupe générationnel dont les membres sont tous beaucoup plus âgés qu'eux et ont déjà célébré la grande partie des cérémonies de leur statut d'âge<sup>10</sup>. Ces garçons peuvent alors changer de promotion pour rejoindre un groupe d'homme qui ont un âge plus proche du leur (Spencer 1973). Pour les Samburu, au contraire, le recrutement générationnel est plus souple mais le changement de promotion est absolument inadmissible. En outre, les Rendille possèdent (ou devrait-on dire possédaient ?) leur propre organisation générationnelle, composée par des promotions aux noms recourent cycliquement (les noms des promotions samburu sont en revanche toujours différents). Voici dans le tableau ici-bas les noms des sept dernières promotions samburu et rendille, ceux qui constituent, chez les Rendille en particulier, une lignée générationnelle dans son entier (les Libale sont les pères des Irbangudo et les grand-pères des Lkisieku. Les Irbangudo sont les pères des Lkisieku) :

<b>Samburu</b>	<b>Rendille</b>
Lmekuri (1936)	Libale (1937)
Lkimaniki (1948)	Irbandif (1951)
Lkishili (1963)	Difgudo (1965)
Lkuroro (1976)	Irbangudo (1979)
Lmooli (1990)	Dibgudo - Ilmoili (1993) <sup>11</sup>
Lkishami (2005)	Lkishami (2007)
Lkisieku (2019)	Lkisieku (2021-22)

Cette liste montre de manière claire l'évolution du système générationnel rendille par rapport à son homologue samburu. Si c'est vrai que l'ouverture des nouvelles promotions chez les Rendille est coordonnée depuis longtemps avec celle des Samburu, nous devons aussi remarquer que cette coordination s'est transformée, au cours des quinze dernières années, en une iden-

<sup>7</sup> Quand le terme « Père/Pères » est écrit avec une majuscule, il fait référence aux membres du statut d'âge des anciens. Quand il est écrit avec une minuscule il renvoie à la relation de parenté père-fils.

<sup>8</sup> Dans le système d'âge des Samburu les garçons sont recrutés dans la promotion générationnelle nouvellement instaurée, la seule ouverte au recrutement, quelle que soit la promotion du père.

<sup>9</sup> Si on appelle la promotion du grand-père « A », celle du père sera alors « D » et celle du fils « G ». La succession générationnelle en question est alors A-D-G (A-b-c-D-e-f-G). Les hommes recrutés dans la génération « B » initieront leurs enfants dans la promotion « E » alors que leurs petit-fils feront partie de la promotion « H », et ainsi de suite.

<sup>10</sup> Un phénomène appelé *under-aging* et assez commun dans les systèmes d'âges d'Afrique de l'Est, en particulier dans les systèmes *gada* (Schlee 1998).

<sup>11</sup> Kurimoto 1998.

tification presque complète. Il s'agit d'un processus qui a commencé progressivement à partir de la promotion générationnelle Lmooli/Dibgudo mais qui s'est définitivement affirmé avec les Lkishami.

Le système d'âges des Samburu est donc devenu ce que Günter Schlee appelle un « meta-system » (1998), c'est à dire un système d'âge qui inclut plusieurs communautés parfois aux langues et aux systèmes économiques différents comme les Samburu et les Rendille<sup>12</sup>. Ce phénomène se développe le plus souvent sous la forme de « réverbération » d'une certaine conception des articulations générationnelles et de statut d'âge à partir d'un centre d'influence identifiable ou à partir d'un processus de construction collective partagée (Kurimoto 1998). Les communautés qui se réunissent autours de ces méta-systèmes d'âges développent progressivement la perception d'appartenir aux mêmes cycles générationnels et à un même modèle d'institutionnalisation des âges de la vie. Cet espace social et initiatique partagé n'est donc pas seulement le résultat d'ajustements structurels. Il se fonde, en premier lieu, sur la construction d'une dimension générationnelle et épistémique commune, proche du concept d'« ère » ou d'époque mais aussi de celui d'âge, caractérisée par des formes de savoir, de pensée et des canons esthétiques partagées. Cette « grammaire » chrono-sociale est le fruit d'une œuvre de transmission, d'appropriation et de façonnement de la part d'un groupe intercommunautaire d'individus se percevant comme membres d'une même cohorte tout en faisant partie de populations nominalement différentes. Elle devient au fil du temps leur temporalité initiatique et générationnelle de référence. Pour définir ces espaces chronologiques, initiatiques et institutionnels partagés j'utilise le mot latin « *aetas* », qui recouvre à la fois les notions d'âge, de génération, d'époque et de temps. La différence entre le concept d'*aetas* et celui de méta-système proposée par Schlee réside justement dans la nécessité d'aller au-delà d'une conception purement structurelle des dispositifs d'uniformisation des organisations sociales et d'adopter une perspective cognitive qui prend en compte l'analyse de représentations indivi-

duelles et collectives à la base de la production des catégories générationnelles et institutionnelles.

### La construction esthétique des âges et des générations : les chants comme institutions

Nous savons très peu des mécanismes interactifs qui se déclenchent pour produire l'uniformisation de deux ou plus organisations d'âge. En analysant la diffusion du système d'âges *gada* parmi les populations de langue couchitique, Günter Schlee écrit qu'il est « difficile d'identifier les "rouages" par lesquels un système [d'âges] se prolonge dans un autre (Schlee 1998 : 139, ma traduction) ». Selon son hypothèse, l'observation réciproque serait le seul possible instrument de synchronisation sociale. Dans le même volume *Conflict, Age and Power in North East Africa*, Eisei Kurimoto essaye de donner à cette interrogation une réponse plus articulée à partir de son analyse de la diffusion du système d'âges dit « monyomiji ». Selon la tradition orale des Pari du Soudan du Sud, qu'il reprend dans son chapitre, l'origine de leur organisation sociale doit être recherchée dans un ancien processus d'appropriation musicale :

Lorsqu'un groupe d'hommes Pari alla chasser et arriva dans un village lopit, ils virent les Lopit [une autre population à classes d'âges] danser [divisés] par promotion générationnelle. C'était très attrayant et beau et c'est pourquoi ils ont adopté ce système (Kurimoto 1998 : 49, ma traduction).

Kurimoto en conclue que :

Les chants et les danses d'un peuple sont facilement adoptés par un autre, tant qu'ils sonnent bien et sont à la mode. [...] Tout comme les chants et les danses sont « bons à copier », le système d'âge l'est aussi (*ibid.*, ma traduction).

Le récit sur l'origine du système d'âges des Pari présente certaines similitudes avec le mythe de fondation du peuple Rendille qui m'a été raconté lors de mon séjour dans le village d'Hal Surua :

« Les Rendille viennent du territoire des Somali. Ils étaient des Somali. Les Rendille parlaient la langue somali. Un garçon somali se perdit. Les Samburu le trouvèrent. Le jour où les Samburu le trouvèrent il devint un samburu. Ils lui dirent « perfore-toi [les lobes des] oreilles<sup>13</sup> ».

<sup>12</sup> Les Rendille sont spécialisés dans l'élevage des dromadaires, les Samburu des bovins.

<sup>13</sup> Entretien 04HS2021. Marsabit County, Kenya, juillet 2021.



Selon cette narration, comme dans la précédente, la transition vers un nouveau système social (celui des Samburu) aurait été anticipée par l'intégration d'un attribut esthétique qui émane de ses catégories d'âge. L'ethnogenèse des Rendille décrite dans ce mythe est déclenché par l'acquisition d'une pratique ornementale propre au parcours initiatique des hommes samburu (le percement des lobes). Dans le récit sur l'origine du système sociale des Pari, c'est l'acquisition des chants et des danses des Lopit qui les aurait conduits à intégrer l'organisation d'âges de leurs voisins. Selon cette perspective, l'intégration d'un système musical fondé sur la séparation générationnelle des répertoires pourrait contribuer à l'incorporation des catégories sociales et des identités générationnelles associées aux chants. Kurimoto entrevoit l'existence d'un lien entre assimilation musicale et assimilation sociale chez les populations à classes d'âges d'Afrique de l'Est, mais il n'explique pas la nature de cette connexion (1998). Chez les Rendille nous observons un phénomène comparable à celui décrit par les Pari. Leur acquisition de plus en plus régulière de répertoires générationnels et de statut d'âge d'origine Samburu semble aller de pair avec une accélération du processus d'intégration dans le système social de ces derniers et dans

la création d'une *aetas* partagée. Comme me l'expliquait le Père junior de la promotion Lkishami mentionné au début de cet article « les chants des Samburu et des Rendille sont en train de se mélanger. Ils ne peuvent plus être séparés<sup>14</sup> ». Les Rendille exécutent désormais régulièrement Lkishuroto, un des chants emblématiques du statut des jeunes circoncis et des cérémonies de maturation masculine du système d'âges des Samburu. Ils chantent aussi Lodo, le chant samburu associé au statut d'âge des Pères. Les répertoires des différentes promotions transitent eux aussi de façon désormais systématique des Samburu vers les Rendille qui, comme nous l'avons vu semblent avoir défini-

**“La musique est donc à la fois une émanation et une matérialisation des normes, des temporalités et des pouvoirs associés aux différentes catégories sociales : elle est la structure visible d'un référent social idéal.”**

tivement intégré les catégories générationnelles de leurs voisins. Répertoires comme ceux des Lkulosi (des chants générationnels apparus au cours des 25 dernières années et composés par les Samburu des promotions Lmooli et Lkishami) font à présent partie intégrante du corpus musical des Rendille. « Si on est des jeunes circoncis on chante Lkulosi<sup>15</sup> » a affirmé un jeune Lkishami de Hal Surua lors d'un entretien. Cette observation nous oblige à nous poser la question suivante : pourquoi les jeunes hommes initiés de la communauté rendille doivent être en mesure d'exécuter un chant samburu pour se percevoir pleinement comme des jeunes circoncis et des membres d'une promotion générationnelle spécifique ?

La réponse doit être recherchée dans la nature même des chants et des danses des Samburu. Chaque promotion et chaque statut d'âge est lié à des répertoires musicaux qui leur sont propres et sur lesquels ses membres exercent un droit d'exécution exclusif. Associés de manière étroite à leur groupe d'âge de référence, ces danses et ces chants en deviennent une incarnation chorégraphique et sonore. Exécuter un chant de statut d'âge des jeunes circoncis ou de la promotion Lkishami revient à endosser, à incorporer une identité sociale ou générationnelle spécifique. La

musique est donc à la fois une émanation et une matérialisation des normes, des temporalités et des pouvoirs associés aux différentes catégories sociales : elle est la structure visible

d'un référent social idéal. (Cf. Descola 2021). Des statuts d'âge peuvent, par exemple, être présents dans l'espace rituel de certaines cérémonies d'initiation masculines et féminines seulement sous forme musicale. Dans ce cas, ses membres peuvent être physiquement absents mais leur catégorie sociale – en tant qu'instance normative transcendante agissant dans un régime d'existence conceptuel – est matérialisée par l'exécution d'un des chants ou des danses qui identifient leur statut d'âge. Il n'est donc pas un hasard si parmi nombre

<sup>14</sup> Entretien 04HS2021. Marsabit County, Kenya, juillet 2021.

<sup>15</sup> Entretien 03HS2021. Marsabit County, Kenya, juillet 2021.

de sociétés à classes d'âge, la promotion d'un groupe d'individus dans un nouveau statut est effectuée à l'issue de l'appropriation (ou de la donation de la part des individus déjà initiés) du répertoire de chants et danses ainsi que des ornements corporels qui identifient le statut d'âge en question (Bernardi 1984, Gabail 2011). Les pouvoirs et le statut social associés à ce statut (des notions purement abstraites) sont objectifs, dotés d'une forme maîtrisable et perceptible et transmis aux nouveaux membres en sanctionnant ainsi leur transition vers le nouveau groupe d'âge. L'acquisition d'une nouvelle hexis corporelle, pour citer Bourdieu (2001 [1982]), à travers l'appropriation des schémas kinésiques et des mélodies vocales propres au statut que l'on intègre, est le signe visible (ainsi que la grammaire interactive) de l'intégration d'une nouvelle identité sociale et des nouveaux pouvoirs incarnés sous forme de sons et gestes. Il devient évident alors que l'analyse de la circulation intercommunautaire de répertoires de statut d'âge ou de promotion générationnelle ne peut se limiter à des observations de caractère exclusivement musical, esthétique ou politiques mais doit prendre en compte une dimension ontologique. L'exécution de Lkishuroto ou Lodo<sup>16</sup> marque la mobilisation d'une série de catégories statutaires et l'intégration dans une conception spécifique de l'organisation sociale et de la hiérarchisation des hommes. Chanter Lodo met en évidence l'appartenance d'un groupe d'individus au statut d'âge des Pères. Mais pas n'importe quel type de Pères : des Pères samburu. L'intégration de Lkishuroto (le chant samburu des cérémonies masculines liées au statut des jeunes circoncis) dans le répertoire musical cérémoniel des Rendille entraîne une série d'aménagements sociaux, rituels et linguistiques. Son exécution implique l'acquisition d'une certaine identité statutaire (celle des jeunes circoncis samburu) ainsi qu'une conception spécifique des parcours initiatiques et de l'organisation sociale : les jeunes circoncis junior le chantent lors de leur transition vers l'échelon des jeunes circoncis senior. Ces derniers l'exécutent lors de la cérémonie qui marque leur passage à l'échelon des Anciens junior. Cette succession d'échelons relève du système d'âge samburu et n'existe pas,

<sup>16</sup> Deux chants cérémoniels samburu: le premier appartenant au statut d'âge des jeunes circoncis, le deuxième au statut d'âge des Pères.

en principe, chez les Rendille. De la même façon, exécuter les chants des promotions d'une communauté voisine a inéluctablement des répercussions sur la perception des identités générationnelles locales. Un ancien ariaal, que j'ai interviewé à propos du partage des répertoires générationnels entre Samburu, Ariaal et Rendille, m'expliquait de la sorte la connexion entre circulation musicale et diffusion de catégories générationnelles communes :

« Ici tout le monde a intégré Lkulosi. Nous partageons les mêmes mots [textes chantés]. [...] La même promotion, comme celle de ces garçons, exécute les mêmes chants. Hier les Lkishami exécutaient les mêmes chants [d'une communauté à l'autre]. Les Lkuroro exécutaient eux aussi les mêmes [chants]. Il n'y a pas de génération qui exécute des chansons différentes<sup>17</sup> ».

La diffusion, chez les Rendille, des chants et des ornements créés par les Lkishami samburu produit une standardisation des catégories générationnelles qui légitime la synchronisation intercommunautaire des temporalités initiatiques et l'uniformisation de l'organisation sociale des Rendille à celle des Samburu. Tout simplement, comme l'explique l'ancien ariaal cité ci-haut, si on exécute les mêmes chants générationnels c'est parce qu'on appartient à la même promotion. Mais, dans le cas que nous sommes en train d'examiner, les chants générationnels qui circulent parmi les populations pastorales du Kenya nord-occidental, avec leurs temporalités et la langue de leurs textes, sont le plus souvent ceux des Samburu. Des chants générationnels rendille peuvent se diffuser parmi les samburu, mais cela ne produit ni une acquisition d'attributs structurels propres au système d'âges rendille de la part des samburu, ni un assujettissement linguistique qui impose aux Samburu de chanter en rendille. L'intégration des répertoires musicaux des Samburu de la part de leurs voisins est, au contraire, l'expression du processus d'expansion d'un système social et d'un modèle institutionnel. Les chants jouent un rôle déterminant dans ce dispositif d'intégration culturelle et politique qui semble se développer dans les espaces d'autonomie ouverts par la faible présence du gouvernement central kenyan dans ces territoires semi-désertiques.

<sup>17</sup> Entretien 02Lon2021, Marsabit County, Kenya, 07/2021.



**Figure 2** : Arpeto, l'ancien Ariaal de la promotion Lkuroro avec qui j'ai discuté de la diffusion des chants générationnels samburu dans sa communauté et chez les Rendille. Photo de l'auteur. Marsabit County, Kenya, juillet 2021.

### Un pouvoir symbolique musicalisé (et numérisé)

Dans son livre *In the Meantime. Temporality and Cultural Politics* la théoricienne des media Sarah Sharma écrit :

Les temporalités ne sont pas des temps ; comme des horloges constamment cassées, elles doivent être réinitialisées encore et encore. Elles sont appelées à se recalibrer et à s'intégrer dans un ordre temporel plus large (Sharma 2014 : 7, ma traduction).

La synchronisation du système d'âge rendille avec celui des Samburu, comme tous les processus de coordination sociale et temporelle, ne peut pas se considérer acquise une fois pour toutes. Comme l'indique Sharma, cette coordination se fonde sur un « recalibrage » régulier des temporalités initiatiques qui est mis en place à travers le renouvellement constant d'une perception d'unité générationnelle sur le plan intercommu-

nautaire. Cette uniformité institutionnelle et statutaire est reproduite au fil du temps par le partage d'un corpus d'objets et de musiques à valeur générationnelle qui rayonnent à partir d'un centre politico-culturel bien défini : la communauté samburu. La circulation des styles ornementaux, des chants et des danses des Samburu permet à leur système institutionnel de se diffuser et d'être incorporé par des populations proches. Ce pouvoir esthétique se traduit en une hégémonie politique, économique et linguistique. Partager ces artefacts esthétiques avec les Samburu revient à partager avec eux la même conception de l'organisation sociale et des classements des individus. De ce point de vue le pouvoir esthétique des Samburu est en réalité une forme très subtile de pouvoir symbolique, au sens que Pierre Bourdieu donne à cette expression (2001 [1982]). L'acquisition de musiques, danses et objets d'origine samburu conduit l'affirmation de pratiques perçues comme légitimes (surtout



**Figure 3** : Un groupe de jeunes hommes circoncis Samburu exécutent *Lkukorr*, un chant-danse désormais répandu chez les Rendille. Photo par l'auteur. Samburu County, Kenya, avril 2013.

en domaine rituel) et l'existence d'une langue hégémonique indispensable dans la vie cérémonielle et politique des communautés concernées (le samburu). Les Ariaal, des Rendille de langue samburu (comme eux-mêmes se définissent), affirment de ne pas comprendre parfaitement le samburu même si c'est leur langue principale. La perception d'un manque de compétence dans ce domaine établit un lien de dépendance indissoluble avec les Samburu et institue une hiérarchie entre communautés : si les Ariaal ne maîtrisent pas complètement leur propre langue ils ne peuvent pas non plus exercer un contrôle effectif sur leurs activités rituelles et musicales ainsi que sur la reproduction de leur système social. A ce propos Bourdieu écrit :

L'intégration dans une même « communauté linguistique », qui est un produit de la domination politique sans cesse reproduit par des institutions capables d'imposer la reconnaissance universelle de la langue dominante, est la condition de l'instauration de rapports de domination linguistique (2001 [1982] : 71).

Un discours semblable peut être fait pour les Rendille. Les membres des promotions les plus récentes parlent tous un bon samburu même s'ils

ne sont pas complètement bilingues (dans ce cas il ne s'agit pas d'une perception biaisée comme pour les Ariaal, qui sont complètement samburophones). Dans leur cas aussi, le processus d'appropriation du système rituel, des répertoires musicaux et de l'organisation générationnelle des Samburu les place d'emblée dans une position subordonnée vis-à-vis de leurs voisins : la production esthétique des promotions générationnelles, l'organisation cérémonielle et le fonctionnement de leur organisation sociale n'est pas tout à fait sous leur contrôle. Même les noms de leurs générations sont désormais conçus ailleurs et ont des significations qui sont compréhensibles seulement à ceux qui parlent samburu<sup>18</sup>.

Ce processus de transmission de catégories institutionnelles et générationnelles samburu sous forme d'objets et de diffusion de la langue samburu par le partage de répertoires musicaux chantés et de pratiques rituelles est, de nos jours,

<sup>18</sup> Lkishami en samburu signifie « ceux qui sont aimés », Lkisieku « ceux qui sont pressés », juste pour citer les deux promotions les plus récentes, qui ont exactement les mêmes noms chez les Samburu et chez les Rendille.

amplifié par les technologies de communication numérique. Les téléphones portables, désormais omniprésents au nord du Kenya, permettent d'échanger instantanément des enregistrements audio/vidéo de chants et danses et des images d'ornements générationnels par Bluetooth ou carte mémoire. La capacité de diffusion de ces media en dehors du contexte samburu dans lequel elles trouvent leur origine est ainsi augmentée de manière spectaculaire au cours des quinze dernières années. Un ancien junior rendille s'exprimait de la sorte à ce propos :

[Avec les téléphones portables] quand quelqu'un trouve une chanson, quelqu'un d'autre la trouve là-bas, et l'apprentissage de la langue devient rapide<sup>19</sup>.

L'usage généralisé des téléphones portables et la circulation à l'échelle régionale d'enregistrements de chants et danses des Samburu est en train de consolider l'influence de ces derniers et de leur système d'âges sur les populations qui les entourent. Par ailleurs, ce phénomène concerne tant les secteurs pastoraux de ces communautés que les personnes scolarisées. Les chanteurs de musique pop et rap en langue samburu sont devenus des véritables célébrités et leurs succès atteignent désormais chaque coin du Kenya septentrional grâce surtout aux chaînes radio et à la circulation numérisée de leurs vidéos musicales d'un téléphone portable à l'autre. Tout en se situant en dehors du système de composition musicale coutumier, ils/elles contribuent de manière décisive à renouveler et à renforcer l'influence des Samburu au niveau régional. La diffusion numérique de ces musiques, tout comme des chants dits « traditionnels », est vraisemblablement à l'origine de l'accélération du processus de « samburisation » que nous observons chez les Rendille. L'affirmation intercommunautaire des identités générationnelles, du système institutionnel et des pratiques esthétiques et cérémonielles des Samburu apparaît irréversible. Ce phénomène semble aujourd'hui se consolider à travers l'usage de plus en plus répandu des téléphones portables. Ceux-ci ont accentué la capacité des jeunes hommes circoncis samburu et rendille de se reconnaître comme membres d'une cohorte intercommunautaire qui

partage la même identité historique, le même parcours initiatique et les mêmes codes esthétiques générationnels. Pour reprendre les mots d'un jeune Père rendille de Hal Surua. « Quand tu entends une chanson sur une carte mémoire ou sur un téléphone portable, tu sais que ces chansons appartiennent aux Lkishami<sup>20</sup> ».

## Conclusion

La perception de l'appartenance à une même *aetas* est non pas une conséquence mais un prérequis à la coordination des cérémonies de maturation masculines et des systèmes d'âges des peuples pastoraux d'Afrique de l'Est. C'est vraisemblablement la fabrication de cette temporalité partagée, de ce territoire conceptuel fondé sur des attributs esthétiques générationnels intercommunautaire (danses, chants, ornements et styles de décoration corporelle) qui contribue à bâtir les prémisses cognitives permettant aux hommes Rendille de se percevoir comme des « coevals » des Samburu (Fabian 1984). A présent ce processus est favorisé par le partage numérique de répertoires musico-chorégraphiques. Pour exécuter des chants de promotion générationnelle et de statut d'âge il faut intégrer la langue de ceux qui les ont composés et s'adapter à un certain système de classification des individus. Les membres de la communauté rendille ne peuvent pas se limiter à importer un système initiatique et politique allochtone : ils doivent d'abord *être* Lkishami, ils doivent *être* jeunes circoncis au sens samburu du terme. La pratique musicale et esthétique permet cette identification.

Comme nous l'avons dit en début de cet article, le phénomène d'uniformisation institutionnelle que nous sommes en train d'examiner n'est pas symétrique mais voit les Samburu occuper une position dominante. L'intégration volontaire, de la part de communautés comme les Rendille, de l'organisation sociale et des catégories générationnelles des Samburu permet à ces derniers d'élargir leur sphère d'influence et les frontières de leurs interactions économiques. Concrètement, ce dispositif d'expansion culturelle (qui, je le répète, n'est pas imposé mais est reproduit par les communautés-mêmes qui « subissent » cette forme de pouvoir symbolique) permet aux Samburu d'exercer une domination territoriale non-

<sup>19</sup> Entretien 04HS2021. Marsabit County, Kenya, 07/2021.

<sup>20</sup> Entretien 04HS2021. Marsabit County, Kenya, juillet 2021.

violente qui leur garanti un accès constant à des terres de pâturage en dehors des frontières de leur communauté et de bénéficier des compétences économiques de leurs partners pastoraux. De leur côté les Rendille jouissent à leur tour du droit d'effectuer leurs transhumances dans les terres de Samburu et bénéficient de la protection militaire de ces derniers en relation avec les raids de bétail de leurs ennemis communs. La circulation de chants qui incarnent des institutions et des générations - hier exclusivement par contacte directe, à présent à travers les réseaux numériques dessinés par les téléphones portables - fait partie intégrante de ce dispositif d'exercice indirecte du pouvoir. En commentant le travail d'Harold Innis sur les théories des communications, Sarah Sharma écrit :

Les médias de liaison spatiale [space-binding media], du papyrus à la radio, sont légers et peuvent être facilement diffusés, favorisant ainsi la centralisation du pouvoir [...] Les civilisations organisées en termes d'espace vont spatialiser le temps. Le temps devient une ressource, un produit et une séquence d'événements qui peuvent être gérés et contrôlés (Sharma 2014 : 12, ma traduction).

La dissémination numérique par téléphone portable des musiques de promotion et de statut d'âge d'origine samburu conduit à une spatialisation du temps qui impose un même rythme social aux alternances générationnelles et initiatiques des communautés impliquées dans ce processus d'uniformisation. La « centralisation du pouvoir » autour d'un seul système d'âge et la création d'une *aetas* partagée qui en résulte sont des instruments cruciaux de survie que les populations pastorales ont élaborés depuis longtemps pour faire face aux difficultés de leur temps (Shetler 2003). Aujourd'hui les défis que ces communautés sont en train d'affronter dépassent toute expérience qu'elles ont pu hériter du passé : le réchauffement climatique consume leurs terres de pâturage et leurs sources d'eau ; la diffusion des armes automatiques a rendu l'élevage de bétail une activité immensément plus dangereuse qu'auparavant (Marmone 2017). Pourtant, malgré ces changements majeurs dans le style de vie des populations pastorales d'Afrique de l'Est, la synchronisation des systèmes d'âges et l'uniformisation des identités générationnelles autour d'un modèle commun semblent,

aujourd'hui comme dans le passé, la solution la plus efficace pour gérer les transformations du présent et pour transmettre le rythme des institutions d'âge aux générations futures.

## Remerciements

La recherche qui a conduit à la rédaction de cet article n'aurait jamais pu être menée à terme sans le financement de la Fondation Fyssen et l'encadrement scientifique du Department of Afro-american and African Studies (DAAS) de l'University of Michigan. Je veux aussi remercier la Professeure Kelly Askew pour sa supervision et son soutien dans une période extrêmement difficile pour la recherche académique.

## Bibliographie

- Baxter, P. T. W., 1979, "Boran Age-Sets and Warfare", in Katsuyoshi Fukui & David Turton (eds.), *Warfare Among East African Herders*, Senri Ethnological Studies, N. 3, Osaka, National Museum of Ethnology, pp. 69-95.
- Bernardi, B., 1985, *Age Class Systems: Social Institutions and Politics Based on Age*, Cambridge, Cambridge University Press.
- Bourdieu, P., 2001 [1982], *Langage et pouvoir symbolique*, Paris, Éditions du Seuil. (Version en anglais : 1991, *Language and Symbolic Power*, Cambridge, Polity Press.)
- Descola, P., 2021, *Les Formes du visible*, Paris, Éditions du Seuil.
- Fabian, J., 1983, *Time and the Other. How Anthropology makes its Object*, New York, Columbia University Press.
- Gabail, L., 2011, « Comment dansent les institutions : Classes d'âge et rapports de sexe chez les Bassari de Guinée », *Journal des africanistes*, Varia, 81-1, pp. 9-33.
- Kurimoto, E., 1998, "Resonance of Age-Systems in Southeastern Sudan", in Eisei Kurimoto & Simon Simonse (eds.), *Conflict, Age & Power in North East Africa*, Oxford, James Currey, pp. 29-50.
- Marmone, G. 2017a, *Danser et chanter un système d'âge. Anthropologie musicale des Samburu (Kenya)*, Thèse de doctorat, Université Paris Nanterre.
- 2017b, "War and predatory economy in Northern Kenya: How ethnomusicology can explore social change", *Cahiers d'Histoire*,

Volume XXXIV, N° 1, Printemps 2017, pp. 157-186.

- 2021 « Temporalités rivales et panne rituelle. Anatomie de l'échec d'une grande cérémonie masculine chez les Samburu (Kenya) », *L'Homme*, n° 237 (janvier-mars), 2021, pp. 15-44.

- Schlee, G., 1998, "Gada Systems on the Meta-Ethnic Level: Gabbra/Boran/Garre Interactions in the Kenyan/Ethiopian Borderland" in Eisei Kurimoto & Simon Simonse (eds.), *Conflict, Age & Power in North East Africa*, Oxford, James Currey, pp. 121-145.

- Sharma, S., 2014, *In the Meantime: Temporality and Cultural Politics*, Durham, Duke University Press.

- Shetler, J., 2003, "Interpreting Rupture in Oral Memory: The Regional Context for Changes in Western Serengeti Age Organisation (1850-1895)", *The Journal of African History*, Vol. 44, Issue 03, pp. 385-412.

- Spencer, P., 1973, *Nomads in Alliance. Symbiosis and Growth Among the Rendille and Samburu of Kenya*, London, Oxford University Press.

“ The Samburu language is entering among us. The Samburu culture [...]. We are going in that direction. We sing in Samburu. There is no rendille language. [...] Now the Samburu language has arrived, it entered among us and we all understand [it]. What has arrived [among us]? The songs of the Samburu<sup>21</sup>”.

Marsabit County, one of the driest regions in Kenya. A hot July afternoon in the small village of Hal Surua, a few kilometres from Korr. Not a sound, not a voice. The whole community seems to have vanished. The young circumcised men<sup>22</sup> and unmarried girls have left with their families' dromedaries to reach the seasonal camps in the grazing territories. Elders, married women and

children remained with a few goats and sheep, but apparently the heat has laid a veil of silence over both humans and animals. In my hut, a Rendille junior elder of about thirty-five answers in Samburu a series of questions I ask him about the relations with their neighbours and allies. There is a sense of resignation in his words, a sense of helplessness, in the face of an irresistible process that he contributed to reproduce. Everyone loves the songs of the Samburu in northwestern Kenya. Except for, perhaps, the Turkana, who are their sworn enemies. But almost all other pastoral and agropastoral communities in this part of the country have adopted the Samburu musical repertoires and language in whole or in part. Rendille, Ariaal, El Molo, Ndorobo. The songs of their more famous and numerous neighbours, the Samburu, are now part of their daily life, both in formal (ceremonies, initiations, etc.) and informal situations. With each performance, with each ritual accompanied by these repertoires, these populations come closer to a Samburu identity that seems to dominate this part of Kenya.

The junior elder I am talking to cannot remember the Rendille name of the age-set (the generational group) he belongs to. He identifies completely with the Samburu generational system. "I am a Lkishami," he tells me. This is the name of the age-set opened in 2005 among the Samburu<sup>23</sup> and about two years later among the Rendille. "What is the Rendille name of your age-set?" I ask him. "I have heard it but I have forgotten it". The senior elder sitting next to him also identifies himself with a Samburu age-set. He is a Lkuroro<sup>24</sup> but he also remembers the name of his Rendille generational group ("Difkuto<sup>25</sup>"). However, he does not know the name of the Lkishami age-set in Rendille language. My field assistant asks him:

<sup>21</sup> Recorded interview 04HS2021. Marsabit County, Kenya, 07/2021.

<sup>22</sup> The members of this age-grade are often referred to as "warriors", even in scientific literature. The term "warriors" can be misleading as the main occupation of these young people is not conflict but the care of livestock. It should be noted, however, that cattle raiding is still very common in this part of Kenya and the young circumcised men are at the forefront of this activity.

<sup>23</sup> This Samburu age-set was "closed" in 2019. This means that it can no longer receive new recruits and its members transitioned to the Fathers' age-grade. Among the Rendille, this age-set was closed in early 2021.

<sup>24</sup> Age-set opened in 1976 and closed in 1990 among the Samburu. About two years later among the Rendille.

<sup>25</sup> As we will see later in this paper, according to Kurimoto (1998), this age-set name does not correspond to the Lkuroro age-set. Based on the research of the Japanese anthropologist, this name would rather be related to the previous Samburu age-set, Lkishili.



**Figure 1:** Evening view of the village of Hal Surua. Photo by the author. Marsabit County, Kenya, July 2021.

Q: “In the past [elders] taught [young people] the names of the age-sets. In the case of the Lkishami no one [did so]?”

A: “They were told that too! There is no one who is not taught the name of his generation.”

Q: “They don’t want [a Rendille age-set name]?”

A: “It’s not that they don’t want it.”

The junior elder of the Lkishami age-set speaks again:

“Now that we are entering the Samburu language, we are killing the Rendille culture.”

The considerations of these two men show that the acquisition and assimilation of generational names from an external community are not, in this case, exclusively linguistic phenomena, even though the spoken and sung language seems to play a crucial role in this process of uniformization of social systems. Generational names always circulated widely among pastoral and agropastoral populations in East Africa, especially in pre-colonial times. However, in this case we are dealing with a different process. The younger members of the Rendille community are not only forgetting the names of their age-sets in their own language. They are integrating new generational categories and a new ontogenetic path based on an allochthonous social organisation: in this case, that of their Samburu neigh-

bours. The synchronisation of the Rendille’s initiatory temporalities with those of the Samburu is not recent (Spencer 1973), but it is only in the last three decades that this generational unification process has begun to take on the magnitude that we can observe today. However, this is not an egalitarian relationship. The Rendille are well aware of the gradual penetration into their community of the *lkerreti*, the “culture”, of their neighbours. Yet they have no intention of putting a stop to these daily linguistic, ritual and musical practices that bring them closer and closer to the age and generation system of the Samburu. How are these asymmetrical political relations established, perpetuated and reinforced?

Using the example of the Samburu and Rendille pastoralists in Kenya, we will look at how the construction of shared cross-community social systems and generational temporalities<sup>26</sup> can be enacted by the circulation of aesthetic artefacts

<sup>26</sup> The notion of “generational temporality” designates here the maturation journey of individuals who share approximately the same age, from the recruitment into an age-set to the access to the Fathers’ age-grade. This phase corresponds roughly to the “warriorhood” period, when the members of an age-set are young circumcised men. This phase may be synchronised across several communities. Members of these synchronous age-sets may (or may not) perceive themselves as part of the same cohort, the same cross-community generational group.



associated with institutional categories. I argue that the linguistic and musical integration evoked by my interlocutors is the manifestation of a symbolic power exercised through the transmission of objects and songs that embody a specific conception of social rankings. In recent years, these processes of cultural homogenisation have become increasingly dependent on the use of digital communication technologies that extend the political influence of certain pastoral communities by establishing new modalities of proximity and interaction.

### **Aetas: a shared generational era**

Samburu and Rendille speak two different languages that belong to two distant families: the former are speakers of a *maa* language of the Nilo-Saharan family; the latter speak a language of Cushitic origin close to Somali. As is the case for many pastoral populations in East Africa, their social systems are characterised by the presence of a series of age classes that ranks individuals on the basis of their membership of a particular age-set and age-grade. Among the Samburu, following circumcision at around 13-20 years of age, young men join an age-set, i.e. a generational group, composed of individuals of approximately the same age. The members of an age-set are integrated - in the course of their lives and all together - in a sequential series of age-grades: from that of the young circumcised men to the final grade of the Senior Fathers<sup>27</sup>. Every fourteen years or so, the Samburu open a new age-set to which they give a distinctive name (Marmone 2021).

The age system of the Rendille has points in common with the Samburu social organisation (namely, three age-grades: uncircumcised boys, young circumcised men, Fathers or elders and the opening of a new age-set every fourteen years) but also with the *Gada* system of Cushitic-speaking peoples such as the Borana. Indeed, unlike the Samburu system, the generational organisation of the Rendille is genealogical. This means that men are recruited into a particular age-set on the basis of their father's generational

position (Baxter 1979)<sup>28</sup>. Young men must join an age-set that is three age-sets away from the father's and six from the grandfather's<sup>29</sup>. This fixity in generational recruitment produces some incongruities. The younger children of an older man often find themselves joining a generational group whose members are all much older than they are, and have already performed the bulk of their age-grade ceremonies<sup>30</sup>. These boys may then change their age-set to join a group of men who are closer in age to them (Spencer 1973). For the Samburu, on the other hand, generational recruitment is more flexible but changing age-sets is categorically forbidden. Moreover, the Rendille have (or should we say "had"?) their own generational organisation, composed of age-sets with cyclically recurring names (while the names of the Samburu age-sets are always different from the previous ones). The table below shows the names of the last seven samburu and rendille age-sets, those that constitute, in the case of the Rendille in particular, an entire generational lineage (the Libale are the fathers of the Irbangudo and the grandfathers of the Lkisiyeku. The Irbangudo are the fathers of the Lkisiyeku):

#### **Samburu Age-Sets**

Lmekuri (1936)  
Lkimaniki (1948)  
Lkishili (1963)  
Lkuroro (1976)  
Lmooli (1990)  
Lkishami (2005)  
Lkisiyeku (2019)

#### **Rendille Age-Sets**

Libale (1937)  
Irbandif (1951)  
Difgudo (1965)  
Irbangudo (1979)  
Dibgudo - Ilmoili (1993)<sup>31</sup>  
Lkishami (2007)  
Lkisiyeku (2021-22)

This list clearly shows the evolution of the Rendille generational system in relation to its Samburu counterpart. If it is true that the opening of new age-sets among the Rendille has been coordinated with that of the Samburu for a long

<sup>28</sup> In the Samburu age system, boys are recruited into the newly formed age-set (which is the only one open to recruitment) regardless of the father's age-set.

<sup>29</sup> If the age-set of the grandfather is "A", then the age set of the father will be "D" and that of the son "G". The generational succession is then A-D-G (A-b-c-D-e-f-G). Men recruited in the age-set "B" will initiate their children in the age-set "E" while their grandsons will be in the age-set "H", and so on.

<sup>30</sup> A phenomenon called under-aging, quite common in East African age systems, especially in *Gada* systems (Schlee 1998).

<sup>31</sup> Kurimoto 1998.

<sup>27</sup> When the term "Father/Fathers" is indicated with a capital letter, it refers to the members of the elders' age-grade. When it is indicated with a lower case letter, it refers to the father-son kinship relationship.

time, we should also note that this coordination has turned into an almost complete identification over the last fifteen years. This is a process that began gradually with the Lmooli/Dibgudo age-set but has been fully established with the Lkishami.

The Samburu age system has thus become what Günter Schlee calls a “meta-system” (1998), an age system that includes several communities, sometimes with different languages and economic systems, such as the Samburu and the Rendille<sup>32</sup>. According to Eisei Kurimoto, this phenomenon most often develops as a “reverberation” of a certain conception of generational and age-grade articulations from an identifiable centre of influence or from a process of shared collective construction (1998). The communities that gather around these age meta-systems progressively develop the perception of belonging to the same generational categories and to the same model of institutionalisation of life’s cycles. This shared initiatory and social space is therefore not only the result of structural adjustments. It is based, in the first place, on the construction of a common generational temporality, close to the concept of “era” or “epoch” and characterised by shared forms of knowledge, thought and aesthetic canons. This chrono-social complex is the result of a transmission, appropriation and shaping process led by a cross-community group of individuals who perceive themselves as members of the same cohort while belonging to different populations. Over time, it becomes their generational temporality of reference. To define these shared chronological, initiatory and institutional spaces I use the Latin word *aetas*, which covers the notions of age, generation, era and time. The difference between the concept of *aetas* and that of “meta-system” proposed by Schlee lies precisely in the need to go beyond a purely structural conception of the mechanisms enabling the homogenization of two or more social organisations. My intention here is to adopt a cognitive perspective that takes into account the analysis of individual and collective representations at the basis of the production of shared generational and institutional categories.

<sup>32</sup> The Rendille are specialised in raising dromedaries, the Samburu in raising cattle.

### The aesthetic construction of ages and generations: songs as institutions

We know very little about the social instruments that are activated to produce the homogenization of two or more age organisations. Analysing the diffusion of the *Gada* age system among Cushitic-speaking populations, Günter Schlee writes that “it is difficult to identify the ‘cogs’ by which one system extends into another” (Schlee 1998: 139). According to his hypothesis, reciprocal observation is the only possible instrument of social synchronisation. In the same volume *Conflict, Age and Power in North East Africa*, Eisei Kurimoto tries to give a more articulate answer to this question based on his analysis of the diffusion of the so-called *monyomiji* age system. According to the oral tradition of the Pari of South Sudan, which he takes up in his chapter, the origin of their social organisation must be sought in an ancient process of musical appropriation:

When a group of Pari men went hunting and came to a Lopit village, they saw Lopit dancing by age-sets. This was very attractive and beautiful and is why they adopted the system (Kurimoto 1998: 49).

Kurimoto concludes that:

The songs and dances of one people are easily adopted by another, as long as they sound good and are fashionable. [...] Just as songs and dances are ‘good to be copied’, so is the age system (*ibid.*).

The story of the origin of the Pari age system bears some similarities with the founding myth of the Rendille people that was related to me during my stay in the village of Hal Surua:

“The Rendille come from the Somali territory. They were Somali. The Rendille spoke the Somali language. A Somali boy got lost. The Samburu found him. The day the Samburu found him he became a Samburu. They said to him ‘pierce your earlobes’<sup>33</sup>”.

According to this account, like in the previous one, the transition to a new social system (that of the Samburu in this case) is anticipated by the integration of an aesthetic attribute that emanates from its age categories. The ethnogenesis of the Rendille people, as described in this myth,

<sup>33</sup> Recorded interview 04HS2021. Marsabit County, Kenya, July 2021.

is enacted by the acquisition of an ornamental practice specific to the Samburu men's initiatory path (the lobe piercing). In the account of the origin of the Pari social system, it is the acquisition of the songs and dances of the Lopit that has led them to integrate the age organisation of their neighbours. According to this perspective, the integration of a musical system based on an age-set partition of repertoires produced, among the Pari, the incorporation of the social categories and generational identities conveyed by the songs. Kurimoto sees a relationship between musical and social homogenization among East African age-group populations, but he does not explain the nature of this connection (1998). Among the Rendille we observe a phenomenon comparable enough to what Kurimoto describes among the South-Soudanese communities with whom he conducted his research. Their increasingly regular acquisition of age-set and age-grade repertoires from the Samburu seems to go hand in hand with an accelerated process of integration into the social system of the latter and the creation of a shared *aetas*. As the Junior Father of the Lkishami age-set mentioned at the beginning of this article explained to me, "the songs of the Samburu and the Rendille are mixing. They can no longer be separated<sup>34</sup>". Nowadays, the Rendille regularly sing Lkishuroto, one of the emblematic songs of the young circumcised men's age-grade, performed during cattle raids and male maturation ceremonies of the Samburu age system. They also sing Lodo, the Samburu song associated with the Father's age-grade. The repertoires of the newer age-sets now systematically flow from the Samburu to the Rendille who, as we have seen, seem to have ultimately integrated the generational categories of their neighbours. Lkulosi-generational songs that have emerged in the last 25 years and were composed by the Samburu Lmooli and Lkishami age-sets - are now an inte-

gral part of the Rendille musical repertoire. As a Rendille man from the Lkishami age-set stated "if you are a young circumcised man, you sing Lkulosi<sup>35</sup>". This observation begs the question of why young initiated men from the Rendille community need to be able to perform a Samburu song in order to fully perceive themselves as members of their own age-set.

The answer must be sought in the very nature of Samburu songs and dances. Each age-grade and age-set is associated with a specific musical repertoire, over which its members have exclusive performance rights. Closely identified with their respective age-group, these dances and songs become a choreographic and sonic manifestation of it. Performing a song of the young circumcised men's age-grade or the Lkishami age-set means embodying a specific social or generational identity. Music is thus both an emanation and a materialisation of the norms, temporalities and powers associated with different social categories: it is the visible structure of an ideal social referent. (Cf. Descola 2021). Age-grades may, for example, be present in the ritual space of certain male initiation ceremonies only

**"Music is thus both an emanation and a materialisation of the norms, temporalities and powers associated with different social categories: it is the visible structure of an ideal social referent."**

in musical form. In this case, its members may be physically absent but their social category - as a transcendent normative instance acting in a conceptual regime of existence - is

materialised by the performance of one of the songs or dances that identify their age-grade (Marmone 2017a). It is, therefore, no coincidence that in many age-class societies, the promotion of a group of individuals into a new age-grade is effected through the appropriation (or donation by those already initiated) of the repertoire of songs and dances and bodily ornaments that identify the age-grade in question (Bernardi 1985, Gabail 2011). The powers and social status associated with this age-grade (purely abstract notions) are objectified, given a controllable and perceptible form and transmitted to the new members,

<sup>34</sup> Recorded interview 04HS2021. Marsabit County, Kenya, July 2021.

<sup>35</sup> Recorded interview 03HS2021. Marsabit County, Kenya, July 2021.

thus sanctioning their transition to the new age-group. The acquisition of a new bodily hexis, to quote Pierre Bourdieu (1991 [1982]), through the appropriation of the kinesic patterns and vocal melodies specific to the age-grade one is joining, is the visible sign of the incorporation of a new social identity and new powers “materialized” as sounds and gestures. It becomes clear then that the analysis of cross-community circulation of age-grade or age-set musical repertoires cannot be limited to musical, aesthetic or political considerations but must take into account an ontological dimension. The performance of Lkishuroto or Lodo<sup>36</sup> marks the mobilisation of a series of age categories and the integration into a specific conception of social organisation. Singing Lodo highlights the membership of a group of men in the Fathers’ age-grade. But not just any kind of Fathers: Samburu Fathers. The integration of Lkishuroto (the samburu song of the male ceremonies associated with the young circumcised men’s age-grade) into the ceremonial musical repertoire of the Rendille involves a series of social, ritual and linguistic adjustments. Its performance implies the acquisition of a certain age-grade identity (that of the Samburu young circumcised men) as well as a specific conception of the initiation process and social organization: junior young circumcised men must sing it as they transition to the senior young circumcised men’s echelon. The latter perform it during the ceremony that marks their passage to the junior elders’ echelon. This succession of echelons is part of the Samburu age system and does not exist, in principle, among the Rendille. Similarly, performing the age-set songs of a neighbouring community inevitably has repercussions on the perception of local generational identities. An Ariaal elder, whom I interviewed about the sharing of generational repertoires between Samburu, Ariaal and Rendille, explained the connection between musical circulation and the dissemination of common age-set categories in this way:

“Everyone here has integrated Lkulosi. We share the same words [sung texts]. [...] The same age-set, like these boys, perform the same songs.

<sup>36</sup> Two Samburu age-grade and ceremonial songs: the first belonging to the young circumcised men’s age-grade, the second to the Fathers’ age-grade.

Yesterday the Lkishami performed the same songs [from one community to another]. The Lkuroro also performed the same [songs]. There is no generation that performs different songs.<sup>37</sup>”

The spread of the songs and ornaments created by the Samburu Lkishami among the Rendille produces a standardisation of generational categories that legitimises a cross-community synchronisation of initiatory temporalities and, consequently, the homogenisation of the social organisation of the Rendille to that of the Samburu. Quite simply, as the Ariaal elder quoted above explained, if people perform the same generational songs, it is because they belong to the same age-set. But in the case we are examining, the generational songs that circulate among the pastoral populations of north-western Kenya, with their temporalities and the language of their lyrics, are most often composed by the Samburu. Generational rendille songs may spread among the Samburu, but this happens in such a sporadic and territorially limited manner that it does not generate an acquisition of structural attributes specific to the rendille age system, nor does it produce a linguistic constraint that requires the Samburu to sing in rendille. The integration of Samburu musical repertoires by their neighbours is, on the contrary, an expression of the expansion of a social system and an institutional model. Songs play a decisive role in this cultural and political integration device that seems to develop in the spaces of autonomy opened up by the limited presence of the Kenyan central government in these semi-desert territories.

### **A musicalized (and digitised) symbolic power**

In her book *In the Meantime. Temporality and Cultural Politics* the media theorist Sarah Sharma writes:

Temporalities are not times; like continually broken clocks, they must be reset again and again. They are expected to recalibrate and fit into a larger temporal order (Sharma 2014: 7).

The synchronisation of the Rendille age system with that of the Samburu, like all processes of social and temporal coordination, cannot be taken for granted. As Sharma points out, this

<sup>37</sup> Recorded interview 02Lon2021, Marsabit County, Kenya, July 2021.



**Figure 2:** Arpeto, the Ariaal elder from the Lkuroro age-set with whom I discussed the spread of Samburu generational songs in his community and among the Rendille. Photo by the author. Marsabit County, Kenya, July 2021.

coordination is based on a regular “recalibration” of initiatory temporalities that is achieved through the constant renewal of a perceived generational unity at the cross-community level. This institutional and statutory uniformity is reproduced over time through the sharing of a corpus of objects and music of generational value that radiate from a well-defined political and cultural centre: the Samburu community. The circulation of Samburu ornamental styles, songs and dances allows their institutional system to spread and be incorporated by neighbouring populations. This aesthetic power translates into political, economic and linguistic hegemony. To share these aesthetic artefacts with the Samburu is to share with them the same conception of social organisation and the categorisation of individuals. From this point of view, the aesthetic power of the Samburu is in fact a very subtle form of symbolic power, in the sense that Pierre Bourdieu gives to this expression (1991 [1982]). The acquisition of music, dance and objects of Sam-

buru origin leads to the affirmation of practices perceived as legitimate (especially in the ritual domain) and the existence of a hegemonic language that is indispensable in the ceremonial and political life of the communities concerned (the Samburu language). The Ariaal, Samburu-speaking Rendille (as they define themselves), claim not to fully understand Samburu even though it is their main language. The perception of a lack of competence in this domain establishes an indissoluble bond of dependence with the Samburu and institutes a hierarchy between communities: if the Ariaal do not have complete mastery of their own language they cannot exercise an effective control over their ritual and musical activities and the reproduction of their social system. As Bourdieu put it:

Integration into a single ‘linguistic community’, which is a product of the political domination that is endlessly reproduced by institutions capable of imposing universal recognition of the



**Figure 3:** A group of young circumcised Samburu men perform Lkukorr, a song/dance now widespread among the Rendille. Photo by the author. Samburu County, Kenya, April 2013.

dominant language, is the condition for the establishment of relations of linguistic domination (1991: 46).

A similar argument can be made for the Rendille. The members of the more recent age-sets all speak good Samburu even if they are not completely bilingual (here it is not a matter of biased perception as in the case of the Ariaal, who are completely Samburophone). In their case too, the process of appropriation of the Samburu ritual system, musical repertoires and generational organisation places them in a subordinate position vis-à-vis their neighbours: the age-set aesthetic production, the ceremonial organisation and the functioning of their social organisation is not entirely under their control. Even the names of their age-sets are conceived elsewhere and have meanings that are understandable only to those who speak Samburu<sup>38</sup>.

<sup>38</sup> Lkishami in Samburu means “those who are loved”, Lkisieku “those who are in a hurry”, just to mention the two most recent age-sets, which have exactly the same names among the Samburu and the Rendille.

This process of transmitting Samburu institutional and generational categories in the form of objects and disseminating the Samburu language through the sharing of sung musical repertoires and ritual practices is nowadays amplified by digital communication technologies. Mobile phones, ubiquitous in northern Kenya, enable instantaneous exchange of audio/video recordings of songs and dances and images of generational ornaments via Bluetooth or memory card. The spread of these media outside the Samburu context in which they originated has increased dramatically over the past fifteen years. According to a Rendille junior Father:

“[With mobile phones] when someone finds a song, someone else finds it there, and learning the language becomes fast.<sup>39</sup>”

The widespread use of mobile phones and the regional circulation of recordings of Samburu songs and dances is consolidating the influence of the Samburu and their age system on the populations around them. This phenomenon affects

<sup>39</sup> Recorded interview 04HS2021. Marsabit County, Kenya, July 2021.

both the pastoral sectors of these communities and the educated ones. Pop and rap Samburu singers have become celebrities and their successes reach every corner of northern Kenya thanks mainly to radio stations and the digital circulation of their music videos from one mobile phone to another. Although they are outside the customary music composition system, they contribute crucially to renewing and strengthening the influence of the Samburu at regional level. The digital dissemination of this music, as well as of the so-called “traditional” songs, is probably at the origin of the acceleration of the “samburisation” process that we observe among the Rendille. The cross-community affirmation of generational identities, institutional systems, and aesthetic and ceremonial practices of the Samburu appears irreversible. This phenomenon seems to be reinforced today by the increasingly widespread use of mobile phones. The use of these digital devices has accentuated the ability of young circumcised Samburu and Rendille men to recognise themselves as members of a cross-community cohort that shares the same historical identity, the same initiatory path and the same generational aesthetic codes. In the words a Rendille young Father I interviewed in Hal Surua, “When you hear a song on a memory card or on a mobile phone, you know that these songs belong to the Lkishami<sup>40</sup>”.

## Conclusion

The perception of belonging to the same *aetas* is not a consequence but rather a prerequisite for the coordination of the male maturation ceremonies and age systems among pastoral populations in East Africa. It is presumably the construction of this shared temporality, this conceptual space based on cross-community generational aesthetic attributes (dances, songs, ornaments and styles of body decoration) that helps to build the cognitive premises that allow Rendille men to perceive themselves as “coevals” of the Samburu (Fabian 1984). It is not surprising to note that the sharing of musico-choreographic repertoires is at the origin of this process. In order to perform songs belonging to specific age-sets and age-grades, it is necessary to integrate the language

of those who composed them and to adapt to a certain system of categorisation of individuals. The members of the Rendille community cannot simply import an allochthonous initiatory and political system: they must first *be* Lkishami, they must *be* young circumcised men in the Samburu sense of the term. Musical and aesthetic practice allows this identification.

As mentioned at the beginning of this article, the phenomenon of institutional homogenisation that we are examining is not symmetrical but sees the Samburu in a dominant position. The voluntary integration of the social organisation and generational categories of the Samburu by communities such as the Rendille allows the latter to expand their sphere of influence and the boundaries of their economic interactions. In concrete terms, this cultural expansion device (which is not imposed but is reproduced by the communities themselves who undergo this form of symbolic power) allows the Samburu to exercise a non-violent territorial domination that guarantees them constant access to grazing lands outside the borders of their community and to benefit from the economic skills of their pastoral partners. In turn, the Rendille enjoy the right to transhumance through the Samburu lands and profit from their military protection from cattle raids led by their common enemies. The circulation of songs that embody institutions and generations – in the past exclusively through direct contact and now through the digital networks drawn by mobile phones – is an integral part of this indirect exercise of power. Commenting on Harold Innis’s work on communication theories, Sarah Sharma writes:

Space-binding media, from papyrus to the radio, are light, and can be easily disseminated, thereby fostering the centralization of power. [...] Civilisations biased in terms of space will spatialize time. Time becomes a resource, commodity, and sequence of events that can be managed and controlled (Sharma 2014: 12).

The dissemination of age-set and age-grade Samburu music leads to a spatialization of time that imposes the same social rhythm on the generational and initiatory alternations of the communities involved in this homogenization process. The “centralisation of power” around a single age system and the resulting creation of a

<sup>40</sup> Recorded interview 04HS2021. Marsabit County, Kenya, July 2021.

shared *aetas* are crucial survival tools that pastoralists have long developed to cope with the difficulties of their time (Shetler 2003). Today the challenges these communities are facing go beyond any experience they may have inherited from the past: global warming is consuming their grazing lands and water sources; the spread of automatic rifles has made animal husbandry an immensely more dangerous activity than it used to be (Marmone 2017b). Yet, despite these major changes in the lifestyle of East-African pastoral peoples, the synchronization of age systems and the sharing of generational identities around a common model seems to be, today as in the past,

the most effective solution for managing the transformations of the present and for transmitting the rhythm of age institutions to future generations.

### **Acknowledgements**

The research that has led to the writing of this article could never have been completed without the funding of the Fyssen Foundation and the scientific accompaniment of the Department of Afro-American and African Studies (DAAS) of the University of Michigan. I would also like to thank Professor Kelly Askew for her inspiring supervision and for her support during an extremely difficult time for academic research.



# La représentation du leadership chez le nourrisson humain

Jesús BAS

*Postdoctoral Researcher, Center for Brain and Cognition (CBC), Universitat Pompeu Fabra*

## Résumé

Bien que la notion de leadership soit centrale dans la plupart des sciences qui cherchent à comprendre le monde social, les origines ontogénétiques de cette notion restent inconnues. Grâce à une subvention de la Fondation Fyssen, nous avons réalisé plusieurs études sur la représentation du leadership pendant la petite enfance. Nous nous sommes concentrés sur la façon dont les nourrissons se représentent la capacité différentielle des leaders à influencer les comportements des autres, comment les nourrissons lient cette influence aux comportements irrationnels des individus et comment le pouvoir social des individus est lié au rôle de leader. Les principaux résultats de ces études et leurs implications sont résumés dans le présent manuscrit.

## Mots clés

Hierarchies sociales, Dominance, Leadership, Influence sociale, Pouvoir social, Psychologie des nourrissons, Cognition sociale

## Infants' representation of leader-follower relations

### Abstract

Although the notion of leadership has been central to most fields focusing on social life, the origins of the representation of leadership remain unknown. Thanks to a grant from the Fyssen Foundation, we started several studies investigating the representation of leader-follower relations during infancy. We focused on how infants represent the differential capacity of leaders to influence others' behaviors, how infants link such influence with individuals' irrational behaviors, and how individuals' social power is related to leadership roles. The main results of these studies and their implication are summarized in the current manuscript.

### Keywords

Social hierarchies, Dominance, Leadership, Social influence, Social Power, Infancy research, Social cognition

**I**l n'y a qu'à voter.

– Oui !

– Élisons un chef !

– Allez, on vote !

*Ce jeu du vote était presque aussi amusant que celui de la conque. Les protestations de Jack furent étouffées par un clameur qui se précisa dans le choix de Ralph comme chef. Nul n'aurait su donner les raisons de son choix. C'était Piggy qui avait fait preuve d'intelligence et Jack d'autorité. Mais une sorte d'immobilité faisait ressortir la personnalité de Ralph (Golding, 1954).*

Dans son célèbre roman « Sa majesté des mouches », William Golding rend compte avec précision d'un comportement fort répandu dans la vie sociale humaine, et cela dès un âge précoce : la reconnaissance du leadership. Or, comme l'auteur le montre bien, une telle reconnaissance n'est pas toujours évidente ; nous suivons souvent des individus sans pouvoir dire explicitement pourquoi. De Platon à Galton, les facteurs sous-jacents au leadership ont intrigué les philosophes, les biologistes, les spécialistes des sciences cognitives et des sciences sociales (Adam,

2010 ; Boehm, 2001 ; Galton, 1869 ; Weber, 1968). Ici, nous résumons de manière concise un ensemble d'études récentes portant sur certains des processus cognitifs implicites qui soutiennent les représentations des relations entre leader et suiveur chez des nourrissons humains.

### État de l'art : La représentation des hiérarchies sociales chez les nourrissons

Les hiérarchies sociales sont omniprésentes dans la vie sociale et elles émergent spontanément dans de nombreux groupes sociaux (Cummins, 2015 ; Halevy, Chou, & Galinsky, 2011 ; Koski, Xie, & Olson, 2015). Reconnaître le statut social des membres d'un groupe est crucial pour comprendre de nombreuses interactions sociales. En effet, les hiérarchies sociales régulent les interactions entre individus et groupes, notamment en cas de conflits ou d'actions collectives (Dyer, Johansson, Helbing, Couzin, & Krause, 2009 ; Smith et al., 2016b). Étant donné que les humains sont immergés dans des groupes sociaux complexes dès leur naissance, comprendre comment la capacité à représenter les hiérarchies sociales fonctionne et se développe est un objectif fondamental.

Au cours de la dernière décennie, la plupart des études portant sur l'ontogenèse précoce des représentations des relations hiérarchiques se sont concentrées sur la dominance sociale, soit une relation qui détermine qui l'emporte lorsque les agents ont des buts contradictoires (pour les revues, voir : Banaji & Gelman, 2013 ; Pun, Bouleau et Baron, 2017). Plusieurs études ont montré que les nourrissons peuvent utiliser différents indices – tels que la taille, les alliances, ou les interactions sociales antérieures – pour déterminer qui domine qui (Bas & Sebastian-Galles, 2021 ; Mascaro & Csibra, 2012 ; Pun, Birch, & Baron, 2016 ; Thomsen, Frankenhuis, Ingold-Smith et Carey, 2011). Avant leur deuxième anniversaire, les nourrissons combinent les représentations des relations de dominance sociale en hiérarchies organisées (Gazes, Hampton, & Lourenco, 2017 ; Mascaro & Csibra, 2014), et plus tard, ces représentations influencent les attentes et les décisions des jeunes enfants lorsqu'ils doivent décider comment distribuer des ressources (Charafeddine et al., 2015 ; Enright, Gweon, & Sommerville, 2017), ou auprès de qui obtenir une information (Bernard et al., 2016 ;

Castelain, Bernard, Van der Henst, & Mercier, 2016). Dans l'ensemble, ces études ont révélé que la capacité à se représenter les relations hiérarchiques se développe tôt et pourrait être une composante centrale des connaissances noyaux qui organisent la conception du monde social chez l'homme (Lieberman, Woodward & Kinzler, 2017).

Contrairement aux relations de dominance, les relations entre leader et suiveur contribuent souvent à organiser les interactions entre des individus dont les objectifs et les intérêts sont alignés. Dans un environnement social où les leaders coordonnent les activités des membres du groupe, se représenter le leadership est crucial pour prédire et interpréter les comportements sociaux. Les représentations du leadership sont également fondamentales pour agir stratégiquement dans de nombreux contextes sociaux : choisir des leaders, nouer des relations avec eux ou décider d'agir en tant que leader soi-même.

De manière peut être surprenante, on ne dispose encore que de très peu d'informations sur le développement précoce des représentations du leadership. À l'âge préscolaire, les enfants sont capables de dire qu'un individu qui est bienveillant et dont les ordres sont suivis par d'autres est « responsable » – en anglais, « in charge » (Gülgöz & Gelman, 2017). De plus, après avoir vu un individu en imiter un autre, les enfants de 5 ans ont tendance à supposer que l'individu imité est le « chef » (Over & Carpenter, 2015). Deux études récentes suggèrent que les nourrissons forment également des attentes spécifiques relatives aux relations entre leaders et suiveurs. Margoni, Bailargeon et Surian (2018) ont constaté que les nourrissons de 21 mois s'attendent à ce que les individus obéissent à un agent (le « chef ») devant lequel ils s'étaient préalablement inclinés, même lorsque cet agent n'est plus présent. Par ailleurs, Stavans et Bailargeon (2019) ont montré que les nourrissons s'attendent à ce qu'un agent dont les ordres sont suivis par d'autres individus (le leader) intervienne lorsque des ressources sont distribuées de manière inégale.

Ces deux dernières études indiquent que la représentation du leadership pourrait se développer plus tôt qu'on ne le pensait auparavant. Cependant, ces résultats ne précisent pas si les nourrissons reconnaissent l'un des aspects les

plus importants du leadership ; à savoir, la capacité à se représenter l'influence asymétrique que les leaders ont sur les individus qui les suivent.

### Identifier les leaders à partir de leur influence sociale différentielle

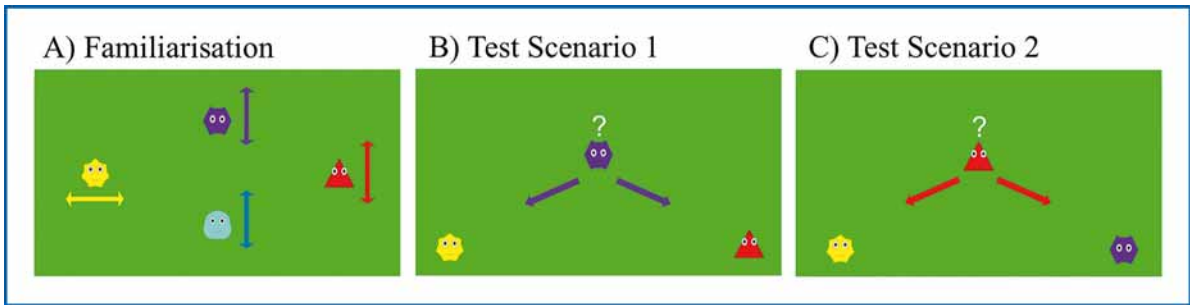
Comme indiqué précédemment, les rôles de leader et de suiveur émergent spontanément dans de nombreuses interactions sociales, c'est pourquoi l'étude de ces rôles a été au cœur de nombreux domaines d'études de la vie sociale (tels que l'anthropologie, la sociologie, la philosophie et la psychologie). Une telle interdisciplinarité soulève souvent des questions sur la façon dont différents concepts sont définis ou compris. Le dictionnaire de psychologie de l'Association Américaine de Psychologie stipule qu'un leader est « un individu qui guide les autres dans leurs activités, souvent en organisant, dirigeant, coordonnant et motivant leurs efforts » (VandenBos, 2007) – une définition qui est cohérente avec la plupart des études présentées ci-dessus. Cependant, de nombreux autres auteurs utilisent une caractérisation du leadership plus simple, et peut-être plus générale, en postulant que « les leaders sont les individus qui ont une influence différentielle non aléatoire sur le comportement de leur groupe » (Boinski & Garber, 2000 ; Couzin, Krause, Franks, & Levin, 2005b ; Glowacki & von Rueden, 2015 ; Pietraszewski, 2019 ; Smith et al., 2016a ; Smith, Ortiz, Buhbe, & van Vugt, 2018 ; Van Vugt, 2006 ; Van Vugt, Hogan, & Kaiser, 2008 ; von Rueden, Gurven, Kaplan & Stieglitz, 2014).

De notre point de vue, cette dernière définition est plus appropriée. Certes, les leaders organisent, dirigent, coordonnent et motivent les agissements des autres, mais ces comportements ne sont que quelques-uns des types d'actions au travers desquelles le leadership se manifeste. En effet, une propriété clé des relations entre leader et suiveur est l'influence asymétrique que les leaders exercent sur leurs suiveurs, contrairement à l'influence que les suiveurs exercent sur leurs leaders et les autres membres du groupe. Caractériser le leadership en termes d'influence sociale différentielle a l'avantage d'englober un large éventail de situations sociales observées non seulement chez les humains, mais aussi chez une grande variété d'espèces. Cette définition peut tout à fait s'appliquer aux personnes qui

fixent des objectifs et des plans d'action complexes, par exemple, un cadre qui attribue des tâches aux employés d'une entreprise. Cependant, cette définition s'applique également aux individus qui sont simplement suivis ou copiés par d'autres, par exemple, à un individu qui commence à se déplacer vers une source de nourriture, ou à un individu qui part sur une route migratoire, puis est suivi par les membres d'un groupe entier (Boinski & Garber, 2000 ; Couzin, Krause, Franks & Levin, 2005a ; Couzin et al., 2005b).

Dans une étude originale (Bas, Sebastian-Galles, Csibra & Mascaro, 2021), nous avons cherché à savoir si des nourrissons âgés de 12, 15 et 18 mois avaient la capacité de reconnaître l'influence sociale asymétrique stable qui peut exister entre différents individus. Pour ce faire, nous avons défini l'influence sociale en termes de causalité de Granger : si l'agent A influence l'agent B, alors les comportements passés de A contiennent des informations suffisantes pour prédire les comportements et les états mentaux de B au-delà des informations contenues dans les comportements passés et états mentaux de B seul. Si les nourrissons sont capables de comprendre et de représenter la relation asymétrique de A et B comme stable, dans des scénarios futurs inconnus, l'action de A devrait prédire les actions de B mais pas l'inverse.

À l'aide d'animations, nous avons familiarisé les nourrissons avec un groupe d'agents (les imitateurs) qui imitaient les mouvements d'un deuxième personnage (le modèle) mais pas ceux d'un troisième (l'anti-modèle). Nous avons testé les attentes des nourrissons concernant l'asymétrie et la stabilité de ces relations entre imitateurs et modèle dans un nouveau contexte. Pour cela nous avons utilisé un paradigme classique dit de « violation des attentes », qui s'appuie sur la tendance des nourrissons à regarder plus longtemps des événements qu'ils trouvent inattendus, ou difficiles à traiter (Aslin, 2007 ; Rubio-Fernández, 2019). Nous avons opposé deux scénarios : dans un premier cas, l'un des imitateurs cessait d'imiter le modèle – il suivait le chemin emprunté par l'anti-modèle plutôt que celui en emprunté par le modèle (**Figure 1**). Dans un second cas, le modèle n'imitait pas l'un des imitateurs – il suivait le chemin emprunté par l'anti-modèle plutôt que celui en emprunté



**Figure 1.** Exemple de stimuli expérimentaux (adapté de Bas et al., under review). Les flèches colorées représentent les mouvements effectués par les agents - ils n'étaient pas représentés dans les animations. A) Lors de la phase de familiarisation, deux agents, le modèle (ici en rouge) et l'anti-modèle (ici en jaune) effectuaient deux actions différentes ; ensuite, deux autres agents, les imitateurs (ici en violet et en bleu), copient l'action effectuée par le modèle. B) Dans le premier scénario de test, un imitateur suivait le modèle et l'anti-modèle, jusqu'à ce que ces deux derniers prennent des chemins différents et que l'imitateur doive choisir qui suivre. C) Dans le deuxième scénario de test, le modèle suivait un imitateur et l'anti-modèle, jusqu'à ce que l'imitateur et l'anti-modèle prennent des chemins différents et que le modèle doive choisir qui suivre. Dans les deux scénarios de test, l'agent placé au centre de l'écran (l'imitateur ou le modèle) finissait par suivre le non-modèle.

par l'un des imitateurs. Les temps de regard mesurés suggèrent que, dans la phase de test, les nourrissons s'attendaient à ce que l'imitateur continue à imiter l'agent qu'il imitait auparavant (le modèle). En revanche, les nourrissons ne s'attendaient pas à ce que le modèle soit influencé par ses imitateurs (pour des résultats comparables dans l'étude de la représentation de l'affiliation chez les nourrissons, voir Powell et Spelke, 2018a, 2018b). Ces résultats indiquent que les nourrissons peuvent identifier qui influence qui en observant simplement les comportements des agents. Ils suggèrent qu'avant l'âge de deux ans, les nourrissons sont sensibles à deux propriétés clés qui structurent les relations entre leader et suiveur : leur nature asymétrique (fondée sur l'influence sociale différentielle que les leaders exercent sur leurs suiveurs) et leur stabilité (fondée sur la généralisation des interactions des agents à travers différents scénarios/contextes).

### Reconnaître les leaders grâce à la reproduction de comportements irrationnels

Dans de nombreux groupes sociaux, il arrive que les comportements ou croyances diffusés par les leaders soient apparemment irrationnels ou arbitraires, comme les rituels ou les modes. Dans un travail récent, nous avons suggéré qu'une des raisons du succès culturel de ces comportements irrationnels pourrait s'enraciner dans capacité à

agir comme un signal social du fait (i) de leur coût et (ii) de la facilité avec laquelle leur reproduction est détectée. En conséquence, l'imitation de comportements irrationnels pourrait être un indice fort de la capacité d'un leader à influencer les autres. Nous avons testé cette hypothèse chez des nourrissons préverbaux dans deux études (Bas & Mascaro, 2021).

Dans une première étude, des nourrissons de 15 mois voyaient des animations montrant trois agents en interaction. Au cours de la phase de familiarisation, l'un des agents (le suiveur) suivait l'un des autres agents (le leader rationnel) à travers un long chemin complexe délimité par des murs. Dans une autre série de vidéos, le même suiveur suivait un troisième agent (le leader irrationnel) dans un scénario similaire, mais dans lequel on avait fait disparaître les murs obligeant les agents à suivre un long chemin. Malgré l'absence de contraintes, le leader irrationnel (et le suiveur) continuaient à emprunter un chemin inutilement long et compliqué pour atteindre leur destination finale. Enfin, lors de la phase de test, les deux leaders empruntaient simultanément deux voies différentes. Nous avons mesuré le temps de regard des nourrissons lorsque le suiveur suivait soit le leader irrationnel, soit le leader rationnel.

Dans une seconde étude, on montrait des animations similaires à des nourrissons du même âge, mais avec une différence cruciale : lors des vidéos de familiarisation, le « suiveur » ne suivait

aucun des agents (ni le leader rationnel ni le leader irrationnel). Dans cette condition, le suiveur se contentait d'observer les deux leaders se déplacer. La phase de test était exactement la même que dans l'étude 1.

Les résultats ont confirmé notre hypothèse initiale. En l'absence d'informations sur les relations entre leader et suiveur (étude 2), les nourrissons s'attendaient à ce que les agents imitent préférentiellement un agent rationnel plutôt qu'un agent irrationnel. Ce résultat suggère que les nourrissons évaluent négativement les comportements inefficaces lorsqu'ils ne sont pas imités – en concordance avec les résultats obtenus par Colomer, Bas, & Sebastian-Galles (2020). En revanche, les enfants forment l'attente opposée après avoir vu un agent imiter les comportements irrationnels d'un autre agent. Ainsi, dans le test de l'étude 1, les résultats montrent que les enfants s'attendaient à ce que le suiveur imite préférentiellement le leader irrationnel, plutôt que le leader rationnel. En d'autres termes, les nourrissons traitent la reproduction de comportements apparemment irrationnel comme un indice fort d'influence sociale. Ainsi même si l'imitation d'actions apparemment irrationnelles peut être coûteuse, la facilité avec laquelle elle est détectée la rend socialement précieuse en tant qu'indice d'influence sociale. La signification sociale de ce type d'imitation pourrait contribuer à la diffusion et au succès culturel de comportements apparemment irrationnels.

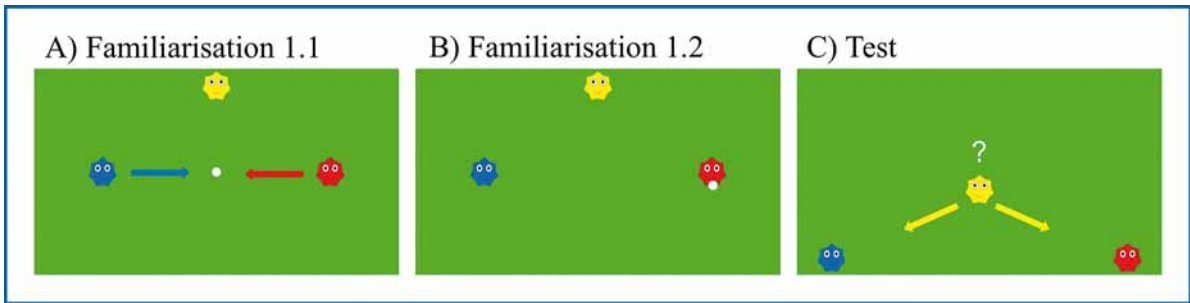
### Reconnaître les leaders par leur pouvoir social

Plusieurs auteurs ont proposé que le leadership pourrait émerger à partir des relations entre individus dominant et individus subordonné (Alexander, 1987 ; Blute et Wilson, 1976 ; Fragale, Overbeck & Neale, 2011 ; Magee & Galinsky, 2008). Les agents dominants sont souvent définis comme étant ceux qui prévalent dans les situations de conflit, et cela se reflète généralement dans leur plus grand pouvoir social, c'est-à-dire leur plus grande capacité à contrôler des ressources limitées (Koski et al., 2015). Cependant, il existe de nombreuses façons de l'emporter dans les situations de conflit et de contrôler les ressources. Ainsi, il n'y a aucune raison de supposer qu'une plus grande capacité à contrôler des ressources soit systématiquement un indice

de leadership (Smith et al., 2016b ; Thomsen, 2020 ; Van Vugt, 2006 ; Vugt et al., 2007). Être agressif ou prendre directement les ressources d'autres individus peut être perçu comme négatif, et cela dès la petite enfance (Hamlin, 2013 ; Van de Vondervoort & Hamlin, 2016). Par conséquent, il tout à fait possible que les jeunes enfants fassent la distinction entre des individus dominants agressifs, et des individus dont le rôle de leader ne s'appuie pas sur l'usage de la force.

Avec cette idée à l'esprit, nous avons cherché à savoir si les nourrissons de 18 mois tiennent compte de la manière dont les agents parviennent à contrôler les ressources pour identifier les leaders (Bas & Sebastian-Galles, 2021). Lors d'une familiarisation, des nourrissons de 18-20 mois voyaient une animation dans laquelle un agent (l'observateur) était témoin d'un conflit entre deux autres personnages pour obtenir une ressource limitée. Dans l'étude 1, le gagnant du conflit l'emportait sans indices externes de dominance physique – l'un des individus laissait simplement l'autre emporter la ressource, sans conflit physique (Bas & Sebastian-Galles, 2021). Dans l'étude 2, l'individu gagnant s'imposait par la force – en poussant l'autre agent (Mascaro & Csibra, 2012). Plus tard, lors de la phase de test – la même pour les études 1 et 2 – le gagnant et le perdant étaient tous deux suivis par l'observateur jusqu'à ce qu'ils se séparent, et l'observateur devait choisir lequel suivre (**Figure 2.**). Le temps de regard total des nourrissons a été mesuré dans deux scénarios : soit l'observateur suivait le gagnant, soit l'observateur suivait le perdant. Si les nourrissons utilisent des informations relatives au contrôle des ressources pour établir qui influence qui, ils devraient s'attendre à ce que l'observateur suive le gagnant plutôt que le perdant dans la phase de test. Nous faisons l'hypothèse que de telles attentes seraient clairement présentes lorsque le gagnant l'emportait sans utiliser la force physique (étude 1). En revanche, nous supposons que lorsque le gagnant l'emportait par la force, l'évaluation négative de ses actions agressives pourrait conduire les enfants à être moins enclins à lui assigner un rôle de leader (étude 2).

Les résultats ont confirmé qu'à partir de 18 mois, les nourrissons s'attendaient à ce que les agents prévalant dans un conflit pour obtenir des ressources soient les leaders dans la phase de



**Figure 2.** Exemple de stimuli expérimentaux (adapté de Bas et al., submitted). Les flèches colorées représentent les mouvements effectués par les agents – ils n'étaient pas représentés dans les animations. A) Pendant la phase de familiarisation, un observateur (ici en jaune) était témoin d'un conflit entre deux agents pour obtenir une ressource (une balle). B) L'un des personnages (dit le « gagnant », ici en rouge) prévalait l'autre personnage (dit le « perdant », ici en bleu). C) Dans les scénarios de test, l'observateur suivait le gagnant et le perdant jusqu'à ce qu'ils prennent des chemins différents et l'observateur devait choisir qui suivre.

test. Cependant, cette attente n'est apparue que lorsque le vainqueur n'utilisait pas la force physique pour l'emporter pendant le conflit. Ces résultats suggèrent que les nourrissons assignent bel et bien un statut de leader aux agents qui accèdent à plus de ressources. Cependant ils sont sensibles à la manière dont les agents ont obtenu ces ressources (dans une troisième étude ultérieure, nous avons confirmé que l'agent qui prévalait en utilisant sa force était évalué négativement).

## Conclusions

Dans de nombreux groupes sociaux, certains individus organisent des actions collectives en agissant en tant que leaders, de par leur influence sur les autres membres du groupe. Des études récentes suggèrent que les nourrissons ont la capacité à se représenter les relations entre leaders et suiveurs. Les nourrissons reconnaissent les individus auxquels on obéit (les leaders) et s'attendent à ce que les suiveurs continuent d'obéir même lorsque les leaders ne sont plus présents. De plus, les nourrissons s'attendent à ce que les leaders réglementent la répartition des ressources entre leurs suiveurs (Margoni et al., 2018 ; Stavans & Baillargeon, 2019). L'ensemble des études que nous avons menées grâce à la Fondation Fyssen, résumées ici, contribue à élargir les connaissances sur la représentation des relations entre leader et suiveur qui émergent spontanément chez le nourrisson humain.

### **“Les nourrissons sont sensibles à la nature asymétrique des relations entre leaders et suiveur.”**

L'influence asymétrique que les leaders exercent sur leurs suiveurs est une propriété clé du leadership : les suiveurs n'influencent pas autant leurs leaders que les leaders influencent leurs suiveurs (Pietraszewski, 2019 ; Price & Van Vugt, 2014 ; Smith et al., 2016b). Nous avons établi que les nourrissons sont sensibles à la nature asymétrique des relations entre leaders et suiveurs. Nous avons également montré que l'imitation d'actions irrationnelles est un indice puissant de leadership. En cela nos études contribuent à expliquer le succès culturel de comportements apparemment irrationnels. Enfin, nous avons obtenu des données liant la représentation de la dominance sociale aux relations entre leaders et suiveurs. Les nourrissons s'attendent à ce que les agents qui dominent sans utiliser la force physique soient suivis par des individus tiers – en revanche, ils ne forment pas d'attentes comparables pour des individus qui dominent par la force.

Du fait de la complexité du monde social humain, les nourrissons doivent être capables de représenter le type de relations sociales qui lient les individus autour d'eux. Les hiérarchies sociales, et les dynamiques de leadership émergent spontanément dans de nombreux groupes sociaux (Boehm, 2001 ; Cheng, Tracy, & Anderson, 2014). C'est pourquoi la capacité à reconnaître et à se représenter ces relations est très importante dès le début du développement. Trouver des traces de l'existence de capacité

précoces à identifier certaines propriétés du leadership chez les très jeunes nourrissons peut être considéré comme un révélateur de capacités évoluées à gérer les relations sociales. Alternative-ment, la présence de lacunes dans la compréhension du leadership par les jeunes enfants et l'étude de la façon dont les enfants parviennent à les surmonter peuvent éclairer le rôle des facteurs environnementaux et sociaux dans l'émergence de la cognition sociale. Ainsi, la recherche sur les nourrissons décrite ici peut aider à identifier les éléments constitutifs qui organisent la représentation des relations sociales au cours de l'ontogénèse. De plus, le pattern développemental suivi par les représentations du leadership peut donner des indices sur leurs origines et contribuer à combler le fossé entre différentes disciplines telles que l'anthropologie, la psychologie, les sciences sociales ou les neurosciences.

### Contributions

Jesús Bas est l'auteur principal des études reportées, qui ont développées sous la supervision de Nuria Sebastian-Galles, Olivier Mascaro, et Gergely Csibra. Le manuscrit a été écrit par J.B et O.M.

### Remerciements

Nous remercions toutes des familles et enfants ayant participé aux différentes études décrites dans cet article.

### Déclaration de Conflits d'Intérêts

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêt relatif à la publication de cet article.

### Financement

Cette recherche a reçu le soutien de la Fondation Fyssen par le biais d'une bourse de post-doctorat attribuée à J.B., du « Ministerio de Economía y Competitividad » espagnol (BES-2013-063649, bourse attribuée à J.B), et de l'« Agence Nationale pour la Recherche » (PragTICAL, ANR-14-ACHN-0020, bourse attribuée à O.M.).

### Références

- Adam, J. (2010). *The Republic of Plato: Volume 2, Books VI–X and Indexes*. Retrieved from <https://philpapers.org/rec/ADATRO-13>
- Alexander, R. D. (1987). *The Biology of Moral Systems*. London: Aldine. Retrieved from

<https://repository.library.georgetown.edu/handle/10822/816255>

- Aslin, R. N. (2007). What's in a look? *Developmental Science*, 10(1), 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2007.00563.x>
- Bas, J., & Sebastian-Galles, N. (2021). Infants' representation of social hierarchies in absence of physical dominance. *PLoS ONE*, 16(2 February), e0245450. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245450>
- Bas, J., Sebastian-Galles, N., Csibra, G., & Mascaro, O. (under review). Infants' representation of stable asymmetric social influence. Manuscript submitted for publication.
- Bas, J. & Mascaro, O. (under review). Understanding the imitation of irrational behaviors from infants' perspective. Manuscript submitted for publication.
- Bas, J. & Sebastian-Galles, N. (under review). Infants' representation of social hierarchies. From social power to social influence. Manuscript submitted for publication.
- Bernard, S., Castelain, T., Mercier, H., Kaufmann, L., Van der Henst, J.-B., & Clément, F. (2016). The boss is always right: Preschoolers endorse the testimony of a dominant over that of a subordinate. *Journal of Experimental Child Psychology*, 152, 307–317. <https://doi.org/10.1016/J.JECP.2016.08.007>
- Blute, M., & Wilson, E. C. (1976). Sociobiology: The New Synthesis. *Contemporary Sociology*, 5(6), 727. <https://doi.org/10.2307/2063068>
- Boehm, C. (2001). *Hierarchy in the forest: the evolution of egalitarian behavior*. Harvard University Press.
- Boinski, S., & Garber, P. A. (2000). *On the move: how and why animals travel in groups*. University of Chicago Press. Retrieved from <http://psycnet.apa.org/record/2000-07544-000>
- Castelain, T., Bernard, S., Van der Henst, J.-B., & Mercier, H. (2016). The influence of power and reason on young Maya children's endorsement of testimony. *Developmental Science*, 19(6), 957–966. <https://doi.org/10.1111/desc.12336>
- Charafeddine, R., Mercier, H., Clément, F., Kaufmann, L., Berchtold, A., Reboul, A., & Van der Henst, J.-B. (2015). How Preschoolers Use Cues of Dominance to Make Sense of Their Social

Environment. *Journal of Cognition and Development*, 16(4), 587–607. <https://doi.org/10.1080/15248372.2014.926269>

- Cheng, J. T., Tracy, J. L., & Anderson, C. (2014). *The psychology of social status. The Psychology of Social Status* (Vol. 9781493908677). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0867-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0867-7_1)

- Colomer, M., Bas, J., & Sebastian-Galles, N. (2020). Efficiency as a principle for social preferences in infancy. *Journal of Experimental Child Psychology*, 194, 104823. <https://doi.org/10.1016/j.jecp.2020.104823>

- Couzin, I. D., Krause, J., Franks, N. R., & Levin, S. A. (2005a). Decision making in animal groups Effective leadership and decision-making in animal groups on the move. Retrieved from <http://www.princeton.edu/~icouzin/Couzinetal2005.pdf>

- Couzin, I. D., Krause, J., Franks, N. R., & Levin, S. A. (2005b). Effective leadership and decision-making in animal groups on the move. *Nature*, 433(7025), 513–516. <https://doi.org/10.1038/nature03236>

- Cummins, D. (2015). Dominance, Status, and Social Hierarchies. In *The Handbook of Evolutionary Psychology* (pp. 676–697). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470939376.ch23>

- Dyer, J. R. G., Johansson, A., Helbing, D., Couzin, I. D., & Krause, J. (2009). Leadership, consensus decision making and collective behaviour in humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1518), 781–789. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0233>

- Enright, E. A., Gweon, H., & Sommerville, J. A. (2017). 'To the victor go the spoils': Infants expect resources to align with dominance structures. *Cognition*, 164, 8–21. <https://doi.org/10.1016/J.COGNITION.2017.03.008>

- Fragale, A. R., Overbeck, J. R., & Neale, M. A. (2011). Resources versus respect: Social judgments based on targets' power and status positions. *Journal of Experimental Social Psychology*, 47(4), 767–775. <https://doi.org/10.1016/J.JESP.2011.03.006>

- Galton, F. (1869). *Hereditary genius: An inquiry into its laws and consequences* (Vol. 27). Macmillan.

- Gazes, R. P., Hampton, R. R., & Lourenco, S. F. (2017). Transitive inference of social dominance by human infants. *Developmental Science*, 20(2), e12367. <https://doi.org/10.1111/desc.12367>

- Glowacki, L., & von Rueden, C. (2015). Leadership solves collective action problems in small-scale societies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1683). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0010>

- Golding, W. (1954). *Lord of the flies*. London: Faber and Faber.

- Gülgöz, S., & Gelman, S. A. (2017). Who's the Boss? Concepts of Social Power Across Development. *Child Development*, 88(3), 946–963. <https://doi.org/10.1111/cdev.12643>

- Halevy, N., Chou, E. Y., & Galinsky, A. D. (2011). A functional model of hierarchy Why, how, and when vertical differentiation enhances group performance. *Organizational Psychology Review*, 1(1), 32–52. <https://doi.org/10.1177/2041386610380991>

- Hamlin, J. K. (2013). Moral Judgment and Action in Preverbal Infants and Toddlers. *Current Directions in Psychological Science*, 22(3), 186–193. <https://doi.org/10.1177/0963721412470687>

- Koski, J. E., Xie, H., & Olson, I. R. (2015). Understanding social hierarchies: The neural and psychological foundations of status perception. *Social Neuroscience*, 10(5), 527–550. <https://doi.org/10.1080/17470919.2015.1013223>

- Liberman, Z., Woodward, A. L., & Kinzler, K. D. (2017). The Origins of Social Categorization. *Trends in Cognitive Sciences*, 21(7), 556–568. <https://doi.org/10.1016/J.TICS.2017.04.004>

- Magee, J. C., & Galinsky, A. D. (2008). 8 Social Hierarchy: The Self-Reinforcing Nature of Power and Status. *Academy of Management Annals*, 2(1), 351–398. <https://doi.org/10.5465/19416520802211628>

- Margoni, F., Baillargeon, R., & Surian, L. (2018). Infants distinguish between leaders and bullies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), E8835–E8843. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801677115>



- Mascaro, O., & Csibra, G. (2012). Representation of stable social dominance relations by human infants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18), 6862–6867. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113194109>
- Mascaro, O., & Csibra, G. (2014). Human infants' learning of social structures: The case of social dominance hierarchies. *Psychological Science*, 25(1), 250–255. <https://doi.org/10.1177/0956797613500509>
- Over, H., & Carpenter, M. (2015). Children infer affiliative and status relations from watching others imitate. *Developmental Science*, 18(6), 917–925. <https://doi.org/10.1111/desc.12275>
- Pietraszewski, D. (2019). The evolution of leadership: Leadership and followership as a solution to the problem of creating and executing successful coordination and cooperation enterprises. *Leadership Quarterly*. <https://doi.org/10.1016/j.leaqua.2019.05.006>
- Powell, L. J., & Spelke, E. S. (2018a). Human infants' understanding of social imitation: Inferences of affiliation from third party observations. *Cognition*, 170, 31–48. <https://doi.org/10.1016/j.cognition.2017.09.007>
- Powell, L. J., & Spelke, E. S. (2018b). Third-Party Preferences for Imitators in Preverbal Infants. *Open Mind*, 2(2), 61–71. [https://doi.org/10.1162/opmi\\_a\\_00018](https://doi.org/10.1162/opmi_a_00018)
- Price, M. E., & Van Vugt, M. (2014). The evolution of leader-follower reciprocity: the theory of service-for-prestige. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8(June), 363. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00363>
- Pun, A., Birch, S. A. J., & Baron, A. S. (2016). Infants use relative numerical group size to infer social dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(9), 2376–2381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514879113>
- Pun, A., Birch, S. A. J., & Baron, A. S. (2017). Foundations of Reasoning About Social Dominance. *Child Development Perspectives*, 11(3), 155–160. <https://doi.org/10.1111/cdep.12235>
- Rubio-Fernández, P. (2019). Publication standards in infancy research: Three ways to make Violation-of-Expectation studies more reliable. *Infant Behavior and Development*, 54, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.infbeh.2018.09.009>
- Smith, J. E., Gavrillets, S., Mulder, M. B., Hooper, P. L., Mouden, C. El, Nettle, D., ... Smith, E. A. (2016a). Leadership in Mammalian Societies: Emergence, Distribution, Power, and Payoff. *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.09.013>
- Smith, J. E., Gavrillets, S., Mulder, M. B., Hooper, P. L., Mouden, C. El, Nettle, D., ... Smith, E. A. (2016b, January). Leadership in Mammalian Societies: Emergence, Distribution, Power, and Payoff. *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.09.013>
- Smith, J. E., Ortiz, C. A., Buhbe, M. T., & van Vugt, M. (2018). Obstacles and opportunities for female leadership in mammalian societies: A comparative perspective. *The Leadership Quarterly*. <https://doi.org/10.1016/j.leaqua.2018.09.005>
- Stavans, M., & Baillargeon, R. (2019). Infants expect leaders to right wrongs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 201820091. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820091116>
- Thomsen, L. (2020, June 1). The developmental origins of social hierarchy: how infants and young children mentally represent and respond to power and status. *Current Opinion in Psychology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2019.07.044>
- Thomsen, L., Frankenhuys, W. E., Ingold-Smith, M., & Carey, S. (2011). Big and mighty: preverbal infants mentally represent social dominance. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6016), 477–480. <https://doi.org/10.1126/science.1199198>
- Van de Vondervoort, J. W., & Hamlin, J. K. (2016). Evidence for Intuitive Morality: Preverbal Infants Make Sociomoral Evaluations. *Child Development Perspectives*, 10(3), 143–148. <https://doi.org/10.1111/cdep.12175>
- Van Vugt, M. (2006). Evolutionary Origins of Leadership and Followership. *Personality and Social Psychology Review*, 10(4), 354–371. [https://doi.org/10.1207/s15327957pspr1004\\_5](https://doi.org/10.1207/s15327957pspr1004_5)
- Van Vugt, M., Hogan, R., & Kaiser, R. B. (2008). Leadership, followership, and evolution: Some lessons from the past. *American Psychologist*, 63(3), 182–196. <https://doi.org/10.1037/0003-066X.63.3.182>

- VandenBos, G. R. (2007). APA Dictionary of Psychology. Retrieved March 28, 2020, from <https://dictionary.apa.org/>

- von Rueden, C., Gurven, M., Kaplan, H., & Stieglitz, J. (2014). Leadership in an Egalitarian Society. *Human Nature*, 25(4), 538–566. <https://doi.org/10.1007/s12110-014-9213-4>

- Vugt, M. Van, Baumeister, R., Dunbar, R. I. M., Hogan, B., O’gorman, R., Richerson, P., ... Wilson, D. S. (2007). Evolutionary Origins of Leadership and Followership. *Personality and Social Psychology Review*, 10(4), 354–371. [https://doi.org/10.1207/s15327957pspr1004\\_5](https://doi.org/10.1207/s15327957pspr1004_5)

- Weber, M. (1968). *Economy and Society* (2 volumes). University of California, Berkeley, CA.

“[...] the clamor changed from the general wish for a chief to an election by acclaim of Ralph himself. None of the boys could have found good reason for this.” (Golding, 1954).

With his first novel, William Golding described perfectly one of the most pervasive behaviors in human relationships even in early ages: the recognition of leadership. However, as the author also suggested, such recognition is not always clear-cut; we often follow individuals without being able to tell explicitly why. From Plato to Galton, the factors underlying leadership have puzzled philosophers, biologists, cognitive and social scientists alike (Adam, 2010; Boehm, 2001; Galton, 1869; Weber, 1968). Here, we summarize in a concise manner a set of recent studies investigating some of the implicit cognitive processes that support human infants’ representations of leader-follower relationships.

### Infants’ representation of social hierarchies. The state of art.

**S**ocial hierarchies are ubiquitous in social relationships and emerge spontaneously in many social groups (Cummins, 2015; Halevy, Chou, & Galinsky, 2011; Koski, Xie, & Olson, 2015). Recognizing the social status of group members is crucial for understanding many social interactions. Indeed, social hierarchies regulate interactions between individuals and groups, in particular in cases of conflicts or collective actions (Dyer, Johansson, Helbing, Couzin, & Krause, 2009; Smith et al., 2016b). As humans are immersed in social groups from birth, understanding how the

capacity to represent social hierarchies operates and develops is a fundamental goal.

In the last decade, most studies investigating the early ontogeny of representations of hierarchical social relations have focused on social dominance, i.e., a relation that determines who prevails when agents have conflicting goals (for reviews, see: Banaji & Gelman, 2013; Pun, Birch, & Baron, 2017). Several studies have shown that infants can use different cues (size, alliances, previous social interactions) to infer who dominates who (Bas & Sebastian-Galles, 2021; Mascaro & Csibra, 2012; Pun, Birch, & Baron, 2016; Thomsen, Frankenhuys, Ingold-Smith, & Carey, 2011). Before their second birthday, infants combine representations of social dominance relations into hierarchies (Gazes, Hampton, & Lourenco, 2017; Mascaro & Csibra, 2014), and later, these representations influence young children’s expectations and decisions regarding resource distribution (Charafeddine et al., 2015; Enright, Gweon, & Sommerville, 2017), and whom to learn from (Bernard et al., 2016; Castelain, Bernard, Van der Henst, & Mercier, 2016). Altogether, these previous studies have revealed that the ability to represent hierarchical relations develops early and could be a component of the core system that underpins humans’ conception of the social world (Lieberman, Woodward, & Kinzler, 2017).

In contrast to dominance relations, leader-follower relations contribute to organizing individuals’ interactions when the goals and interests of the group members are aligned. In a social environment where leaders coordinate the activities of the group members, representing leader-follower relations is crucial for predicting and interpreting social behaviors. Representations of leadership are also fundamental for acting strategically in many social contexts: choosing leaders, forming relationships with leaders, or deciding to act as a leader. Perhaps surprisingly, evidence remains scarce regarding the early development of leader-follower relations’ representations. By preschool age, children are able to tell that an individual who is benevolent and whose orders are followed by others is “in charge” (Gülgöz & Gelman, 2017). In addition, after watching one individual imitating another, 5-year-old children tend to assume that the imitated individual is the «boss» (Over & Carpenter,

2015). Two recent studies suggest that infants also form specific expectations when there is evidence for leader-follower relations. Margoni, Baillargeon and Surian (2018) found that 21-month-old infants expect individuals to obey an agent (the leader) that they had previously bowed to, even when this agent is no longer present. Moreover, Stavans and Baillargeon (2019) showed that infants expect an agent whose orders are followed by other individuals (the leader) to intervene in resource distribution. Crucially, in both sets of studies, infants showed no evidence for comparable expectations when there was no evidence for leader-follower relations (i.e., when the potential followers did not bow to the other agent, or when they did not follow her orders).

These two latter studies indicated that the representation of leadership status might develop earlier than previously thought. They imply that infants track whether or not an agent has followers. However, they do not disentangle whether infants recognize one of the most important aspects of leadership; namely, the asymmetric influence that leaders have over their followers, but not the other way around.

### Recognition of leaders from their differential social influence

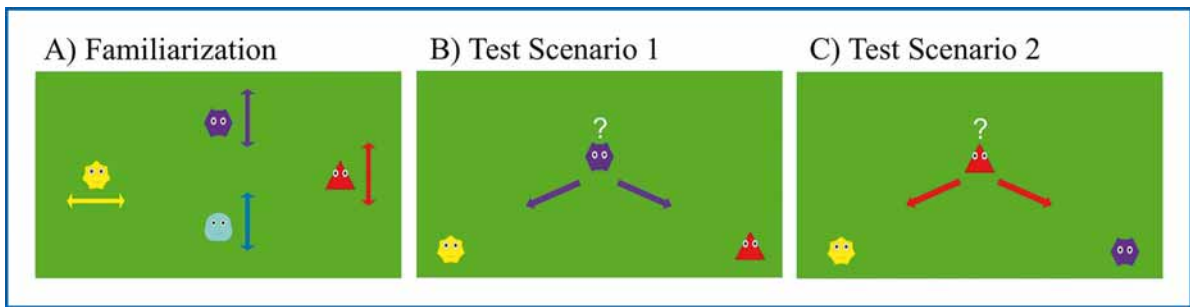
As previously said, leadership and follower-ship roles emerge spontaneously in many social interactions, that is why the study of these roles has been central to most fields focusing on social life (such as anthropology, sociology, philosophy and psychology). Such interdisciplinarity often raises issues about how different concepts are defined or understood. The *American Psychological Association (APA) dictionary of psychology* states that a leader is “*an individual who guides others in their pursuits, often by organizing, directing, coordinating, and motivating their efforts*” (VandenBos, 2007) – a definition that is consistent with most of the studies presented above. However, many other authors use a learner, and perhaps more general conceptualization, by postulating that “*leaders are the individuals who have a non-random differential influence on the behavior of their group*” (Boinski & Garber, 2000; Couzin, Krause, Franks, & Levin, 2005b; Glowacki & von Rueden, 2015; Pietraszewski, 2019; Smith et al., 2016a; Smith, Ortiz, Buhbe,

& van Vugt, 2018; Van Vugt, 2006; Van Vugt, Hogan, & Kaiser, 2008; von Rueden, Gurven, Kaplan, & Stieglitz, 2014).

From our perspective, the latter definition is more appropriate. Certainly, leaders organize, direct, coordinate, and motivate others in their pursuit, but those behaviors are just some of the actions used when leading. One key property of leader-follower relations is the asymmetrical influence that leaders hold over their followers, in contrast with the influence that followers hold over their leaders and other group members. The latter definition of leadership has the benefit of encompassing a large set of social situations observed not just in humans, but in a wide variety of species as well. It applies to individuals who set complex goals and action plans, e.g., a manager who assigns tasks to employees in a firm. However, this definition also applies to individuals who are simply followed, or copied by others, e.g., an individual that begins to move towards a food source, or to depart on a migration route, and then is followed by the members of an entire group (Boinski & Garber, 2000; Couzin, Krause, Franks, & Levin, 2005a; Couzin et al., 2005b).

In an original study (Bas, Sebastian-Galles, Csibra, & Mascaro, 2021), we investigated whether 12-, 15- and 18-month-old infants have the capacity to recognize a stable asymmetric social influence among different individuals. To do so, we defined social influence in terms of Granger causality: if agent A influences agent B, then A’s past behaviors contain information that is sufficient to predict the behaviors and mental states of B above and beyond the information contained in the past behaviors and mental states of B alone. If infants are able to understand and represent the asymmetrical relationship of A and B as stable, in future unknown scenarios, the action of A should predict the actions of B but not the other way around.

Using animated agents, we familiarized infants with a group of agents (the imitators) influenced by the movement actions of a second agent (the target) but not the actions of a third-one (the non-target). We probed infants’ expectations about the asymmetry and stability of this leader-follower relation in a new context – a path-following scenario – using the classic violation of expectation paradigm, which capitalizes on infants’ tendency to look longer at events that



**Figure 1.** Example of experimental stimuli (adapted from Bas et al, under review). Colored arrows represent the movements performed by agents – they were not shown in the animations. A) During the familiarization phase, two agents, the target (red agent) and the non-target (yellow agent) performed two different actions; next, two other agents, the imitators (purple and blue agents), copied the action performed by the target. B) In the first test scenario, an imitator followed the target and the non-target, until the target and non-target took different paths and the imitator had to choose who to follow. C) In the second test scenario, the target followed an imitator and the non-target, until the imitator and non-target took different paths and the target had to choose who to follow. In both test scenarios, the agent following (the imitator or the target) ended up next to the non-target.

they find unexpected, or hard to process (Aslin, 2007; Rubio-Fernández, 2019). We contrasted two scenarios: in a first one, one imitator did not follow the path taken by the target but followed the path taken by the non-target; in a second one, the target did not follow the path of her imitator but the path of the non-target (Figure 1.). Results showed that infants were expecting the imitator to follow the agent that was imitated previously (the target). By contrast, infants did not expect the target to be influenced by her imitator – similar to the results obtained by Powell and Spelke in their studies of infants' representation of affiliation (2018b, 2018a). The results indicated that infants can identify who influences whom by simply observing agents' behaviors, and suggested that they represent, at least, two key properties for understanding leader-follower relations: their asymmetric nature (based on the differential social influence that leaders hold over their followers) and their stability (based on the generalization of agents' interactions across different scenarios/ contexts).

### Recognition of leaders from their irrational social influence

In society, certain individuals act as leaders by showing a significant influence on others' behaviors. Very often these behaviors are seemingly irrational or arbitrary, such as rituals or fashions. In a recent work, we suggested that one of the reasons behind the cultural success of

irrational behaviors is their social signaling value which comes from (i) their cost and (ii) the ease with which their reproduction is detected. Accordingly, the imitation of irrational behaviors should be a stronger cue of the leaders' capacity to influence others rather than the imitation of rational behaviors. We tested this hypothesis in pre-verbal infants in two studies (Bas & Mascaro, 2021).

In a first study, 15-months-old infants saw animations showing three agents interacting. During the familiarization phase, in a set of videos, one of the agents (the follower) followed one of the other agents (the rational leader) across a path delimited by walls in order to achieve several goals. In another set of videos, the same follower followed the remaining agent (the irrational leader) in a similar scenario but without walls. Despite the absence of constraints, the irrational leader (and the follower) always took an unnecessarily long, circuitous and complicated path to reach their final destination. Finally, during the test phase, in a new path-following scenario, the two leaders simultaneously took two different paths. We measured infants' looking time when the follower followed either the irrational leader or the rational leader.

In a second study, same age infants were presented with similar animations but with a key difference: during the familiarization videos, the follower neither followed the rational nor the irrational leader, but just observed them fol-

lowing their paths. The test phase was exactly the same as in study 1.

The results confirmed our initial hypothesis. In absence of information about leader-follower relations (study 2), infants expect others to preferentially imitate a rational rather than an irrational agent, suggesting that infants evaluate negatively inefficient behaviors when they are not reproduced by others – in concordance with the results obtained by Colomer, Bas, & Sebastian-Galles (2020). Crucially, however, this expectation is reversed after watching others imitate an agent's irrational behaviors (study 1), suggesting that infants treat the reproduction of inefficient behaviors as a strong cue of social influence.

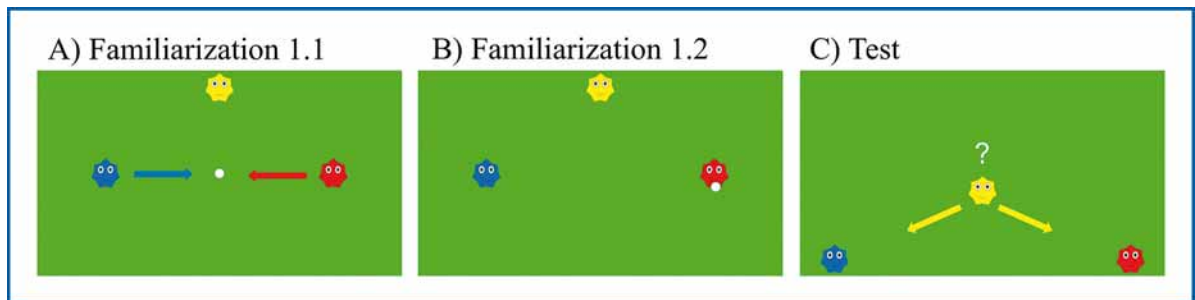
Altogether we concluded that the imitation of irrational actions may be costly, however, the ease with which it is detected makes it socially valuable as a cue of social influence. The social significance of such type of imitation could contribute to the diffusion of seemingly irrational behaviors.

### Recognition of leaders from their social power

Several authors have proposed that leadership and followership roles emerge from dominant-subordinate relationships (Alexander, 1987; Blute & Wilson, 1976; Fragale, Overbeck, & Neale, 2011; Magee & Galinsky, 2008). Dominant agents are those who prevail in conflict situations, and this is usually reflected in their higher social power, i.e., their higher capacity to control limited resources (Koski et al., 2015). However, there are many ways to prevail in conflict situations and to control resources; thus, there is no

reason to assume that all of them would be linked to successful leadership (Smith et al., 2016b; Thomsen, 2020; Van Vugt, 2006; Vugt et al., 2007). To be aggressive or to be the one who explicitly takes something from others may be perceived as negative (Hamlin, 2013; Van de Vondervoort & Hamlin, 2016) and consequently, aggressive-dominant individuals might not be preferred as leaders when followers are free to choose who to follow.

With this idea in mind, we investigated whether 18-month-old infants take into account how agents achieve control over resources to identify leaders (Bas & Sebastian-Galles, 2021). During a familiarization, we presented 18-to-20-month-old infants an animated agent (the observer) witnessing two agents conflicting to obtain a limited resource. In study 1, the winner of conflict prevailed without external cues of physical dominance (no physical interaction between the agents) (Bas & Sebastian-Galles, 2021). In study 2, the winner prevailed using a physical superiority (by pushing the loser) (Mascaro & Csibra, 2012). Later, during the test phase (the same for study 1 and 2), in a path-following scenario the winner and the loser were both followed by the observer until they separated, and the observer had to follow one of them (**Figure 2**). Infants' total looking time was measured in the two possible outcomes: the observer following the winner and the observer following the loser. If infants linked agents' social power with leadership roles they should expect the observer to follow the winner rather than the loser in the path-following scenario. Crucially, we hypothesized that such expectations would be clearly



**Figure 2.** Example of experimental stimuli (adapted from Bas et al, submitted). Colored arrows represent the movements performed by agents – they were not shown in the animations. A) During the familiarization phase, an observer (yellow agent) witnessed two agents conflicting to obtain a limited resource. B) The winner (red agent) prevailed over the loser (blue agent). C) In the test scenarios, the observer followed the winner and the loser until they took different paths and the observer had to choose who to follow.

present when the winner prevailed without the use of physical force (study 1). However, when the winner prevailed by coercing the loser, the negative evaluation of her aggressive actions might diminish how she was perceived as a leader (study 2).

Results confirmed that, from 18 months of age, infants expected agents prevailing in a resource-allocation conflict to be the leaders in a new path-following scenario. However, this expectation emerged only when the winner had shown no cue of physical dominance during the conflict. This suggests that infants perceive as leaders agents with more resources; but they are sensitive to the way agents obtained such resources (in a subsequent third study we confirmed that the agent prevailing using physical force was negatively evaluated).

## Conclusions

In many human and non-human social groups, some individuals organize collective actions by acting as leaders, while others follow the leader's guidance. Recent studies suggested that infants have the capacity to represent leader-follower relations. Infants recognize individuals who are obeyed (the leaders) and expect followers to keep obeying even when the leaders are no longer present, and infants expect leaders to regulate resource distributions among their followers (Margoni et al., 2018; Stavans & Baillargeon, 2019). With the set of studies summarized here, we extended the knowledge about the scope of infants' representation of leader-follower relations.

A key property of leader-follower relations is the asymmetrical influence that leaders hold over their followers: followers do not influence their leaders as much as leaders influence their followers (Pietraszewski, 2019; Price & Van Vugt, 2014; Smith et al., 2016b). We established that infants represent the asymmetric nature of leader-follower relations as stable across time and context. We also showed that the individual's capacity to influence others is highlighted when they are followed during the performance of apparently irrational actions; suggesting that the imitation of irrational actions could be a powerful

cue of leader-follower relations. Finally, we obtained data linking infants' representation of social dominance with leader-follower relations: infants expect dominant agents (but not "bullies") to be followed by third-party individuals.

In order to understand and engage in the social world, infants have to be able to represent the type of social relationships surrounding them. Social hierarchies, and in particular leader-follower relations, emerge spontaneously in many social groups (Boehm, 2001; Cheng, Tracy, & Anderson, 2014), that is why the capacity to recognize and represent them is very important from very early on de-

velopment. Finding preparedness to learn about certain properties of leadership in very young infants can be taken as indicative of evolved capacities to deal with social relationships. Alternatively, gaps in young infants' understanding of leadership, and the study of how infants manage to overcome them, can cast light on the role of environmental and social factors in the emergence of this domain of social cognition. Thus, research on infants as presented here can help to identify the building blocks that may underpin more complex, adult-like processing of leadership. Moreover, the developmental pattern of representations of leadership can give clues about their origins and contributes to bridging the gap between different disciplines such as anthropology, psychology, social sciences, or neurosciences.

## Author Contributions

The main author of the studies described is Jesús Bas who developed his research under the supervision of Nuria Sebastian-Galles, Olivier Mascaro, and Gergely Csibra. The current manuscript was written by J.B and O.M.

## Acknowledgments

We thank the families and infants who participated in the studies described.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declared that they have no conflicts of interest with respect to their authorship or the publication of this article.

**“Infants represent the asymmetric nature of leader-follower relations as stable across time and context.”**

**Funding**

This research was supported by the Fondation Fyssen who funded J.B. post-doctoral research, the Spanish Ministerio de Economía y Competi-

tividad BES-2013-063649 who funded J.B. pre-doctoral research and the French « Agence Nationale pour la Recherche » PragTICAL (ANR-14-ACHN-0020) who funded O.M.

# L'aquarium automatisé : une innovation nécessaire pour explorer la cognition chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) ?

Alexis BUATOIS

*Institute of neuroscience and Physiology, Department of Psychiatry and Neurochemistry, Su sahlgrenska, Gothenburg University, 41345 Gothenburg*

## Résumé

Le poisson zèbre est un modèle de plus en plus populaire dans le domaine des neurosciences. Il est notamment utilisé dans l'étude de la toxicologie ou encore des mécanismes sous-jacents aux maladies neurodégénératives. Malgré tout, il apparaît que son utilisation pour explorer les mécanismes comportementaux et neuronaux de l'apprentissage et la mémoire est relativement limitée, et que le peu d'études à ce sujet se heurtent à de nombreuses limitations protocolaires, notamment dues à la présence de l'expérimentateur. Ces limitations peuvent être contournées par l'utilisation des systèmes automatisés qui sont à ce jour plus ou moins abordables pour l'ensemble de la communauté. Ce manuscrit décrit une vue d'ensemble de ces limitations et de ces nouveaux systèmes, et propose une alternative simple et efficace pour l'exploration de l'apprentissage associatif chez le poisson zèbre.

## Mots-clés

Zebrafish, apprentissage, mémoire, aquarium automatisé, neurosciences

## Automated tank: a needed tool to explore cognition in zebrafish (*Danio rerio*)?

### Abstract

Zebrafish have become an extremely popular model organism in the domain of neuroscience. They are mainly used in the study of toxicology or to better understand the mechanisms underlying neurodegenerative diseases. However, their use in exploring the behavioural and neuronal mechanisms of learning and memory is limited, and the few studies that focus on this topic are limited by numerous experimental biases, particularly experimenter error. It is possible to bypass these limitations by using automated systems, but this option is not always easy for the entire community. In this manuscript, the different limitations of automated system are reviewed, and a simple and efficient alternative to explore learning and memory in zebrafish is proposed.

### Keywords

Zebrafish, learning, memory, automated tank, neurosciences

### Introduction

L'apprentissage et la mémoire jouent un rôle décisif dans les capacités d'un individu à survivre dans un environnement parfois hostile. L'étude de la cognition est depuis des siècles un sujet particulièrement attractif pour les chercheurs de tout milieu. En effet, les résultats de telles études ont permis des avancées significa-

tives dans différents domaines, tel que le développement d'applications informatiques allant de l'intelligence artificielle à la robotique, ou encore dans le développement de certains traitements médicaux. Ces dernières années, une augmentation du nombre de cas de maladies neurodégénératives impactant entre autres les capacités d'apprentissage associatif (Moustafa et al., 2012 ; Kéri, 2014) a aussi entraîné un nouvel



engouement quant à la compréhension des mécanismes cérébraux sous-jacents aux processus cognitifs. Malgré des avancées notables, celles-ci restent lentes dues aux nombreuses limitations liées à l'expérimentation humaine. Cependant, il est aussi possible d'améliorer notre compréhension de ces maladies, en explorant ces mécanismes chez les animaux. Bien que la cognition ait été étudiée chez de nombreuses espèces allant des insectes (Webb, 2012) aux vertébrés (Salas et al., 2003 ; Salena et al., 2021), force est de constater que les avancées majeures dans ce domaine, particulièrement sur les mécanismes cérébraux, ont été réalisées chez le rongeur (Seigers and Fardell, 2011 ; Cavaleiro et al., 2020). Cependant, depuis quelques années, une nouvelle espèce est apparue comme particulièrement populaire en neurosciences : le poisson zèbre (Stewart et al., 2014). Cette espèce offre un compromis parfait entre complexité physiologique et simplicité de manipulation expérimentale. En effet, possédant une homologie génétique élevée avec l'espèce humaine, ce modèle apparaît comme un bon candidat pour étudier les maladies neurodégénératives (Kalueff et al., 2014), la toxicologie (Dai et al., 2014), ou encore les neurosciences en général (Stewart et al., 2014). A cela s'ajoutent une reproduction et une maintenance de l'espèce particulièrement simple, ainsi que de nombreux outils moléculaires et génétiques permettant un accès aisé aux mécanismes cérébraux (Halpern et al., 2008 ; Satou et al., 2013). Enfin, le poisson zèbre possède un cerveau dont la structure a été particulièrement conservé au cours de l'évolution (Metscher and Ahlberg, 1999), permettant ainsi d'apporter des réponses quant à l'évolution des mécanismes cérébraux. Étonnamment, malgré l'engouement autour de cette espèce, il apparaît qu'il n'y a pas à ce jour de méthode solide et facilement répliquable pour tester l'apprentissage et la mémoire chez le poisson zèbre comme en témoigne une recherche de littérature toute simple. En effet, en utilisant les termes « zebrafish » ET « learning », on obtient 1182 résultats, alors qu'en remplaçant « zebrafish » par « rat » on en obtient 83898. Cette différence révèle la nécessité de développement d'outils permettant l'étude de la cognition chez le poisson zèbre. Dans cette courte revue, une première partie décrira des outils existant pour étudier l'apprentissage et la mémoire chez le poisson zèbre, en décrivant leurs avantages et

inconvéniens. Dans une seconde partie, nous décrirons une potentielle solution : les dispositifs automatisés. Enfin, un nouveau dispositif sera présenté, ainsi que les perspectives apportées par son utilisation.

### L'apprentissage et la mémoire chez le poisson zèbre

Cette espèce est devenue particulièrement populaire ces dernières années pour les raisons décrites précédemment (Stewart et al., 2014). En effet, les facilités de maintenance permettent de travailler toute l'année avec des individus de tous âges, toutes tailles, et avec un contrôle intégral des conditions de naissance et de nutrition. De plus, comme chez les rongeurs, il est possible de produire assez facilement des mutants dont les modifications permettent le contrôle précis de l'expression de gènes particuliers. Par exemple, il est possible d'obtenir des poissons zèbre mutant pour le gène codant pour le transporteur de la dopamine (DAT) (Wang et al., 2019). La dopamine a été identifiée comme impliquer dans les processus cognitifs pour de nombreuses espèces. Ce mutant pourrait par exemple permettre d'étudier le rôle de DAT dans ces processus chez le poisson zèbre.

Malgré l'ascension de ce modèle au cours des dernières années, l'utilisation de cette même espèce pour l'étude des processus cognitifs est particulièrement faible. Un constat paradoxal lorsqu'on sait que le poisson zèbre apparaît comme un nouveau modèle de choix pour étudier les maladies neurodégénératives dont un des principaux symptômes est l'altération des capacités cognitives (Moustafa et al., 2012 ; Kéri, 2014). Néanmoins, on retrouve tout de même une panoplie relativement complète de paradigmes qui peuvent être utilisés pour étudier l'apprentissage chez le poisson zèbre. Par exemple, il est possible de tester leur capacité d'apprentissage appétitif en utilisant des labyrinthes en Y (Colwill et al., 2005), en croix (Sison and Gerlai, 2010), des arènes (Karnik and Gerlai, 2012) ou encore leurs aquariums de vie (Doyle et al., 2017). Ces différents dispositifs peuvent ainsi être combinés avec l'utilisation de stimulation visuelle, le plus souvent de matériaux colorés qui vont être associés soit à de la nourriture (Colwill et al., 2005), soit à des congénères faisant office de récompense sociale (Karnik and Gerlai, 2012). En effet, le poisson zèbre est connu pour être une espèce

sociale qui se déplace en banc (Miller and Gerlai, 2007). Il apparaît d'ailleurs que bien que la nature de la récompense (nourriture ou sociale) n'ait pas d'effet direct lors de l'apprentissage, l'utilisation de récompense sociale permet la formation d'une mémoire plus solide, ainsi qu'une motivation plus constante au cours du temps (Daggett et al., 2019). Grâce à ces différentes installations, il est ainsi possible de tester les poissons zèbres sur leur capacité d'apprentissage associatif, comme la discrimination de couleur (Colwill et al., 2005), ou encore d'apprentissage spatial (Karnik and Gerlai, 2012). De plus, les chercheurs ont aussi développé des dispositifs permettant l'étude de l'apprentissage aversif chez le poisson zèbre. Un des paradigmes les plus réputés est la « tache d'inhibition de l'évitement » au cours duquel un poisson placé dans un aquarium divisé en une partie noire et une blanche, va recevoir un choc électrique lorsqu'il va dans la partie noire (Blank et al., 2009). En un seul essai, les poissons développent une mémoire d'au moins 24 h, et vont ainsi éviter d'aller dans la partie noire lors du test de mémoire (Blank et al., 2009).

Néanmoins, malgré la variété des taches d'apprentissage utilisées chez le poisson zèbre, force est de constater que pour une grande majorité, elles ne sont pas exemptes de défauts.

### Les protocoles chez le poisson zèbre : la limite

En effet, tous les protocoles cités précédemment possèdent le même défaut : la présence de l'expérimentateur à certains moments, voir durant toute la durée de l'expérience. L'interaction entre l'expérimentateur et le poisson peut se matérialiser sous plusieurs formes. Par exemple, lors du transfert du poisson de son aquarium de vie au dispositif expérimental. Lorsque l'expérimentateur ouvre ou maintient une porte à l'intérieur du dispositif. Ou encore simplement au moment de nourrir l'individu dans le cadre d'un apprentissage basé sur la nourriture. Toutes ces interactions peuvent biaiser l'expérience en donnant des indices incontrôlés à l'individu testé. Cet effet, connu sous le nom de l'« effet Hans testé le malin » est connu et décrit depuis le début du 20<sup>e</sup> siècle suite à l'histoire de Hans, un cheval présenté au public comme doué de capacité d'apprentissage conceptuel (Johnson et al., 1911). En effet, son propriétaire Wilhelm von Osten, l'avait entraîné à l'addition, la soustrac-

tion, la multiplication ou encore la division, et à répondre à ces différents calculs en tapant avec son sabot. Ce phénomène a bien évidemment suscité la curiosité des scientifiques et très rapidement, en utilisant de nombreuses expériences, ils vont découvrir que bien que capable d'apprentissage, ce cheval ne démontrait en fait pas de capacité d'apprentissage conceptuel. En effet, l'animal utilisait les signes corporels de son propriétaire afin de répondre aux questions. Par exemple, lors de la question « 2+2 », il s'est avéré que von Osten hochait sa tête 4 fois. Un comportement qui peut paraître anodin, d'autant plus qu'il n'en était absolument pas conscient, mais qui s'est avéré très utile pour le cheval dans ses réponses, en témoigne son incapacité à répondre une fois séparer de son maître.

Ces biais expérimentaux peuvent apparaître chez d'autres espèces, notamment en laboratoire. Cette question a par exemple été explorée chez le rat de laboratoire (Rosenthal and Lawson, 1964). En assignant aléatoirement des rats (tous élevés de la même manière) à douze expérimentateurs en leur mentant sur les conditions d'élevage, il apparaît que leurs perceptions des performances de leur rat durant une tache de conditionnement opérant étaient altérées. Au début de l'expérience, six des expérimentateurs (A) pensaient tester des rats élevés dans des conditions lumineuses, les six autres (B) pensaient à l'inverse que leurs rats avaient été élevés dans des conditions sombres. À la suite de l'expérience, les expérimentateurs A étaient persuadés que leurs rats avaient été plus performants dans le labyrinthe lumineux que dans celui sombre. L'inverse était observé chez les expérimentateurs B. Ces résultats démontrent habilement à quel point un expérimentateur peut s'attendre à un résultat particulier, pouvant inconsciemment le pousser à biaiser soit l'expérience elle-même, soit son analyse a posteriori.

L'intervention humaine lors d'une expérience, notamment lorsque l'animal est en libre mouvement, n'entraîne pas uniquement des biais liés à l'expérimentateur. En effet, le contrôle manuel des stimulations, ainsi que des renforcements, rend leur précision approximative. Par exemple, il est difficile de présenter une stimulation visuelle, ainsi que son renforcement exactement durant la même période pour deux individus différents. De plus, il sera aussi particulièrement

compliqué d'avoir précisément un temps similaire entre les essais pour chaque animal testé. Il est question ici de plusieurs paramètres particulièrement importants dans le processus d'apprentissage et de mémoire : le temps inter-essai (TIE) et le temps inter-stimuli (TIS). Le rôle de ces deux paramètres a été étudié chez différentes espèces vertébrées (Bevins and Ayres, 1995) et invertébrées (Menzel, 2001). Par exemple chez l'abeille, en utilisant le célèbre protocole de réflex d'extension du proboscis (Menzel, 2001), les chercheurs ont démontré que des abeilles testées avec un TIE très court (30 secs) ne développaient pas une mémoire aussi solide que lorsque le TIE était long (3 min). De plus, suivant la même règle, des abeilles testées pour un apprentissage complexe (le « negative patterning ») ont besoin d'un TIE long (8min) pour réussir cet apprentissage (Deisig et al., 2007). Le rôle du TIS a par exemple été testé chez le rongeur. Un rat recevait un choc électrique à différent TIS après avoir été placé dans une boîte (Bevins and Ayres, 1995). Il est apparu que 24h plus tard, les rats ayant été testés avec un TIS court (0, 2.5, 15s) ont développé une faible mémoire de l'évènement. En revanche, testés avec un TIS long (45, 135s), les rats ont exprimé une très forte mémoire à 24h. Il est donc essentiel d'être capable de contrôler ces différents paramètres précisément et ce pour tous les individus testés. Il est cependant particulièrement compliqué d'exercer ce contrôle manuellement.

### Les dispositifs automatisés chez le poisson zèbre

L'exemple de Hans le malin, bien que vieux d'un siècle, n'a jamais autant été d'actualité du fait de notre volonté constante de développer des paradigmes complexes, au cours desquels il est de plus en plus difficile de contrôler l'intégralité des indices pouvant être utilisés par les individus testés. Néanmoins, en parallèle, une multitude de solutions technologiques apparaissent, simples ou élaborées, permettant ainsi de diminuer les interactions expérimentateurs/animaux au cours des expériences.

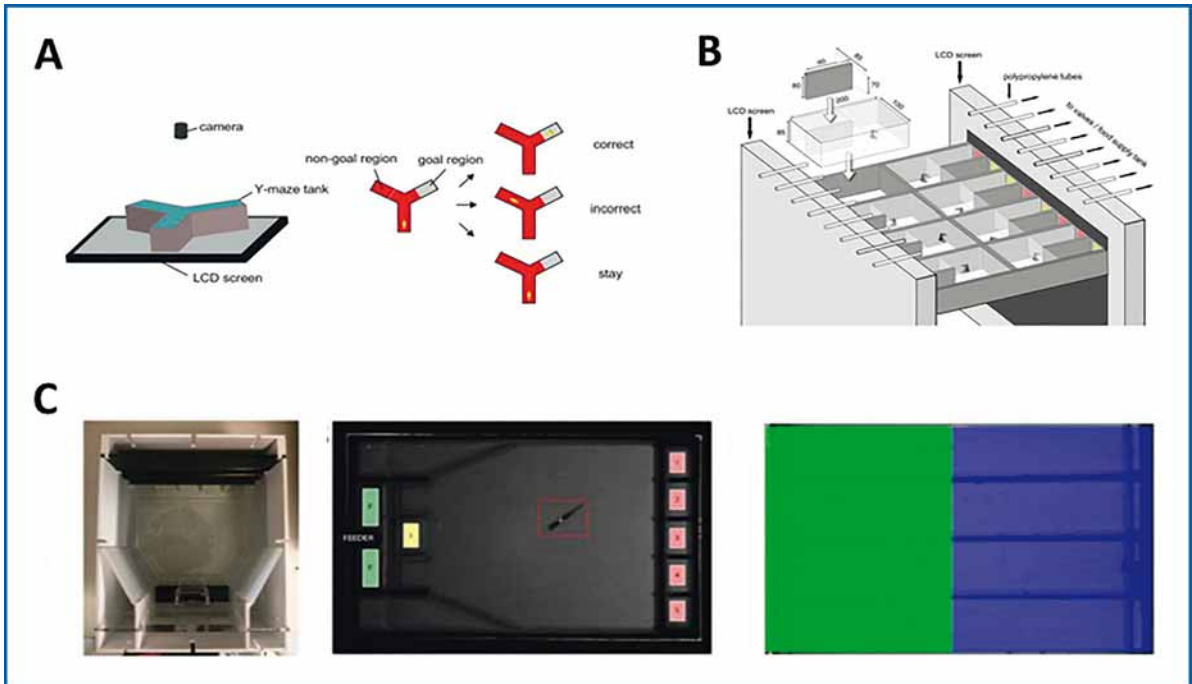
Une des solutions qui se démocratise est l'utilisation de systèmes totalement automatisés qui vont gérer tous les paramètres de l'expérience, du temps de stimulation à la quantité de récompense. En effet, des micro-systèmes tels que la Raspberry pi ou la carte Arduino permettent

assez facilement de contrôler différents éléments tels que des servomoteurs, des écrans, et quasiment n'importe quelles composantes électroniques (White et al., 2019). De nombreux dispositifs ont fait leur apparition chez différentes espèces, avec pour chacun leur particularité.

La réalité virtuelle est un des premiers types de dispositif qui est utilisé de plus en plus dans l'étude des comportements animaux, vertébrés (Thurley and Ayaz, 2017 ; Huang et al., 2020) et invertébrés (Peckmezian and Taylor, 2015 ; Zheng et al., 2017 ; Buatois et al., 2020). Les individus testés peuvent alors être en libre déplacement (Stowers et al., 2017), ou maintenus sur ou par un système de compensation de mouvement (Zheng et al., 2017 ; Huang et al., 2020). L'environnement où les stimulations projetées vont évoluer avec le déplacement de l'individu, permettant ainsi une immersion complète de l'individu. A son meilleur niveau de sophistication, le système peut aussi être couplé à des stimulations olfactives et à une distribution automatique des récompenses.

Dans une seconde catégorie, on retrouve les dispositifs automatisés plus simples. Aucune réalité virtuelle n'est utilisée ici, seulement une automatisation de la présentation des stimuli, de la récompense, ou encore de l'ouverture des portes selon l'environnement utilisé (Mueller and Neuhauss, 2012 ; Wong et al., 2015). Ces dispositifs vont permettre de réaliser des conditionnements classiques ou opérants en fonction de la connexion ou non d'un dispositif de « tracking » de l'animal et du reste des composantes électroniques.

Ces différents dispositifs sont de plus en plus utilisés pour étudier la cognition chez différentes espèces, incluant le poisson zèbre (Mueller and Neuhauss, 2012 ; Aoki et al., 2015 ; Brock et al., 2017 ; Doyle et al., 2017). Différents systèmes allant de la réalité virtuelle (Huang et al., 2020), aux dispositifs plus simples (Mueller and Neuhauss, 2012 ; Aoki et al., 2015 ; Brock et al., 2017 ; Doyle et al., 2017) ont fait leurs preuves, mais force est de constater que pour la plupart ils ne sont pas exempts de défauts. En effet, bien qu'ingénieux, la plupart de ces systèmes ne permettent pas de tester les poissons dans un aquarium dit « de vie » (**Fig. 1**). Il est donc toujours nécessaire de transférer l'animal entre chaque expérience, ou entre chaque essai de condition-



**Figure 1** : Différents dispositifs automatiques utilisés chez le poisson zèbre. **(A)** Un labyrinthe en Y placé sur un écran LCD permettant d'éclairer en rouge certaines branches du labyrinthe. Ce dispositif permet d'étudier l'apprentissage aversif. Si le poisson choisit la mauvaise branche, il reçoit un choc électrique. Figure provenant de Aoki et al. 2015. **(B)** Ce dispositif permet l'étude de l'apprentissage visuel différentiel. Il est possible de tester 8 poissons en simultanément placé dans des petits compartiments individuels qui font face à des écrans LCD. Figure provenant de Mueller & Neuhass 2012. **(C)** Un système de conditionnement opérant, permettant d'automatiquement distribuer les renforcements en fonction de la position de l'animal dans le dispositif. Ce système permet à la fois de tester l'apprentissage appétitif et aversif chez un ou plusieurs individus. Figure provenant de Broch et al. 2017. **(A, B, C)** Chacun de ces systèmes malgré leurs qualités ne fournissent que peu de place au poisson pour évoluer, et souffre d'un manque de groupe contrôle.

nement. Cela implique que le stress et le biais induit par l'expérimentateur, ne sont pas réduits par l'utilisation du système. Néanmoins, il existe des systèmes permettant le contrôle d'un aquarium de vie, mais qui se focalise sur l'étude de la cognition chez un groupe de poissons (Doyle et al., 2017), ne permettant pas l'étude du comportement d'un individu isolé. A l'opposé, les systèmes permettant l'étude d'un seul individu, propose parfois un espace restreint à l'individu ne lui laissant que peu de liberté de mouvement (**Fig. 1**). De plus, quelque soit la nature du système, ils nécessitent soit un achat couteux dans une entreprise (**Fig. 1C**) où l'utilisation d'aquarium sur mesure (**Fig. 1B**), ce qui rend difficile leur réplcation par la communauté.

Outre les problèmes liés au matériel, le point noir de la majorité des études proposant un

système automatisé pour l'étude de l'apprentissage chez le poisson zèbre est l'absence de groupe contrôle. En effet, sans ces groupes, il est difficile de réellement conclure sur l'efficacité de ces différents systèmes.

### Vers un nouveau dispositif simple et efficace

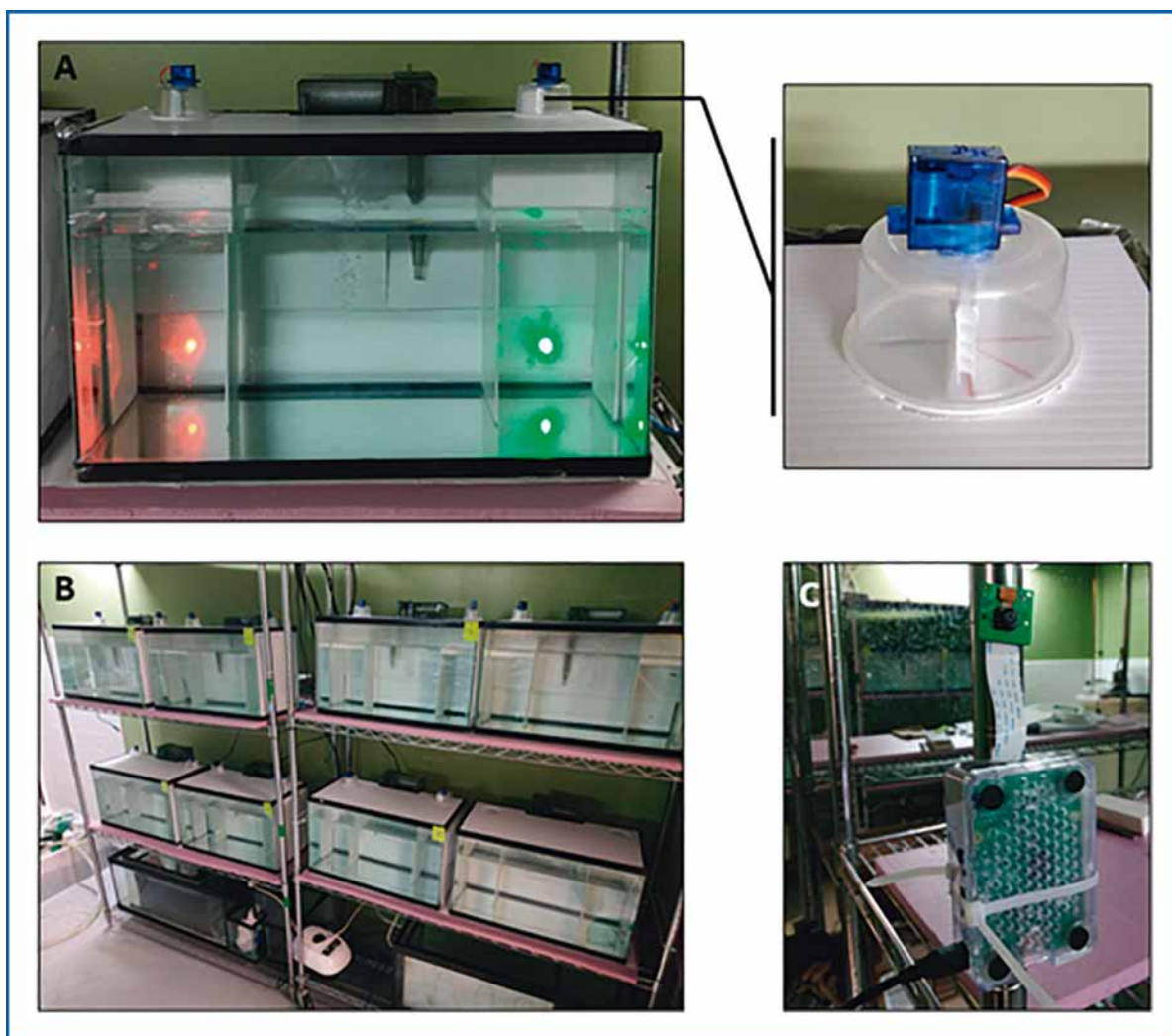
Pour toutes ces raisons, au cours des deux dernières années, j'ai développé un système automatisé très simple, permettant d'explorer l'apprentissage chez le poisson zèbre dans un aquarium de vie (Buatois et al. In prep).

À la différence de ses homologues, ce système (**Fig. 2**) est basé sur l'utilisation d'un aquarium de 40L trouvable dans n'importe quelle animalerie, ainsi que des composants électroniques très simples. L'aquarium était au préalable équipé de

deux colonnes en plastique PVC blanc placées dans son coin gauche et droit (**Fig. 2A**). Une LED RGB est placée derrière chaque colonne afin de gérer les stimulations colorées. Un nourrisseur automatique (**Fig. 2A**) composé d'un servo moteur rotatif est disposé au-dessus de chaque colonne afin de relâcher la récompense alimentaire. Les composants électroniques communiquent via une carte d'acquisition Arduino qui va permettre l'automatisation de toute l'expérience.

Grâce à ce dispositif, les poissons ont été testés pour deux types d'apprentissage associatif : le

conditionnement absolu et différentiel. Dans les deux cas, la semaine précédant l'expérience, les poissons étaient d'abord placés en groupe de sept dans un aquarium automatisé de familiarisation (**Fig. 2B**). La veille du début de l'expérience, chaque poisson était individuellement placé dans son propre aquarium automatisé. Chaque expérience était composée de 20 essais de conditionnement (4 par jour) et un test de mémoire à 24 h. Chaque jour, une heure avant le début de l'expérience, la nourriture était insérée dans le nourrisseur automatique, et la santé des poissons contrôlée. Grâce à une caméra IP (**Fig. 2C**) per-



**Figure 2 :** (A) Aquarium de vie automatique équipé avec des nourrisseurs automatiques et des LEDs RGB (Figure provenant de Buatois et al. (submitted)). (B) La salle expérimentale était équipée de 7 aquariums automatiques et un aquarium de familiarisation. (C) Module camera sur Raspberry pi pour enregistrer les essais et tests. Un module pour deux aquariums était utilisé, soit quatre modules.

mettant de ne pas entrer dans la salle expérimentale, le premier essai de chaque jour, ainsi que le test de mémoire étaient enregistrés et analysés a posteriori.

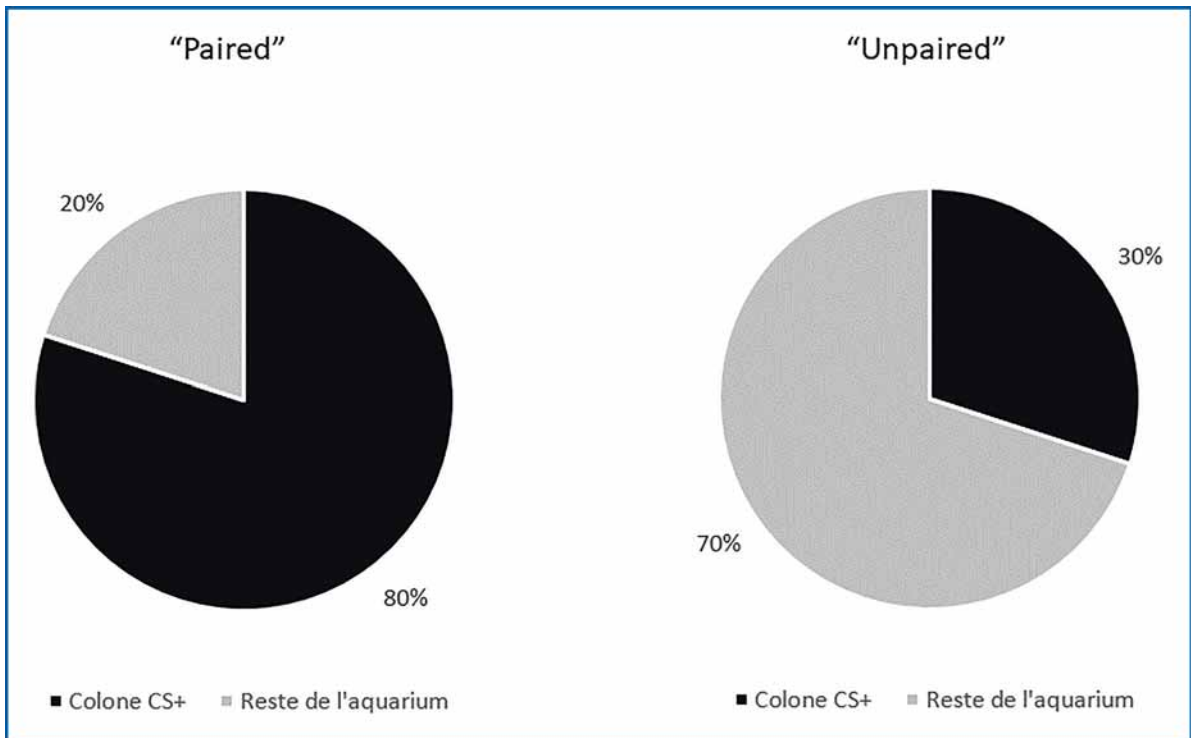
### Le conditionnement absolu

Au cours de cette première expérience, les poissons étaient entraînés à associer une couleur (rouge ou vert) à de la nourriture. Deux groupes étaient testés : « Paired » et « unpaired ». Pour chaque groupe, la lumière colorée était allumée à chaque essai pendant 60 secondes. La colonne éclairée était choisie pseudo aléatoirement, de manière que chaque colonne soit éclairée le même nombre de fois. Dans le groupe « Paired », après 45 secondes de lumière, la nourriture était relâchée dans la même colonne. En revanche, dans le groupe « Unpaired », la nourriture était relâchée 30 min avant ou après la lumière colorée, et dans la même colonne ou pas. Ces différents paramètres étaient aussi pseudo aléatoires et permettaient de complètement dissocier la stimulation colorée et la nourriture dans ce groupe.

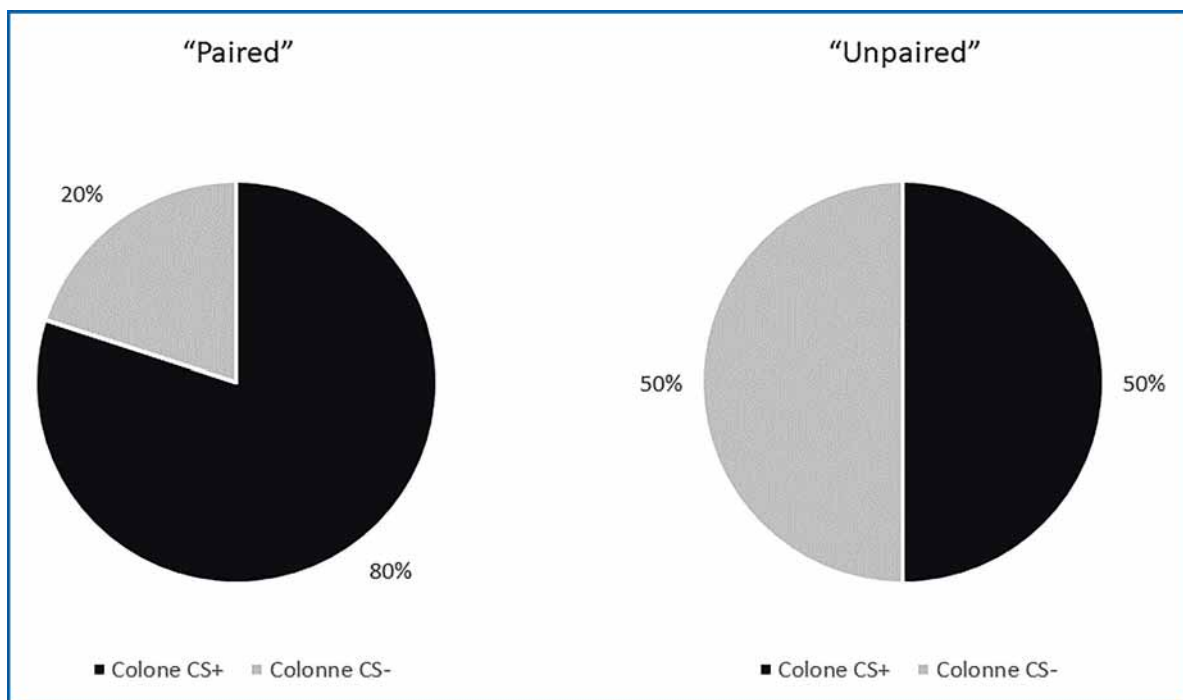
Pendant le test de mémoire, le pourcentage de poisson ayant passé plus de temps dans la colonne CS+ que dans le reste de l'aquarium était significativement plus important dans le groupe « Paired » que dans le groupe « Unpaired » (**Fig. 3** ; Test du chi 2 :  $X^2=50.5$ ,  $p < 0.0001$ ). Ces résultats indiquent que les poissons du groupe « Paired » ont bien associé la colonne avec une lumière colorée avec l'arrivée de nourriture.

### Le conditionnement différentiel

À la différence du conditionnement absolu, les poissons étaient ici entraînés à différencier deux couleurs (le rouge et le vert). L'une était récompensée par de la nourriture et pas l'autre. De nouveau un groupe « Paired » et « Unpaired » étaient testés. Pendant un essai de conditionnement, chaque colonne était éclairée avec une lumière colorée différente (rouge et verte). Dans le groupe « Paired », après 45 secondes le poisson recevait de la nourriture dans la colonne éclairée par la couleur récompensée (par exemple vert). En revanche, dans le groupe « Unpaired », la nourriture était pseudo aléatoirement distribuée



**Figure 3** : Performance pendant le test de mémoire après un conditionnement absolu pour les poissons du groupe « paired » et « unpaired ». Pourcentage de poisson ayant passé plus de temps dans la colonne CS+ (noir, colonne avec la stimulation colorée) ou dans le reste de l'aquarium (gris).



**Figure 4** : Performance pendant le test de mémoire après un conditionnement différentiel pour les poissons du groupe « paired » et « unpaired ». Pourcentage de poisson ayant passé plus de temps la colonnes CS+ (noire, colonne avec la stimulation colorée récompensée) ou dans la colonne CS- (gris, colonne avec la stimulation colorée non récompensée).

dans une des colonnes et ce 30 min avant ou après la stimulation colorée. Ainsi, il était impossible pour le poisson d'associer la stimulation colorée et la nourriture.

Au cours du test de mémoire, le pourcentage de poissons ayant passé plus de temps dans la colonne CS+ que dans la colonne CS- était significativement plus important dans le groupe « Paired » que dans le groupe « Unpaired » (**Fig. 4** ; Test du chi 2 :  $X^2=3.95$ ,  $p=0.045$ ). La différence statistique entre « Paired » et « Unpaired » est moins évidente que lors de la première expérience, car dans ce cas précis deux stimulations lumineuses sont utilisées lors du test, entraînant un choix équilibré des poissons du groupe « Unpaired ». Malgré tout, l'expérience démontre bien que les poissons du groupe « Paired » ont appris à différencier les deux lumières colorées en fonction du renforcement qui leur était associé.

Ce système permet donc de tester à moindre coût un poisson individuellement pour différent type d'apprentissage associatif et ce sans avoir à interagir avec lui au cours de l'expérience.

### Comment aller plus loin ?

Bien que ce système ait démontré son efficacité au cours de deux protocoles populaires dans l'étude de l'apprentissage associatif, il ne permet pas à ce jour la mise en place d'autres protocoles, notamment d'apprentissage configuraux. Cette limitation n'en est pas une en réalité, tant ce système est aisément modulable. En effet, ajouter des nourrisseurs, ou de nouvelle LED est très facile, permettant ainsi de complexifier les protocoles à votre guise. Il serait possible par exemple d'ajouter une troisième LED au centre de l'aquarium et de reproduire le protocole de « delayed matching to sample » utilisé dans l'étude de Giurfa et collaborateur (Giurfa et al., 2001). Les poissons devraient alors apprendre que la nourriture est distribuée dans la colonne avec la lumière colorée similaire à celle présentée une minute avant au centre de l'aquarium. Dans ces conditions, les poissons expérimenteraient donc le concept de similarité et différence. Ainsi, dans un même dispositif, utilisant les mêmes stimulations visuelles, ainsi que le même type de

récompense, il serait possible de tester des apprentissages élémentaires et configurationnels. Ceci n'est pas anodin, car cela permettrait une comparaison systématique des deux types d'apprentissage à l'échelle comportementale et neuronales.

## Conclusion

Bien qu'ils ne soient pas la solution à tous les problèmes, les systèmes automatisés permettent un contrôle quasi infallible de tous les paramètres et de ce fait une optimisation des expériences. Grâce à eux il est possible de réduire le stress chez les animaux testés, et d'obtenir une réelle constance expérimentale entre différents individus. En revanche, même si ces outils nous offrent de nouvelles perspectives, il est primordial de garder un œil sur nos expériences, car dans quasi infallible, il y a quasi, et on n'est jamais à l'abri d'une panne technique.

## Remerciement

Je souhaite tout d'abord remercier la fondation Fyssen qui a financé et soutenu ce projet durant mes deux années de post-doctorat. J'aimerais aussi remercier Pr. Robert Gerlai pour son accueil durant ces deux ans au sein de son laboratoire à l'Université de Toronto Mississauga, ainsi que les différents étudiants qui m'ont épaulé lors des expériences, Zahra Siddiqi, Sadia Naim and Tulip Marawi.

## Références

- Aoki, R., Tsuboi, T., and Okamoto, H. (2015). Y-maze avoidance: An automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. *Neurosci. Res.* 91, 69–72. doi:10.1016/j.neures.2014.10.012.
- Bevins, R. A., and Ayres, J. J. B. (1995). One-trial context fear conditioning as a function of the interstimulus interval. *Anim. Learn. Behav.* 23, 400–410. doi:10.3758/BF03198940.
- Blank, M., Guerim, L. D., Cordeiro, R. F., and Vianna, M. R. M. (2009). A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 529–534.

**“Bien qu'ils ne soient pas la solution à tous les problèmes, les systèmes automatisés permettent un contrôle quasi infallible de tous les paramètres et de ce fait une optimisation des expériences.”**

doi:10.1016/j.nlm.2009.07.001.

- Brock, A. J., Sudwartz, A., Daggett, J., Parker, M. O., and Brennan, C. H. (2017). A fully automated computer-based

'Skinner Box' for testing learning and memory in zebrafish. *BioRxiv.* doi:10.1101/110478.

- Buatois, A., Laroche, L., Lafon, G., Avarguès-Weber, A., and Giurfa, M. (2020). Higher-order discrimination learning by honeybees in a virtual environment. *Eur. J. Neurosci.* 51, 681–694. doi:10.1111/ejn.14633.

- Cavaleiro, C., Martins, J., Gonçalves, J., and Castelo-Branco, M. (2020). Memory and Cognition-Related Neuroplasticity Enhancement by Transcranial Direct Current Stimulation in Rodents: A Systematic Review. *Neural. Plast.* 2020, 1–23. doi:10.1155/2020/4795267.

- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., and Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Process.* 70, 19–31. doi:10.1016/j.beproc.2005.03.001.

- Daggett, J. M., Brown, V. J., and Brennan, C. H. (2019). Food or friends? What motivates zebrafish (*Danio rerio*) performing a visual discrimination. *Behav. Brain. Res.* 359, 190–196. doi:10.1016/j.bbr.2018.11.002.

- Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., et al. (2014). Zebrafish as a model system to study toxicology: Zebrafish toxicology monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 11–17. doi:10.1002/etc.2406.

- Deisig, N., Sandoz, J., Giurfa, M., and Lachnit, H. (2007). The trial-spacing effect in olfactory patterning discriminations in honeybees. *Behav. Brain. Res.* 176, 314–322. doi:10.1016/j.bbr.2006.10.019.

- Doyle, J. M., Merovitch, N., Wyeth, R. C., Stoyek, M. R., Schmidt, M., Wilfart, F., et al. (2017). A simple automated system for appetitive conditioning of zebrafish in their home tanks. *Behav. Brain. Res.* 317, 444–452. doi:10.1016/j.bbr.2016.09.044.

- Giurfa, M., Zhang, S., Jenett, A., Menzel, R., and Srinivasan, M. V. (2001). The concepts of



'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410, 930–933. doi:10.1038/35073582.

- Halpern, M. E., Rhee, J., Goll, M. G., Akiyama, C. M., Parsons, M., and Leach, S. D. (2008). Gal4/UAS Transgenic Tools and Their Application to Zebrafish. *Zebrafish* 5, 97–110. doi:10.1089/zeb.2008.0530.

- Huang, K.-H., Rupprecht, P., Frank, T., Kawakami, K., Bouwmeester, T., and Friedrich, R. W. (2020). A virtual reality system to analyze neural activity and behavior in adult zebrafish. *Nat. Methods* 17, 343–351. doi:10.1038/s41592-020-0759-2.

- Johnson, H. M., Pfungst, O., Stumpf, C., Rahn, C. L., and Angell, J. R. (1911). Clever Hans (the Horse of Mr. von Osten): A Contribution to Experimental, Animal, and Human Psychology. *J. Philos.* 8, 663. doi:10.2307/2012691.

- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., and Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends. Pharmacol. Sci.* 35, 63–75. doi:10.1016/j.tips.2013.12.002.

- Karnik, I., and Gerlai, R. (2012). Can zebrafish learn spatial tasks? An empirical analysis of place and single CS-US associative learning. *Behav. Brain. Res.* 233, 415–421. doi:10.1016/j.bbr.2012.05.024.

- Kéri, S. (2014). Social influence on associative learning: Double dissociation in high-functioning autism, early-stage behavioural variant frontotemporal dementia and Alzheimer's disease. *Cortex* 54, 200–209. doi:10.1016/j.cortex.2014.02.018.

- Menzel, R. (2001). Massed and Spaced Learning in Honeybees: The Role of CS, US, the Intertrial Interval, and the Test Interval. *Learning & Memory* 8, 198–208. doi:10.1101/lm.40001.

- Metscher, B. D., and Ahlberg, P. E. (1999). Zebrafish in Context: Uses of a Laboratory Model in Comparative Studies. *Dev. Biol.* 210, 1–14. doi:10.1006/dbio.1999.9230.

- Miller, N., and Gerlai, R. (2007). Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research* 184, 157–166. doi:10.1016/j.bbr.2007.07.007.

- Moustafa, A. A., Hewedi, D. H., Eissa, A. M., Myers, C. E., and Sadek, H. A. (2012). The Rela-

tionship between Associative Learning, Transfer Generalization, and Homocysteine Levels in Mild Cognitive Impairment. *PLoS ONE* 7, e46496. doi:10.1371/journal.pone.0046496.

- Mueller, K. P., and Neuhauss, S. C. F. (2012). Automated visual choice discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Integr. Neurosci.* 11, 73–85. doi:10.1142/S0219635212500057.

- Peckmezian, T., and Taylor, P. W. (2015). A virtual reality paradigm for the study of visually mediated behaviour and cognition in spiders. *Anim. Behav.* 107, 87–95. doi:10.1016/j.anbehav.2015.06.018.

- Rosenthal, R., and Lawson, R. (1964). A longitudinal study of the effects of experimenter bias on the operant learning of laboratory rats. *J. Psychiatr. Res.* 2, 61–72. doi:10.1016/0022-3956(64)90003-2.

- Salas, C., Broglio, C., and Rodríguez, F. (2003). Evolution of Forebrain and Spatial Cognition in Vertebrates: Conservation across Diversity. *Brain. Behav. Evol.* 62, 72–82. doi:10.1159/000072438.

- Salena, M. G., Turko, A. J., Singh, A., Pathak, A., Hughes, E., Brown, C., et al. (2021). Understanding fish cognition: a review and appraisal of current practices. *Anim. Cogn.* 24, 395–406. doi:10.1007/s10071-021-01488-2.

- Satou, C., Kimura, Y., Hirata, H., Suster, M. L., Kawakami, K., and Higashijima, S. (2013). Transgenic tools to characterize neuronal properties of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140, 3927–3931. doi:10.1242/dev.099531.

- Seigers, R., and Fardell, J. E. (2011). Neurobiological basis of chemotherapy-induced cognitive impairment: A review of rodent research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 729–741. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.09.006.

- Sison, M., and Gerlai, R. (2010). Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research* 207, 99–104. doi:10.1016/j.bbr.2009.09.043.

- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., and Kalueff, A. V. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends. Neurosci.* 37, 264–278. doi:10.1016/j.tins.2014.02.011.

- Stowers, J. R., Hofbauer, M., Bastien, R., Griessner, J., Higgins, P., Farooqui, S., et al. (2017). Virtual reality for freely moving animals. *Nat. Methods*. 14, 995–1002. doi:10.1038/nmeth.4399.

- Thurley, K., and Ayaz, A. (2017). Virtual reality systems for rodents. *Curr. Zool.* 63, 109–119. doi:10.1093/cz/zow070.

- Wang, G., Zhang, G., Li, Z., Fawcett, C. H., Coble, M., Sosa, M. X., et al. (2019). Abnormal Behavior of Zebrafish Mutant in Dopamine Transporter Is Rescued by Clozapine. *iScience* 17, 325–333. doi:10.1016/j.isci.2019.06.039.

- Webb, B. (2012). Cognition in insects. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367, 2715–2722. doi:10.1098/rstb.2012.0218.

- White, S. R., Amarante, L. M., Kravitz, A. V., and Laubach, M. (2019). The Future Is Open : Open-Source Tools for Behavioral Neuroscience Research. *eNeuro* 6, ENEURO.0223-19.2019. doi:10.1523/ENEURO.0223-19.2019.

- Wong, C. C., Ramanathan, D. S., Gulati, T., Won, S. J., and Ganguly, K. (2015). An automated behavioral box to assess forelimb function in rats. *J. Neurosci. Methods*. 246, 30–37. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.008.

- Zheng, N., Jin, M., Hong, H., Huang, L., Gu, Z., and Li, H. (2017). Real-time and precise insect flight control system based on virtual reality. *Electron. lett.* 53, 387–389. doi:10.1049/el.2016.3048.

## Introduction

**L**earning and memory plays a crucial role in the ability of an individual to survive in hostile environments. Over the last two centuries, the study of cognition has been particularly attractive for researchers from different scientific areas. The results obtained on this topic allowed some significant advances in different domains, from the development of informatic application like artificial intelligence or robotics, to the development of numerous effective medical treatments. These last few years have seen an increase in neurodegenerative diseases cases that are characterized by, among others, an impairment of the associative learning abilities (Moustafa et al., 2012; Kéri, 2014). This triggered a new craze

regarding our understanding of the brain mechanisms underlying the learning and memory processes. Despite some significant advancements, progress was slow because of numerous limitations due to the human experimentation. Nevertheless, it is also possible to improve our understanding of these diseases by exploring their mechanisms in animal models. Even though cognition has been explored in many species, from insects (Webb, 2012) to vertebrates (Salas et al., 2003; Salena et al., 2021), it appears the main advances on this topic, particularly regarding brain mechanisms, were obtained in rodents (Seigers and Fardell, 2011; Cavaleiro et al., 2020). However, during the last decade, a new animal model has come to the forefront of research: the zebrafish (Stewart et al., 2014). This species offers a perfect trade-off between the physiological complexity and experimental simplicity. Sharing a high genetic homology with the human species, this animal model is a great candidate to study neurodegenerative diseases (Kalueff et al., 2014), toxicology (Dai et al., 2014), or various fields of neurosciences (Stewart et al., 2014). In addition to simple breeding and raising methods, the species also offers numerous molecular and genetic tools, allowing for detailed investigations into brain mechanisms (Halpern et al., 2008; Satou et al., 2013). Finally, zebrafish possess an evolutionarily conserved brain (Metscher and Ahlberg, 1999), allowing to investigation into the evolution of brain mechanisms underlying different behaviour, including learning and memory. Surprisingly, despite its recent popularity, it is hard to find any solid, reliable and easily replicable learning and memory paradigm or device for zebrafish. A simple review of current literature demonstrates this. A literature search with the terms “zebrafish” AND “learning” results in 1182 publications. Meanwhile, a similar search using “rat” instead of “zebrafish” results in 83898 publications. This difference highlights the need to develop tools allowing for the study of cognition in zebrafish. In this short review, currently available tools to explore learning and memory in zebrafish, as well as their pros and cons, will be described. Then, a potential solution to bypass the limitations described previously will be proposed: the idea of automated devices. Finally, a new automated device will be presented, as well as new opportunities that it opens.

## Learning and memory in zebrafish

As previously mentioned, this animal model is particularly popular due to its simple husbandry, evolutionarily conserved brain and high genetic homology to humans (Stewart et al., 2014). Indeed, its simple breeding and raising methods allow for year-round use, with individuals of every age, size, and with full control of the rearing conditions and feeding. Moreover, like with rodents, mutant strains can be easily developed to include modifications that allow for accurate control of genes expression. For instance, it is possible to create zebrafish mutants with altered expression of a dopamine transporter (DAT) (Wang et al., 2019). Dopamine has been identified as involved in cognitive processes for numerous species, meaning this mutant could allow researchers to investigate the role of DAT in these same processes in zebrafish.

Despite a growing interest during recent years, the use of this model to study cognitive mechanisms is still very low. A real paradox, knowing that zebrafish appeared as a potential candidate to explore the mechanisms of neurodegenerative disease for which one of the main symptoms is the impairment of cognitive abilities (Moustafa et al., 2012; Kéri, 2014). Nevertheless, it is still possible to find a range of paradigms and devices to study learning and memory in zebrafish. For instance, it is possible to test their appetitive learning by using Y-maze (Colwill et al., 2005), cross-maze (Sison and Gerlai, 2010), open-field (Karnik and Gerlai, 2012) or their home-tank (Doyle et al., 2017). These different devices can be combined with the use of visual stimuli, often a coloured base, associated either with food (Colwill et al., 2005), or with conspecifics considered as a social reward (Karnik and Gerlai, 2012). Indeed, zebrafish are known as a social species that usually swim in a shoal (Miller and Gerlai, 2007). It appears that the nature of the reinforcement (food or social) does not directly affect the learning performance. However, the use of a social reward allows for more solid memory formation, as well as a more consistent motivation over time (Daggett et al., 2019). Thanks to these devices, it is therefore possible to study zebrafish capacities to perform simple associative learning task, such as colour discrimination (Colwill et al., 2005), or more complex tasks, like spatial learning (Karnik and

Gerlai, 2012). Moreover, researchers have developed other types of devices, allowing for the study aversive learning in zebrafish. For instance, a famous one is the “inhibitory avoidance task” during which a fish is placed in a tank separated in two parts (black and white) and receives an electric shock when they cross from the white part to the black part (Blank et al., 2009). With only one trial, zebrafish develop a memory that remains for at least 24h, and therefore avoid the black part during the memory test (Blank et al., 2009).

Nevertheless, despite a large range of learning and memory tasks developed and used in zebrafish, many of them come with several limitations.

## Protocols in zebrafish: The limitation

Every protocol previously described possess the same default: the presence of the experimenter during part of the experiment. The interaction between the experimenter and the fish can occur at different times. For instance, during the transfer from the home tank to the experimental device. It can also occur when the experimenter opens or holds the door in the experimental device. Finally, it can also be when the experimenter feeds the animal during a food-based learning task. All these interactions are not trivial and can bias the experiment by giving indirect cues to the tested individuals. This has previously been described as the “Clever Hans effect”, following the story of Hans, an horse that was presented to the public as smart and possessing conceptual learning abilities (Johnson et al., 1911). His owner, Wilhelm von Osten trained him to sum, subtraction, multiply or even divide, and to reply to these different calculations by hitting his hoof on the floor. This story caught the curiosity of scientists. Rapidly, by using a range of experiments, they discovered that even though Hans was able to learn, it was far from conceptual learning abilities. Indeed, it appears that the horse was relying on the body language of its owner to reply to the questions. For instance, when the owner asked “2+2”, the researchers realized that von Osten nodded his head four times. A behaviour that could appear as insignificant, especially since he was not conscious about it, but that was very useful for the horse to answer, which was reflected by his inability to reply once separated from his owner.

These experimental biases can appear in different species, especially in laboratory. This question was explored in laboratory rats. For example, by randomly assigning rats (all raised in the same way) to twelve different experimenters, and by lying to them about the raising conditions, it appeared that their perceptions of the rat performance during an operant conditioning task was biased (Rosenthal and Lawson 1964). At the beginning of the experiment, six of the experimenters (A) thought that they tested rats that were raised in light conditions. The other six (B), thought that their rats were raised in dark conditions. Following the experiment, the experimenters A were convinced that their rats performed better in the light maze than in the dark one, while experimenters B were convinced that their rats performed better in the dark maze. This result highlights how much an experimenter can unconsciously influence the result of an experiment according to their belief regarding the experiment. Consequently, the experimenter can either bias the experiment itself, or the analysis a posteriori.

The effect of human interactions, especially when the animal is free to move, is not only limited to experimenter bias. Indeed, the manual control of the stimuli, as well as of the reinforcement, make their accuracy approximate. For instance, it is complex to display a visual stimulus and to distribute a reinforcement simultaneously for two different individuals. In addition, it is also particularly difficult to accurately control the time between trials for every animal. These parameters are however some of the most important to consider during a learning and memory experiment: the inter trial interval (ITI) and the inter-stimuli interval (ISI). The importance of these two parameters has been explored for different vertebrate (Bevins and Ayres, 1995) and invertebrate models (Menzel, 2001). For instance in honeybees, using the famous proboscis extension reflex protocol (Menzel, 2001), researchers showed that bees tested with a very short ITI (30 seconds) did not develop a memory as solid as when they were tested for a long ITI (3 minutes). In addition, following the same rules, bees tested for a complex learning task (“negative patterning”) required a long ITI (8 minutes) to successfully acquire learning (Deisig et al., 2007). The role of the ISI has been tested in rodents as well. A rat received an electric shock at different ISI

after having been placed in a box (Bevins and Ayres, 1995). It appeared that 24h later, the rats that were tested with a short ISI (0, 2.5, 15s) developed a weak memory of the event, however, when tested with a long ISI (45, 135 s), the rat built a strong memory at 24h. While at first it may not seem completely necessary to control these parameters exactly, previously research shows they are very important to control, however it is complex to accurately control them manually.

### Automated devices in zebrafish

Even though the “clever Hans” example was first described one century ago, it remains a current problem because of our constant desire to develop complex paradigms for which it is very difficult to control every cue that could be used by the experimental animals. Nevertheless, in parallel, numerous technologic solutions have appeared, from simple to complex, decreasing the interactions between the experimenters and the animals during the experiment.

One of the solutions is the use of a fully automated system, that allows for control every experimental parameter, such as the time of stimuli or the quantity of reward. Microsystem like Raspberry pi or Arduino cards allow for easy control of different subsystems like servomotors, screens, or other electronics components (White et al., 2019). Numerous devices were developed and appeared for different species, with different specificities.

Virtual reality is one of these solutions and is currently used for the study of animal behaviour, in both vertebrates (Thurley and Ayaz, 2017; Huang et al., 2020) and invertebrates (Peckmezian and Taylor, 2015; Zheng et al., 2017 ; Bua-tois et al., 2020). Animals that are tested can move either without constraints (Stowers et al., 2017), or are maintained within a system that will compensate for its movements (Zheng et al., 2017; Huang et al., 2020). The experimental environment, depending on how complex, is displayed and evolves according to the animal’s movement, allowing a full immersion of the individual. For the most complex devices, it is possible to combine them with olfactory stimuli or with an automatic reinforcement releasing.

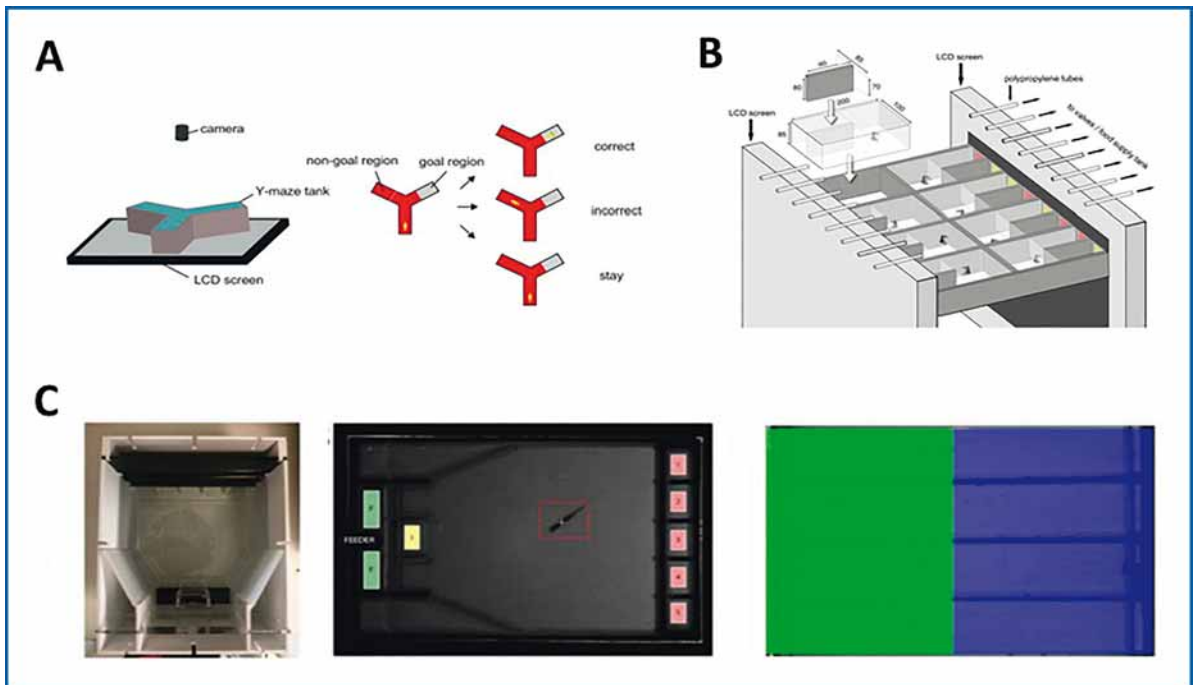
Another option is the use of automated systems not based on virtual reality. Only the stimuli display and reinforcement releasing is automated, as well as the doors opening if the environ-

ment is equipped with such abilities (Mueller and Neuhauss, 2012; Wong et al., 2015). These devices allow the use of either classical or operant conditioning according whether the setup is combined to a live tracking system.

These different devices are becoming more popular to explore cognition in different species, including zebrafish (Mueller and Neuhauss, 2012; Aoki et al., 2015; Brock et al., 2017; Doyle et al., 2017). Different systems from complex virtual reality (Huang et al., 2020) to more simple automated systems (Mueller and Neuhauss, 2012; Aoki et al., 2015; Brock et al., 2017; Doyle et al., 2017) demonstrated their efficiency, but still have defaults. Even though these systems are well designed, it is often not possible to test fish in their home-tank (Fig. 1). Therefore, experimenters are still required to transfer the animal between experiments or conditioning trials. This induces stress for the fish, as well as

potential bias due to the experimenter. Nevertheless, some systems allow for automated home tank control, however these often focus on cognition in a group of fish (Doyle et al., 2017), and therefore are not appropriate for the study of behaviour in an single individual. Moreover, the systems that allow for the study of an single individual often contain a very small experimental space that restrains the locomotion and freedom of the fish (Fig. 1). Either way, these systems either require an expensive purchase (Fig. 1C) or the use of specific aquarium (Fig. 1B), making it difficult for other researchers to replicate the results.

In addition to material issues, one of the main limitations of automated system experiments in zebrafish learning is the lack of control group. Without these groups, it is particularly difficult to draw conclusions about the efficiency of the systems.



**Figure 1:** Different automated devices used for zebrafish. **(A)** A Y-maze placed on an LCD screen illuminated the arms with red light. This setup allows for the study of aversive learning. If the fish chooses the wrong arm, it receives an electric shock. Figure from Aoki et al. 2015. **(B)** This device allows for the study of differential visual learning. Eight fish can be tested at once, and each compartment faces an LCD screen. Figure from Mueller & Neuhauss 2012. **(C)** An operant conditioning system with automatic reinforcement release depending on the position of the animal. This setup allows for the study of appetitive and aversive conditioning in one or several fish. Figure from Broch et al. 2017. **(A, B, C)** Despite their positive qualities, these systems do not provide much space for the fish to swim and often lack an appropriate control group.

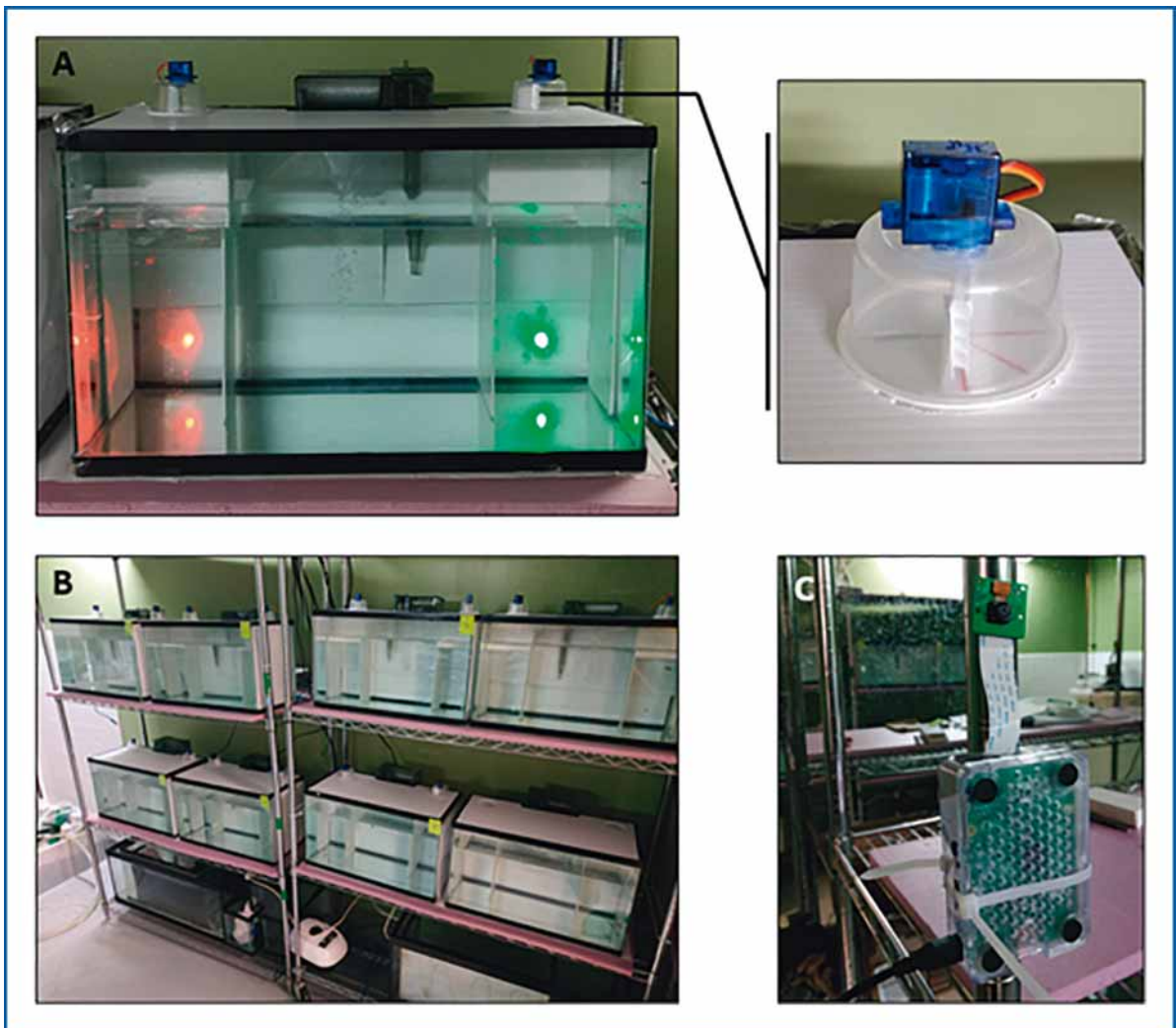
## Toward a simple and efficient automated device

For all the reasons previously cited, during the last two years, I developed a simple automated device, allowing for the investigation of learning and memory in zebrafish in their home tank (Buatois et al. Submitted).

Contrary to the other systems, this one (**Fig. 2**) uses a basic 40L aquarium that can be purchased in any pet store, and very simple electronics. The aquarium is equipped with two white PVC columns placed on the left and right back

corners (**Fig. 2A**). One RGB LED is placed behind each column to display the coloured-light stimuli. An automated home-made feeder (**Fig. 2A**) consisting of a rotative servomotor is placed above each column in order to automatically release the food reward. The electronic components are connected via an Arduino card allowing for complete system automatization.

Using this device, zebrafish were tested in two protocols of associative learning: absolute and differential conditioning. In both cases, a group of 7 fish were placed altogether in one of the automated systems for one week to familiarize



**Figure 2:** (A) Automated home-tank equipped with automated feeders and RGB LEDs. Figure from Buatois et al. (submitted). (B) The experiment room was equipped with 7 experimental tanks and one familiarization tank. (C) Raspberry pi camera module to record conditioning trials and memory tests. There was one module for two tanks, so four modules in total.

with the device (**Fig. 2B**). The day prior to the start of the experiment, fish were individually placed in their own automated system (1 fish per tank). For each experiment, fish experienced 20 conditioning trials (4 per day) and a memory test 24h after the last trial. Each day, one hour prior to starting the experiment, the automated feeders were filled with the exact quantity of food reward, and the fishs' health was checked. Using an IP camera, (**Fig. 2C**) the first trial of each conditioning day, as well as the memory test were recorded without the experimenter having to enter the room.

### Absolute conditioning

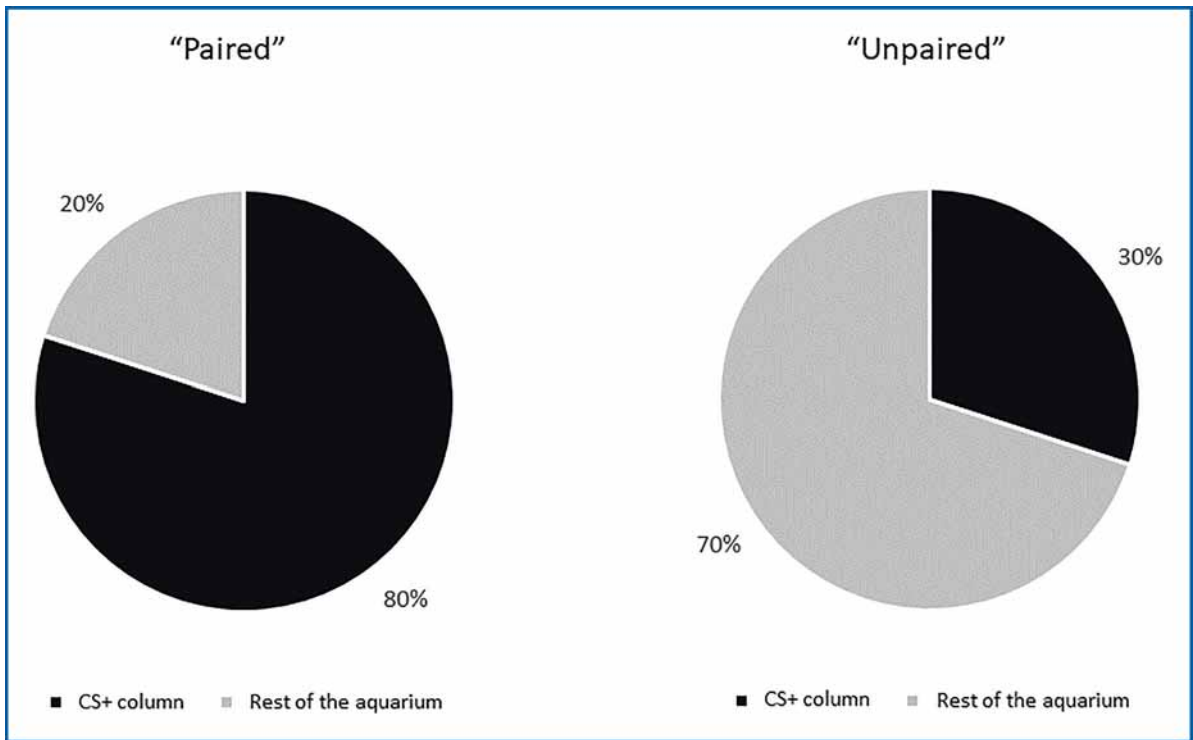
During this first experiment, fish were trained to associate a coloured-light (red or green) with a food reward. Two groups were tested: *paired* and *unpaired*. For each group, the coloured-light was displayed for 60 seconds. The column for which the light was displayed was pseudo randomly chosen in order to balance the number of times each column was illuminated. In the paired group, food was release in the same column after

45 seconds of coloured light. However, in unpaired group, food was release 30 min before or after the coloured-light display and in the same column or not. These different parameters were also pseudo-randomly chosen, allowing to dissociate the coloured-light stimuli and the food reward in the unpaired group.

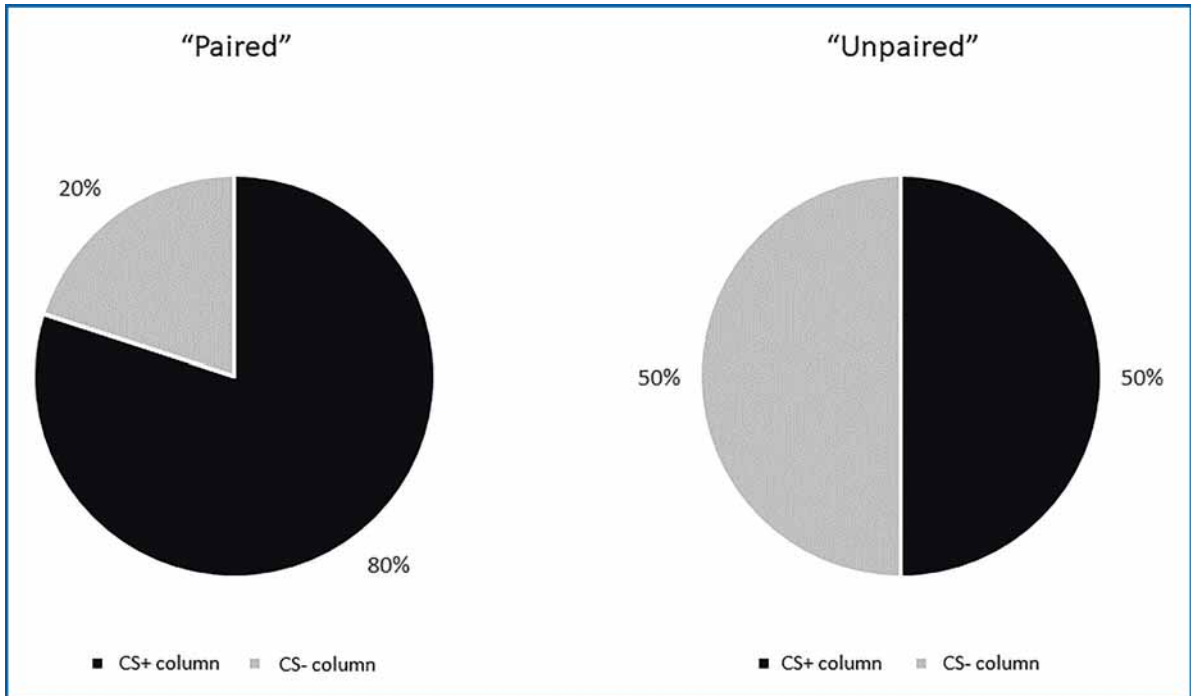
During the memory test, the percentage of fish that spent more time in the CS+ (stimuli that was rewarded during conditioning) column than in the rest of the aquarium was significantly higher in the paired group than in the unpaired group (**Fig. 3** ; Chi 2 test :  $X^2=50.5$ ,  $p < 0.0001$ ). This suggests that fish from the paired group learned the association between the coloured-light and the food reward.

### Differential conditioning

Unlike absolute conditioning, fish here were trained to differentiate between two coloured-lights (red and green). One was rewarded with food but he other was not. Two group were tested: paired and unpaired. During a conditioning trial, both columns displayed a different coloured-light



**Figure 3:** Fish performance during memory test after absolute conditioning for the paired and the unpaired group. Percentage of fish that spent more time in the CS+ column (black, column with the coloured-light rewarded) or in the rest of the aquarium (grey).



**Figure 4:** Fish performance during memory test after differential conditioning for the paired and the unpaired group. Percentage of fish that spent more time in the CS+ column (black, column with the coloured-light rewarded) or in the CS- column (grey, column with the coloured-light not rewarded).

for 60 seconds (red in one and green in the other). In the paired group, after 45 seconds, fish received food reward in the column displaying the rewarded coloured-light (for instance green). The location of the light varied between trials but the same coloured light was rewarded regardless of location (ex. Green was always rewarded whether it showed up in the left or the right column). In the unpaired group, the food was pseudo randomly released in one the column 30 minutes before or after the coloured-light display. Thus, it was impossible for unpaired fish to associate coloured-light and food reward.

During the memory test, the percentage of fish that spent more time in the CS+ (stimuli that was rewarded) column than in the CS- (stimuli that was not rewarded) column was significantly higher in paired group than in unpaired group (Fig. 4; Chi 2 test :  $X^2=3.95$ ,  $p=0.045$ ). The difference between paired and unpaired is not as drastic as in the first experiment because two coloured-light were used during the test resulting in a more balance choice in the unpaired group. The experiment demonstrated that fish from the paired group learned to discriminate the two

coloured-light based on their association with the food reinforcement.

Our system was successful in testing individual fish indifferent types of associative learning protocols without any interaction between the experimenter and the fish while keeping the cost of the testing set up low.

### How to go further?

While this system demonstrated its ability to test associative learning in the previous experiments, it is currently not possible to explore other form of learning, such as configural learning. However, given that this system is modifying depending on the need of the experimenter, it is possible to add feeder, or additional LED, allowing for increased complexity of the protocol. For instance, it would be possible to add a third LED at the centre of the aquarium and to replicate the delayed matching to sample protocol used in Giurfa et al. (2001). Thus, fish should learn that the food reward is released in the column displaying the coloured-light that previously displayed at the centre of the aquarium. Using this protocol, fish would experience the



concept of sameness and difference. Consequently, in the same device, it would be possible to test different forms of learning (elemental and configural) by using

the same experimental context, with the same visual stimuli and the same type of reinforcement. This would allow for systematic comparison of the different forms of learning at behavioural and neural scales.

### Conclusion

Even though it may not be the solution for every limitation, the automated systems allow for significant control of experimental parameters, and consequently the optimization of the experiment. Using this system, it is possible to reduce

**“Even though it may not be the solution for every limitation, the automated systems allow for significant control of experimental parameters, and consequently the optimization of the experiment.”**

experimenter-induced stress in the animals, and to reach a real consistency between different experimental individuals. However, although they

open new perspectives, it is important to always keep an eye on experiments because there is always a possibility for technical errors.

### Aknowledgements

I would like to thank the Fyssen foundation for having funded and supported this project for two years. I would also like to thank Pr. Robert Gerlai for hosting me in his laboratory at the university of Toronto Mississauga, as well as the students who helped me during the different experiments, Zahra Siddiqi, Sadia Naim and Tulip Marawi.

# Apprendre des combats : comprendre l'avantage évolutif de la communication du statut de dominance

Séverine TRANNOY

Chargée de recherche

Centre de Recherche sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, 31062 Toulouse, France

## Résumé

Comprendre comment des signaux sensoriels provenant d'un environnement en constante évolution sont interprétés et convertis en comportements pour créer des interactions sociales appropriées est une question fondamentale en neurosciences. L'initiation d'interactions sociales telles que l'agressivité et la parade nuptiale, dépend de la détection d'hydrocarbures cuticulaires (CH) tels que certaines phéromones qui recouvrent la cuticule des insectes (1) permettant aux animaux de communiquer leur sexe, leur âge, leur réceptivité ou leurs expériences sociales aux congénères (2). En compétition pour la nourriture et les partenaires, les mâles s'engagent dans des interactions agressives et établissent des relations de dominance (3). Cela nécessite des capacités cognitives (4) et une communication chimique (5, 6). Une corrélation positive entre le statut de dominance des mâles et le succès reproductif a été observée chez plusieurs espèces (7-9), ce qui suggère que les expériences de combat jouent un rôle crucial dans la condition physique des animaux. Par conséquent, cette étude a pour but d'examiner le rôle de la communication chimique sur le succès reproducteur.

En combinant des approches complémentaires avec le puissant système modèle *Drosophila melanogaster*, nous avons étudié l'impact de la communication du statut de dominance des mâles – par l'émission de phéromones – sur la prise de décision concernant les combats futurs, la réceptivité des femelles et la condition physique individuelle. L'objectif est d'étudier les mécanismes fondamentaux responsables des adaptations comportementales.

## Mots clés

Comportements agressifs et de cour, Adaptation comportementale, Succès reproducteur, Perception sensorielle, *Drosophila melanogaster*

# Learning from fights: understand the evolutionary benefit of dominance status communication

## Abstract

Understanding how relevant sensory cues from a constantly changing environment are interpreted and converted into behaviors to create appropriate social interactions is a fundamental question in neuroscience. Initiation of social interactions such as aggression and courtship, depends on the detection of Cuticular Hydrocarbons (CH) such as some pheromones that coat the fly's cuticle (1) allowing animals to communicate sex, age, receptivity or social experiences to conspecifics (2). In competition for food and mates, males engage in aggressive interactions and form dominance relationships (3). This requires cognitive abilities (4) and chemical communication (5, 6). A positive correlation between male dominance status and reproductive success has been observed in several species (7-9), suggesting crucial roles for fighting experiences in influencing animal's fitness. Therefore, this study intends to investigate the communication skills that benefit animals' fitness.

Combining complementary approaches with the powerful model system *Drosophila melanogaster*, we investigated the impact of communicating males' dominance status – by pheromone emission – on future fighting decision-making, females' receptivity and individual fitness. It aims to shed light on fundamental mechanisms responsible for key adaptations.

## Keywords

Aggression, Courtship, Behavioral adaptation ; Reproductive fitness ; Sensory perception ; *Drosophila melanogaster*

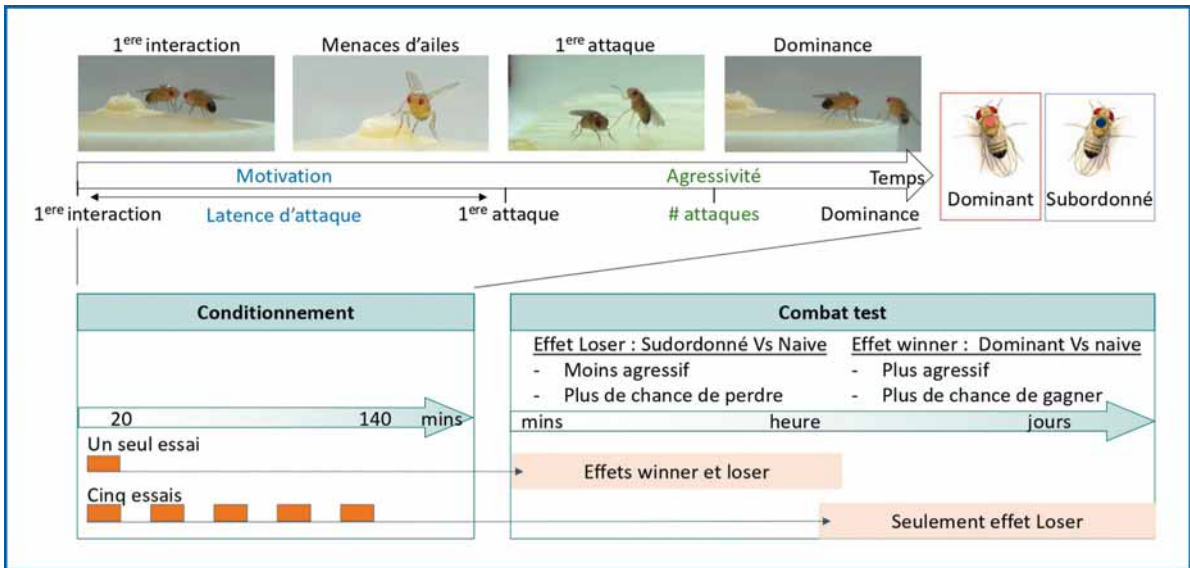
## Introduction

Pour initier une réponse comportementale appropriée, un animal rencontrant un congénère doit identifier, intégrer et traiter les signaux sensoriels de l'environnement qui l'entoure, en combinaison avec ses expériences passées et son état interne. En effet, une mauvaise identification du statut et du sexe des congénères peut conduire à des prises de décision préjudiciables à la survie et à la reproduction de l'animal. Les mâles montrent souvent des comportements agressifs et s'engagent dans des combats, créant des relations de dominance permettant d'accéder à la nourriture, aux partenaires et à un territoire (10). Une corrélation positive entre le statut de dominance du mâle et le succès reproductif a été observée chez plusieurs espèces (7-9, 11), suggérant que les expériences de combat jouent un rôle crucial pour la reproduction de l'animal. Cependant, le succès reproductif du mâle dépend aussi largement de la réceptivité des femelles. À cet égard, les mâles ont développé des profils chimiques et des appendices morphologiques, qui sont des signaux honnêtes pour communiquer leur statut social et augmenter leur capacité de reproduction (12).

La mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* représente un système modèle précieux, et son utilisation a permis d'étudier de nombreux processus biologiques d'intérêt médical, tels que le vieillissement (13), la mémoire (14), la privation de sommeil (15) et l'abus de drogues (16). Il offre un nombre d'outils génétique presque illimitée et possède un cerveau simple par rapport aux systèmes modèles des vertébrés, avec 1 000 à 10 000 fois moins de neurones. En outre, il est devenu un modèle animal important pour étudier les mécanismes neuronaux et moléculaires qui sous-tendent l'agressivité (3, 17, 18). En compétition pour la nourriture, les partenaires et le territoire, les mouches mâles emploient une série de comportements stéréotypés (Fig. 1). Cela commence par l'approche des adversaires et l'échange d'informations sensorielles. Les ani-

maux montrent des menaces visuelles avant de s'attaquer physiquement. Au fur et à mesure que le combat progresse, les deux mouches opposées modifient leurs stratégies de combat : l'une poursuit et attaque son adversaire en montrant des comportements territoriaux, tandis que l'autre se retire des ressources pour éviter une nouvelle confrontation (3, 4, 19). Sur la base de ce comportement d'attaque physique, nous pouvons estimer la motivation des mouches à s'engager dans un combat en calculant la latence d'attaque, et le niveau d'agressivité des animaux en comptabilisant le nombre total d'attaques pendant une période de temps fixe (Fig. 1). L'utilisation répétée d'attaques par une même mouche entraîne la formation d'une relation de dominance avec des mâles clairement dominants et subordonnés. Les mâles et les femelles présentent des comportements agressifs (20), cependant, seuls les mâles établissent des relations de dominance stables.

Bien qu'il s'agisse d'un comportement inné, ce comportement est également hautement adaptatif, dans lequel l'apprentissage et la mémoire jouent des rôles critiques. Les animaux modifient leurs stratégies de combat pendant les interactions agonistiques et apprennent de leurs expériences précédentes (19, 28-30). Nous avons précédemment démontré qu'après des combats uniques, les mouches dominantes et soumises présentent des « états internes de gagnant et de perdant = effets winner et loser » qui entraînent la formation de souvenirs à court terme. Ceux-ci se dégradent après plusieurs heures, avec la dynamique temporelle dépendant du niveau de familiarité des adversaires (30) (Fig. 1). Avoir vécu plusieurs défaites répétées induit des conséquences comportementales durables et la formation d'une « mémoire de perdant » à long terme qui nécessite la synthèse de protéines. Avoir vécu plusieurs victoires en revanche, ne conduit pas à un tel effet gagnant à long terme (30) (Fig. 1). Ces mémoires perdantes et gagnantes sont observées chez presque toutes les espèces animales, y compris l'homme (31) et reflètent probablement des



**Figure 1 :** Dynamique des combats entre drosophiles mâles. Basé sur les attaques physiques, l'état de motivation d'agressivité des mâles et leur niveau d'agressivité sont estimés en mesurant 1) la latence d'attaque (le temps entre la première rencontre et la première attaque) et 2) le nombre d'attaques. La phase de conditionnement représente le protocole où les dominants et les subordonnés sont générés, et le « combat test » consiste à associer le perdant et le gagnant face à un adversaire naïf dans le but de mesurer la formation des effets perdant/gagnant. Une seule phase de conditionnement induit des effets gagnant/perdant à court terme, tandis que cinq phases répétées, séparés par 10 minutes de repos, génèrent uniquement une mémoire de perte à plus long terme qui dépend de la synthèse protéique de novo.

mécanismes adaptatifs et évolutifs, potentiellement en influençant la capacité de reproduction des animaux.

Le comportement agressif et autres interactions sociales sont également fortement influencés par la communication entre congénères et la reconnaissance des individus (21). Aussi, afficher un signal honnête mais coûteux pour transmettre son statut de dominance, a souvent été privilégié dans le règne animal (plumage coloré, vocalisations, ou libération d'odeurs perçues par les congénères). Ces signaux morphologiques et chimiques utilisés par les congénères pour évaluer les capacités de combat de leurs adversaires ont finalement conféré des avantages reproductifs, faisant de la communication du statut social un trait adaptatif façonné par l'évolution (22). Chez la drosophile, comme chez d'autres insectes, lorsqu'un mâle rencontre un autre mâle, la décision de se battre ou de se courtoiser repose en grande partie sur la détection d'hydrocarbures cuticulaires (HC) qui recouvrent leur cuticule. Les CH tels que les phéromones sont utilisés pour communiquer le sexe, l'âge, la réceptivité ou les expériences sociales aux congénères

(23). De plus, la composition du profil des CH évolue au cours de la vie des animaux, est influencée par une variété de modalités dont les expériences sociales et, en retour, régule les comportements sociaux (24, 25). Chez les drosophiles, les CH sont principalement synthétisés dans des cellules appelées oenocytes (oe) (26). Les mouches dépourvues d'oe (oe-less) présentent un niveau réduit de CH et ne sont pas reconnues par leurs congénères (6, 27). En outre, l'agression est abolie envers les mouches dépourvues de CH, mais elle est entièrement rétablie lorsque ces mouches sont parfumées avec des phéromones spécifiques (6). Ceci démontre qu'un langage chimique très subtil est utilisé pour la communication et la reconnaissance, et régule les interactions sociales (par exemple, la cour entre mâles et femelles ou la compétition entre mâles) chez *D. mel*.

Actuellement, la majorité des études se concentrent sur l'identification des causes de l'agression, cependant, les conséquences de ce comportement qui peuvent être coûteuses pour les individus, sont moins documentées. Des études précédentes ont montré que l'issue des

combats influence le succès reproductif des mâles. Les animaux subordonnés ont tendance à montrer des latences à courtiser et à se reproduire avec des femelles plus longues que des animaux dominants (7, 11, 28). Filice et al, 2019, ont également montré que les dominants s'accouplaient moins longtemps que les subordonnés (11). Par conséquent, nous avons voulu étudier comment une expérience de défaite peut affecter le succès reproducteur des mâles. Pour cela, nous avons analysé l'effet d'une seule victoire et d'une seule défaite sur la locomotion et les performances de reproduction des mâles. En accord avec la littérature, nous avons montré que les mâles subordonnés ont une latence plus longue à courtiser les femelles, mais aucun effet n'a été observé sur la longueur de l'accouplement. Nous avons aussi démontré que cette diminution de la motivation des mâles à courtiser les femelles n'était pas attribuée à une diminution de la perception de ces dernières. Enfin, nous avons montré que les femelles préfèrent s'accoupler avec les mâles dominants.

## Matériel et méthodes

### Mouches

La souche Canton-Special (CS) de *Drosophila melanogaster* a été utilisée pour cette étude. Les mouches ont été élevées sur un milieu alimentaire standard à 25 °C et 50 % d'humidité relative sous un cycle lumière/obscurité de 12 :12 heures.

### Chambre expérimentale

Le dispositif expérimental utilisé dans cette étude pour examiner les comportements sociaux a déjà été décrit (29). En bref, un diviseur a été inséré dans le haut des arènes (22 mm de diamètre × 16 mm de hauteur) qui contenaient une tasse de nourriture (13 mm de diamètre × 6 mm de hauteur) les séparant en deux tailles égales. Les mouches ont ensuite été insérées de chaque côté des arènes par géotaxie négative, afin qu'elles puissent s'acclimater sans interagir les unes avec les autres. Les expériences comportementales commencent une fois que le séparateur a été retiré, permettant aux mouches d'interagir ensemble.

### Tests comportementaux

Les essais comportementaux ont été réalisés dans des chambres expérimentales qui impliquent une manipulation minimale des

mouches (29). Les mâles et les femelles ont été élevés en isolement social depuis la fin de la nymphose, en passant par l'éclosion jusqu'au moment des expériences comportementales dans des flacons en verre contenant 1,5 ml de nourriture standard pour mouches. Les essais comportementaux ont été réalisés avec des mouches âgées de 7 jours pendant les 3 premières heures du cycle lumineux quotidien à 25° C et 50 % d'humidité relative.

### 1) Test d'agressivité

Le protocole expérimental a été décrit précédemment dans Trannoy, et al. (29). Les mouches ont été anesthésiées au CO<sub>2</sub> 48 heures avant les tests comportementaux et un point de peinture acrylique a été appliqué sur le thorax dorsal pour faciliter le suivi visuel des mouches individuelles. De la nourriture standard supplémentée de levure a été utilisé comme ressource attractive dans tous les tests de combats. Nous avons défini les mâles subordonnés comme étant les individus qui se sont retirés au moins 3 fois de la ressource après avoir reçu des attaques. Après 20 minutes de combats, nous avons inséré le diviseur pour séparer les dominants et les subordonnés. Ensuite, ils ont été testés dans les essais de locomotion, de cour ou de préférences décrits ci-dessous.

### 2) Test de locomotion

10 et 60 minutes après les combats, les dominants et les subordonnés ont été insérés seuls dans une chambre expérimentale nouvelle et vide et nous avons compté le nombre de lignes médianes qui se croisent pendant 5 minutes après 1 minute d'acclimatation.

### 3) Test de cour

Nous avons effectué des tests de cour 10 et 60 minutes après les combats en appariant un mâle dominant ou subordonné avec une femelle vierge dans une chambre expérimentale. L'indice de vigueur de la cour (CVI) a été calculé comme la fraction de temps que les mâles ont passé à courtiser la femelle (y compris le tapotement, l'extension de l'aile et la vibration, la poursuite et la tentative de copulation) pendant une période de 10 minutes après le premier comportement de cour. Les latences pour courtiser et copuler étaient les temps entre la première rencontre et le premier comportement de cour ou l'initiation de la copulation.

#### 4) Test de préférence des mâles

60 minutes après les combats, les mâles dominants et subordonnés ont été insérés dans une nouvelle chambre expérimentale avec une ressource alimentaire. Une femelle vierge immobilisée et un mâle naïf ont été placés de part et d'autre de la ressource. Le temps passé à interagir avec la femelle et le mâle immobilisés a été noté pour obtenir la portion totale de temps passée avec chacun d'eux, ainsi qu'un indice de préférence. Un indice de 1 indique que les mâles ont passé tout le temps d'observation à interagir avec la femelle immobilisée, tandis qu'un indice de - 1 indique que le mâle a passé tout le temps d'observation à interagir avec le mâle immobilisé.

#### 5) Test de préférence des femelles

Une femelle vierge a été insérée dans une chambre expérimentale contenant une ressource alimentaire sur laquelle ont été placés des mâles dominants et subordonnés immobilisés 60 minutes après leurs expériences de combat. Les femelles ont été autorisées à interagir avec les mâles immobilisés. À partir de là, nous avons calculé le temps total passé à interagir avec les mâles expérimentés, et déduit un indice de préférence allant de - 1 à 1. Un indice de 1 indiquerait que la femelle a passé tout le temps d'observation à interagir avec les mâles dominants, tandis qu'un indice de - 1, avec les mâles subordonnés.

#### 6) Test de compétition de cour des femelles

60 minutes après les combats – pendant cette période de temps, les mâles dominants et subordonnés étaient toujours dans la chambre expérimentale où ils se sont battus mais séparés les uns des autres –, une femelle vierge a été insérée. Nous avons observé quels mâles ont montré le premier événement de parade nuptiale (extension d'une aile), et quels mâles ont réussi à copuler avec la femelle.

#### Analyses statistiques

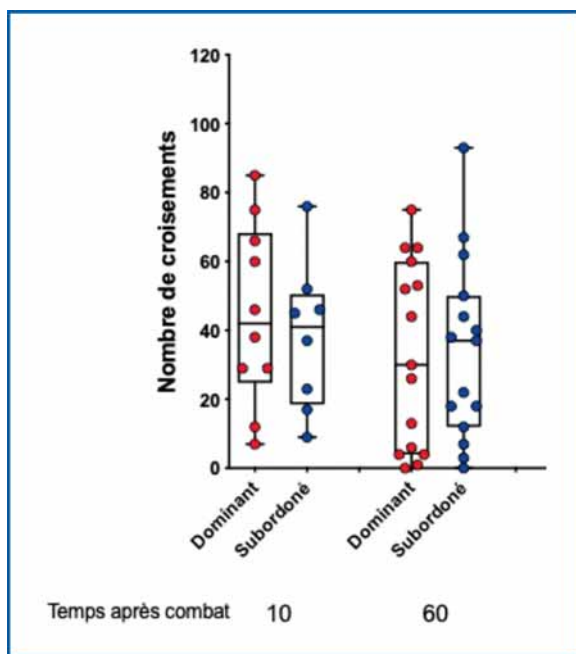
Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Toutes les données ont été soumises à un test de Grubb ( $\alpha = 0,05$ ) pour déterminer si les valeurs extrêmes étaient aberrantes. La plupart des données n'ayant pas passé

le test de normalité de Shapiro-Wilk, des tests statistiques non paramétriques ont été utilisés pour l'analyse des données. Les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les données.

#### Résultats

L'objectif de l'étude était de répondre à la question suivante : Comment le statut de dominance des mâles influence-t-il la réceptivité des femelles ? Pour répondre à cette question, nous avons effectué des tests d'agressivité entre mâles afin d'obtenir des mâles dominants et subordonnés. Nous avons utilisé ces mâles dans différents tests de préférences de cour et avons noté les paramètres comportementaux de cour, de reproduction et de réceptivité des mâles et des femelles. Pour s'assurer que l'expérience des combats n'affecte pas la locomotion des dominants et des subordonnés, nous avons d'abord vérifié les capacités de locomotion des mâles 10 et 60 minutes après les combats. Le nombre total de franchissements de la ligne médiane n'était pas différent entre les deux groupes de mâles (**Fig. 2**), suggérant que si un potentiel phénotype de parade est observé, il ne pourra être attribué à un déficit locomoteur. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que les aptitudes locomotrices seraient différentes de ces résultats si ce paramètre avait été mesuré dans la même chambre expérimentale dans laquelle les mouches se sont précédemment battues. Des essais comportementaux supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur ce point.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié si une expérience de combat positive ou négative (victoire ou défaite) influençait les performances de parade nuptiale des mâles. Pour répondre à cette question, nous avons apparié des mâles dominants, subordonnés et naïfs avec une femelle vierge, 10 et 60 minutes après les expériences de combat des mâles. À partir de là, nous avons quantifié a) les performances pré-accouplement qui reflètent la motivation des mâles à courtiser les femelles, en notant les latences de cour (temps entre la première rencontre et le premier événement de cour du mâle) et d'accouplement (temps entre la première rencontre et l'accouplement), et les capacités de cour des mâles en notant le temps passé par les mâles à courtiser les femelles 10 minutes après le



**Figure 2** : Locomotion des mouches dominantes et subordonnées. 10 et 60 minutes après les combats, aucune différence n'a été observée dans l'activité locomotrice des mâles ayant connu une victoire ou une défaite antérieure (test de Mann-Whitney 10 minutes  $p=0,65$ , 60 minutes  $p=0,99$  ;  $n > 8$ ).

premier événement de cour (CVI = Courtship Vigor Index) et b) les performances post-accouplement en notant le succès de l'accouplement et sa durée. En comparant les performances pré-accouplement des mâles entre les mouches dominantes, subordonnées et naïves, nous avons observé des différences significatives dans la latence de cour. En effet, 60 minutes après les combats, les subordonnées présentaient une latence de cour plus longue par rapport aux mâles naïfs et dominants (**Fig. 3 A**). Cependant, aucune différence n'a été observée dans la latence pour s'accoupler (**Fig. 3 B**) et le CVI (**Fig. 3 C**) aux deux moments après les combats entre les trois groupes de mâles. Ces résultats indiquent que les mâles subordonnés montrent une diminution de la motivation à courtiser 60 minutes après leur défaite. Ensuite, nous avons évalué les performances post-

**“Les mâles subordonnés présentent une diminution de leur motivation à courtiser et une diminution de leur succès d'accouplement.”**

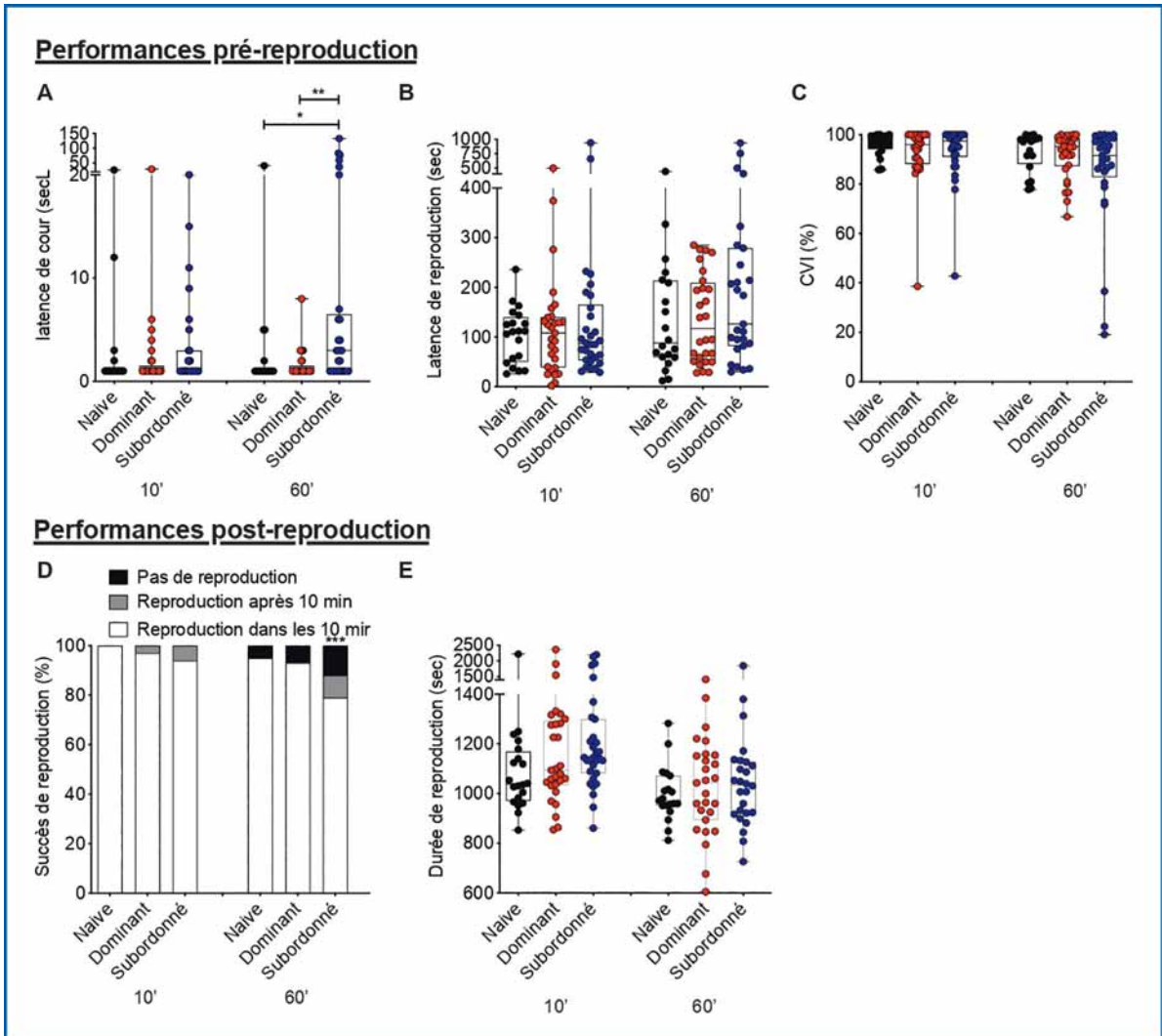
accouplement des mâles en notant le succès et la durée de l'accouplement. Nous avons observé que les subordonnés présentaient un taux de réussite d'accouplement plus faible que les mâles naïfs et dominants 60 minutes après leurs expériences de combat (**Fig. 3 D**). Cependant, lorsque les subordonnés ont réussi à s'accoupler, ils l'ont fait pendant la même durée que les deux autres groupes de mâles (**Fig. 3 E**). Ces résultats démontrent que les mâles subordonnés présentent une diminution de leur motivation à courtiser et une diminution de leur succès d'accouplement, mais seulement 1 heure après leurs expériences de combat.

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandé si la diminution du succès d'accouplement des subordonnés provenait des mâles qui ne détectaient ou ne percevaient pas correctement les femelles, ou provenait des femelles qui rejetaient plus de subordonnés que de mâles dominants ou naïfs. Pour tester ces hypothèses, nous avons effectué deux séries de tests de préférences :

(i) Essais de préférence des mâles. La latence de cour plus longue des subordonnés (**Fig. 3 A**) pourrait être attribuée à une diminution de la perception sensorielle après avoir subi une défaite. Cependant, si les mâles dominants et subordonnés sont capables de percevoir correctement la femelle, ils passeraient beaucoup plus de temps à interagir avec les mouches femelles. Pour tester cela, 60 minutes après les combats, les mâles

dominants et subordonnés ont pu interagir avec un mâle ou une femelle immobilisé et naïf. Nous avons quantifié le temps passé par les mâles domi-

nants et subordonnés à interagir avec des mâles et ces femelles naïfs immobilisés. Nous avons observé que les deux groupes de mâles passent significativement plus de temps à interagir avec les femelles qu'avec les mâles (**Fig. 4 A**). A partir de ces résultats, nous avons calculé un indice de préférence basé soit sur le temps passé à rencontrer les femelles, soit sur le temps passé à faire vibrer leurs ailes. Un indice de préférence de 1 indiquerait que les mâles dominants et subordonnés ont consacré tout le temps du test à



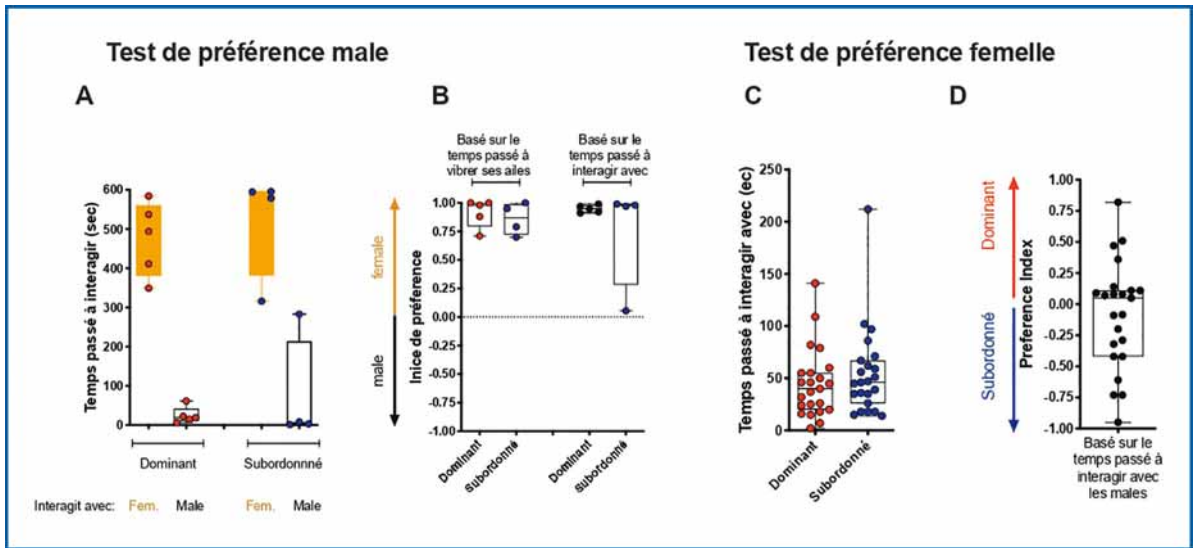
**Figure 3** : Performances pré et post accouplement des mâles naïfs, dominants et subordonnés 10 et 60 minutes après leurs expériences de combat. A. Les subordonnés présentent une latence de cour significativement plus élevée 60 minutes après les combats par rapport aux mâles naïfs et dominants (Kruskal-Wallis 12,36, post-test de Dunn,  $**p < 0,001$  ;  $n > 20$ ). B. La latence de reproduction et C. l'indice de vigueur de cour ne diffèrent pas entre les trois groupes de mâles (Kruskal-Wallis, post-test de Dunn,  $p > 0,05$ ). D. Le pourcentage de succès de reproduction est significativement diminué dans le groupe subordonné 60 minutes après les combats (test Chi2 bilatéral = 53,89,  $p < 0,0001$ ,  $n > 20$ ). E. La durée de l'accouplement n'est pas statistiquement différente entre les groupes (Kruskal-Wallis, post-test de Dunn,  $p > 0,05$ ).

interagir avec la femelle ou à faire vibrer leurs ailes envers les femelles. Les résultats présentés dans la figure 4 B indiquent clairement que les mâles dominants et subordonnés préfèrent interagir avec les femelles plutôt qu'avec les mâles. Ces résultats démontrent que les expériences de combat n'ont pas d'impact sur la capacité à détecter et percevoir les femelles des mâles, suggérant que les mâles subordonnés,

60 minutes après leur défaite, préféraient autant que les mâles dominants interagir avec les femelles. Ces résultats montrent que la perception sensorielle n'est pas affectée après des expériences de combat défaites.

**(ii) Essais de préférence des femelles.** Pour tester l'effet de la communication chemosensorielle sur la réceptivité des femelles, des mâles dominants et les subordonnés ont



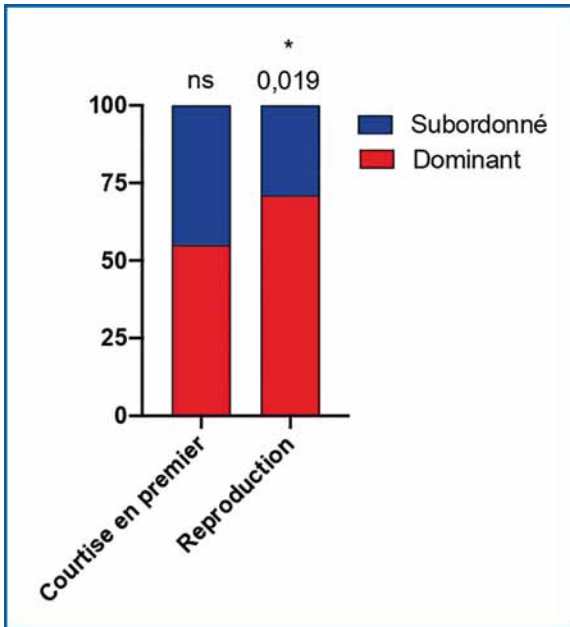


**Figure 4** : Test de préférence de cour des mâles 60 minutes après l'expérience de combat. A. Les mâles dominants et subordonnés ont passé significativement plus de temps à interagir avec les femelles qu'avec les mâles (test de Mann-Whitney dominant  $p=0,0079$ , subordonné  $p=0,028$  ;  $n=5$ ). B. Indice de préférence des mâles dominants et subordonnés basé soit sur le temps passé à vibrer une aile, soit sur le temps passé à se rencontrer. Les deux groupes de mâles préféraient interagir avec les femelles. Test de préférence des femelles. C. Lorsqu'on donne le choix d'interagir avec des dominants et des subordonnés qui ont été décapités 60 minutes après leurs expériences de combat, aucune différence n'a été observée. Les femelles ont passé autant de temps à interagir avec les dominants ou les subordonnés (test de Mann-Whitney : dominant  $p=0,0079$ , subordonné  $p=0,028$  ;  $n=23$ ). D. L'indice de préférence n'a révélé aucune préférence pour les dominants ou les subordonnés.

été immobilisés sur la ressource alimentaire, 60 minutes après leurs expériences de combat. Les femelles vierges étaient autorisées à explorer l'arène. Ensuite, nous avons mesuré la préférence des femelles en notant le temps passé à interagir avec l'un ou l'autre des mâles. En comparant le temps passé par les femelles naïves à interagir avec les mâles dominants ou subordonnés décapités, aucune différence n'a été trouvée (**Fig. 4 C**). En conséquence, l'indice de préférence n'a révélé aucune préférence de la part des femelles, elles ont passé autant de temps à interagir avec les dominants ou les subordonnés (**Fig. 4 D**), révélé par un indice de préférence de 0. Ces résultats montrent que les femelles n'ont aucune préférence pour les dominants ou les subordonnés lorsqu'elles sont immobilisées par décapitation 60 minutes après leurs expériences de combat, et suggèrent que, dans ces conditions expérimentales, les indices chemo-sensoriels seuls ne sont pas suffisants pour conduire la préférence.

Enfin, pour vérifier si les femelles présentent des préférences d'accouplement avec des mâles

dominants et subordonnés, nous avons mis en place un test de compétition de cour dans lequel les femelles pouvaient choisir de s'accoupler avec des mâles dominants ou subordonnés. Dans cette série d'expériences, les mâles dominants et subordonnés ont été placés dans un test de compétition de parade nuptiale, permettant à la femelle de choisir son partenaire reproducteur. Pour cela, 60 minutes après l'expérience de combat des mâles, une femelle vierge a été insérée dans la chambre expérimentale où les mâles dominants et subordonnés se sont précédemment battus et ont attendu séparément. Les deux mâles ont pu courtiser la femelle et celle-ci a pu choisir avec qui s'accoupler. À partir de ces tests, nous avons mesuré la réceptivité des femelles en notant les préférences d'accouplement. Dans ces conditions, nous avons observé que même si les mâles dominants et subordonnés avaient la même chance de courtiser la femelle en premier (**Fig. 5**), les mâles dominants présentaient des avantages d'accouplement (**Fig. 5**). En effet, les dominants étaient plus susceptibles de copuler avec les femelles que les subordonnés (**Fig. 5**). Ces



**Figure 5** : Test de préférence des femelles. 60 minutes après les combats, une femelle a été insérée dans l'arène de combat. Dans ces conditions, les mâles dominants et subordonnés avaient les mêmes chances de courtiser les femelles en premier, mais les mâles dominants étaient plus susceptibles de s'accoupler avec les femelles (test Chi2 bilatéral = 5,45,  $p < 0,0001$ ,  $n=31$ ).

résultats démontrent qu'en compétition les uns avec les autres, les mâles dominants avaient plus de chance de s'accoupler avec les femelles. Ces résultats suggèrent également que les femelles pourraient présenter une réceptivité accrue pour les individus dominants.

## Conclusion

L'objectif de cette étude était d'examiner les effets du statut de dominance sur le succès de reproduction des animaux. Les résultats obtenus ont permis de faire la lumière sur certains de ces aspects. Nous avons pu mettre en évidence certaines conséquences d'expériences de combat sur le succès reproductif des mâles. En particulier, les mâles subordonnés semblent présenter des désavantages d'accouplement dans une fenêtre temporelle spécifique après l'expérience de combat. En effet, les effets négatifs ont été observés seulement 1 h après l'expérience de combat des animaux. Les mâles subordonnés présentent une diminution de leur motivation à courtiser les femelles ainsi que des désavantages

d'accouplement par rapport aux mâles dominants 60 minutes après leur défaite. En essayant de comprendre les causes de ces désavantages d'accouplement des subordonnés, nous avons observé qu'ils pouvaient résulter à la fois des mâles et des femelles. D'une part, les mâles subordonnés ont une motivation diminuée à courtiser les femelles, même s'ils semblent les percevoir correctement. D'autre part, les femelles montrent une diminution de leur réceptivité face aux subordonnés en étant plus susceptibles de se reproduire avec les mâles dominants, même si elles n'ont pas de préférences pour interagir avec des dominants immobilisés. Par conséquent, la diminution du succès d'accouplement des subordonnées résulte probablement d'une combinaison du comportement des mâles et de la réceptivité des femelles. Ainsi, des investigations plus poussées sur les causes ultimes et proximales sont nécessaires pour comprendre ce désavantage reproductif.

Des études récentes ont également démontré que des expériences de défaite de combat peuvent avoir un impact négatif sur la latence à courtiser les femelles (28). Ici, nous avons montré qu'elle est seulement attribuée à la motivation pour commencer à courtiser et non pas à leurs aptitudes de cour. En effet, les mâles subordonnés qui courtisent les femelles montrent un indice de vigueur de cour normal (temps total pendant lequel les mâles ont un comportement de cour pendant 10 minutes après le premier événement de cour). Cependant, lorsque l'on analyse l'indice de parade nuptiale (temps total pendant lequel les mâles ont eu un comportement de parade nuptiale de  $t_0$  à  $t_{10}$  min) (28), ce paramètre est diminué chez les mâles subordonnés. Cette différence entre les deux indices peut être facilement expliquée par le fait que les mâles subordonnés présentent une latence de cour plus élevée, diminuant ainsi la fenêtre de temps d'observation. En accord avec ce qui a été trouvé par Filice et al. en 2019, nous trouvons que les mâles subordonnés présentent une durée d'accouplement plus longue que les mâles dominants, même si ce résultat n'était pas statistiquement différent dans notre étude. Par conséquent, les interactions agressives pourraient avoir des conséquences importantes sur le succès reproductif des mâles, avec un avantage pour les mâles dominants. Dans les tests de cour, les dominants s'accouplent presque toujours avec les femelles

pendant les 10 premières minutes d'observation, tandis que les subordonnés présentent une diminution du succès de reproduction. En outre, dans les tests de compétition de cour, les dominants et les subordonnés ont la même chance de courtiser les femelles en premier, mais la probabilité de s'accoupler avec les dominants est nettement plus élevée. Le succès de reproduction accru des dominants pourrait s'expliquer par des différences d'attractivité des mâles. Une possibilité est que l'expérience du combat puisse affecter l'expression ou la libération de certains hydrocarbures cuticulaires. Des études futures sont nécessaires pour déterminer si les profils d'hydrocarbures cuticulaires sont différents entre les mâles dominants et les mâles subordonnés.

Dans l'ensemble, les résultats de ce projet contribuent à améliorer notre compréhension de la façon dont la communication du statut de dominance du mâle dicte les réponses comportementales des congénères pour augmenter leur chance de reproduction.

### Remerciements

Je remercie la Fondation Fyssen pour son soutien durant mes premières années au Centre de Recherche sur la Cognition Animale (CRCA), Toulouse. Je remercie également les étudiants et les personnes de l'équipe IVEP du CRCA pour leur participation au projet, la collecte et l'analyse des données.

### Bibliographie

- 1. M. P. Fernandez, E. A. Kravitz, Aggression and courtship in *Drosophila*: pheromonal communication and sex recognition. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **199**, 1065-1076 (2013).
- 2. J. Y. Yew, H. Chung, *Drosophila* as a holistic model for insect pheromone signaling and processing. *Current opinion in insect science* **24**, 15-20 (2017).
- 3. S. Chen, A. Y. Lee, N. M. Bowens, R. Huber, E. A. Kravitz, Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5664-5668 (2002).
- 4. S. Trannoy, J. Penn, K. Lucey, D. Popovic, E. A. Kravitz, Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4818-4823 (2016).

- 5. L. Wang, D. J. Anderson, Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature* **463**, 227-231 (2010).
- 6. L. Wang *et al.*, Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **14**, 757-762 (2011).
- 7. S. Teseo, L. Veerus, F. Mery, Fighting experience affects fruit fly behavior in a mating context. *Naturwissenschaften* **103**, 38 (2016).
- 8. T. Järvi, The Effects of Male Dominance, Secondary Sexual Characteristics and Female Mate Choice on the Mating Success of Male Atlantic Salmon *Salmo salar*. *Ethology*, 123-132 (1990).
- 9. A. Qvarnström, E. Forsgren, Should females prefer dominant males? *Trends Ecol Evol* **13**, 498-501.
- 10. K. E. Holekamp, E. D. Strauss, Aggression and dominance: an interdisciplinary overview. *behav sci*, 44-51 (2016).
- 11. D. C. S. Filice, R. Dukas, Winners have higher pre-copulatory mating success but losers have better post-copulatory outcomes. *Proc Biol Sci* **286**, 20182838 (2019).
- 12. C. J. Barnard, T. Burk, Dominance hierarchies and the evolution of "individual recognition". *J Theor Biol* **81**, 65-73 (1979).
- 13. P. Shaw, K. Ocorr, R. Bodmer, S. Oldham, *Drosophila* aging 2006/2007. *Experimental gerontology* **43**, 5-10 (2008).
- 14. M. Heisenberg, Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* **4**, 266-275 (2003).
- 15. K. S. Ho, A. Sehgal, *Drosophila melanogaster*: an insect model for fundamental studies of sleep. *Methods in enzymology* **393**, 772-793 (2005).
- 16. F. W. Wolf, U. Heberlein, Invertebrate models of drug abuse. *J Neurobiol* **54**, 161-178 (2003).
- 17. A. Baier, B. Wittek, B. Brembs, *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? *J Exp Biol* **205**, 1233-1240 (2002).
- 18. E. A. Kravitz, M. P. Fernandez, Aggression in *Drosophila*. *Behav Neurosci*, (2015).
- 19. A. Yurkovic, O. Wang, A. C. Basu, E. A. Kravitz, Learning and memory associated with

aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17519-17524 (2006).

- 20. E. Vrontou, S. P. Nilsen, E. Demir, E. A. Kravitz, B. J. Dickson, fruitless regulates aggression and dominance in *Drosophila*. *Nat Neurosci* **9**, 1469-1471 (2006).

- 21. M. J. van Staaden, W. A. Searcy, R. T. Hanlon, Signaling aggression. *Adv Genet* **75**, 23-49 (2011).

- 22. P. Lindenfors, B. S. Tullberg, Evolutionary aspects of aggression the importance of sexual selection. *Adv Genet* **75**, 7-22 (2011).

- 23. J. Y. Yew, H. Chung, Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Prog Lipid Res* **59**, 88-105 (2015).

- 24. J. J. Krupp *et al.*, Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* **18**, 1373-1383 (2008).

- 25. J. P. Farine, J. F. Ferveur, C. Everaerts, Volatile *Drosophila* cuticular pheromones are affected by social but not sexual experience. *PLoS One* **7**, e40396 (2012).

- 26. J. C. Billeter, J. Atallah, J. J. Krupp, J. G. Millar, J. D. Levine, Specialized cells tag sexual and species identity in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **461**, 987-991 (2009).

- 27. M. P. Fernandez *et al.*, Pheromonal and behavioral cues trigger male-to-female aggression in *Drosophila*. *PLoS Biol* **8**, e1000541 (2010).

- 28. Y. K. Kim *et al.*, Repetitive aggressive encounters generate a long-lasting internal state in *Drosophila melanogaster* males. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 1099-1104 (2018).

- 29. S. Trannoy, B. Chowdhury, E. A. Kravitz, A New Approach that Eliminates Handling for Studying Aggression and the "Loser" Effect in *Drosophila melanogaster*. *J. Vis. Exp.* **106**, e53395 (2015).

- 30. S. Trannoy, *et al.*, Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 4818-4823 (2016).

- 31. Y. Hsu, *et al.*, Modulation of aggressive behaviour by fighting experiences: mechanisms and contest outcomes. *Biol Rev Camb Philos Soc* **81** 33-74 (2006).

## Introduction

To initiate an appropriate behavioral response, an animal meeting a conspecific must identify, integrate and process the sensory signals from the surrounding environment, in combination with its past experiences and internal state. Indeed, the wrong identification on the status and sexes of conspecifics can lead to detrimental decision-making impacting animal's survival and reproduction. Wild males often display aggressive behaviors and engage in fights, creating dominance relationships allowing to gain access to food, mates and territory (10). A positive correlation between male dominance status and reproductive success has been observed in several species (7-9, 11), suggesting crucial roles for fighting experiences in influencing animal's fitness. However, male's reproductive success also largely depends on females' receptivity. In this respect, males have developed chemical cues and morphological appendage, which are honest signals to communicate their social status and increase their reproductive fitness(12).

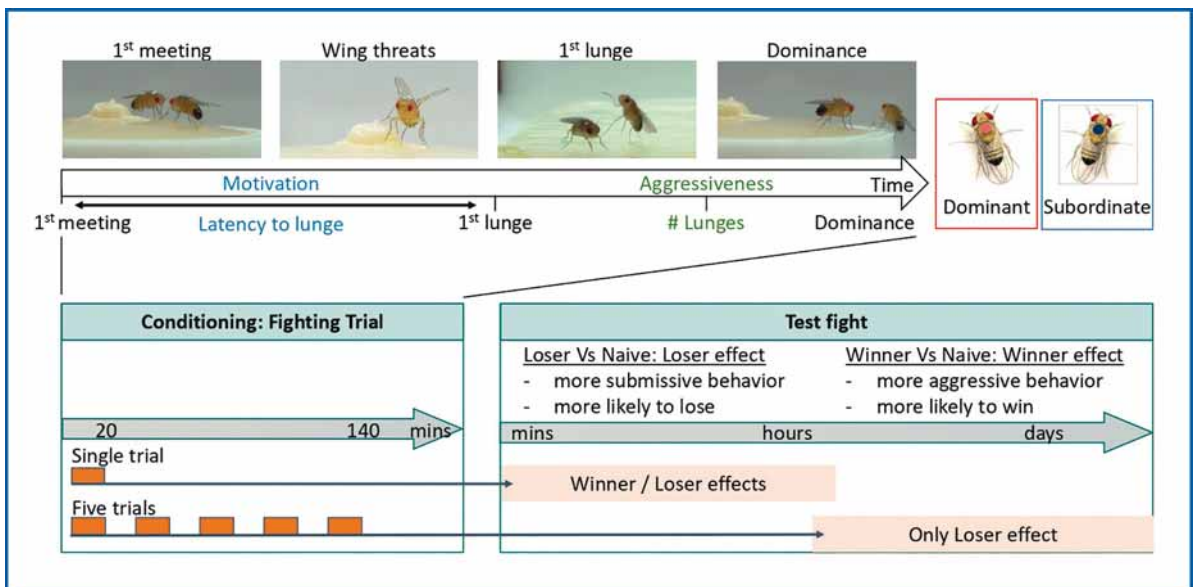
The fruit flies *Drosophila melanogaster* represents a valuable model system, and its use has shed light into many biological processes of medical interest, such as aging(13), memory(14), sleep deprivation(15), and drug abuse(16). It offers nearly unlimited genetic tractability and has a simple brain compared to vertebrate model systems, with 1.000-10.000 times less neurons. Moreover, it has emerged as an important model to investigate the neural and molecular mechanisms underlying aggression(3, 17, 18). In competition for food, mates and territory, male flies employ a series of stereotypical behavioral patterns (Fig. 1). This starts with the opponents approaching each other and exchange of sensory information. The animals display visual threats before engaging in physical contests with the use of lunges. As a fight progresses, both flies modify their fighting strategies: one chases and lunges at its opponent and shows territorial behaviors, while the other retreats from the resources to avoid new confrontation(3, 4, 19). Based on the lunge behavior, we can estimate the motivation of flies to engage in fight by calculating the latency to lunge, and the aggressiveness level of the animals by scoring the total number of lunges during a fixed amount of time (Fig. 1). The

repeated use of lunges by one fly results in formation of a dominance relationship with clear dominant and subordinate males. Both males and females exhibit aggressive behaviors in same sex pairing(20), however, only males establish stable dominance relationships.

Although an innate behavior, aggression is also highly adaptive, in which learning and memory play critical roles in modulating aggressiveness. Animals modify their fighting strategies during agonistic bouts and learn from their previous fighting experiences to influence future fighting decision-making (19, 28-30). We previously demonstrated that following single fighting bouts, both dominant and submissive flies present “winner and loser internal states” that result in formation of short-term memories. These decay over several hours, with the temporal dynamic dependent on the level of familiarity of the opponents (30) (**Fig. 1**). Experiencing repeated defeats induce long-lasting behavioral consequences and formation of long-term losing memory that requires protein synthesis. Experiencing repeated victories do not lead to such

long-term winner effect (Trannoy et al, 2016) (**Fig. 1**). These losing and winning memories are observed in almost all animal species including humans (31) and likely reflect adaptive and evolutionary mechanisms, potentially by influencing animals’ reproductive fitness.

Aggressive behavior and other social interactions are also greatly influenced by conspecific communication and individuals’ recognition(21). Also, displaying a costly but honest signal to convey strength and individual’s quality, have been often favored in the animal kingdom (colorful plumage, vocalizations, or releasing odors perceived by conspecifics). These morphological and chemical signals used by conspecifics to assess opponents fighting abilities, have ultimately conferred mating advantages, making communication of social status an adaptive trait shaped by evolution(22). In *Drosophila*, like in other insects, when a male fly encounters another fly at close range, the decision to fight or court largely relies on detection of cuticular hydrocarbons (CH) that coat the fly’s cuticle. CH such as pheromones are used to



**Figure 1:** Dynamic of fights between male fruit flies. Based on the lunge aggressive pattern, the males’ fighting motivational state and level of aggressiveness are estimated by measuring 1) the latency to lunge (i.e., time between the first meeting and the display of first lunge) and 2) the number of lunges. The “Fighting trial” represents the conditioning protocol where dominants and subordinates are generated, and the “Test fight” consists of pairing the previous loser and winner with a naive opponent to assess the formation of loser/winner effects. A single fighting trial induces both short-term winner/loser effects, while five repeated fighting trials separated by 10 mins of rest, generate only longer-term losing memory that is dependent on de novo protein synthesis.

communicate sex, age, receptivity or social experiences to conspecifics(23). In addition, the composition of CH profile evolves over the animals' lifetime, is influenced by a variety of modalities including social experiences and in return, regulates social behaviors(24, 25). In flies, CH are mostly synthesized in cells called oenocytes (oe)(26). Flies lacking oe (oe-less) show reduced CH level and are not recognized by conspecifics(6, 27). Also, aggression is abolished towards flies lacking CH, but fully restored when those flies are perfumed with specific pheromones(6). Altogether, these findings show that a very subtle chemical language is used for communication and recognition, and regulates social interactions (e.g., male-female courting or male-male competition) in *D. mel.*

Currently, the majority of the studies focus on identifying the causes of aggression, however, the consequences of such behavior that can be costly for individuals, are less documented. Previous studies have shown that fight outcome influences male reproductive success. Defeats tend to double the males' latency to court and increase the latency to mate(7, 11, 28). Filice et al, 2019, also showed that winners mated for about 820 sec, while losers for 860 sec, suggesting an increase of mating duration along with an increase of about 10 offspring in average(11). Therefore, we further wanted to investigate how a single defeat can affect males' fitness. For this, we analyzed the effect of a single victory and defeat on males' locomotion and reproductive performances. In accordance with the literature, we showed that subordinate males have an increase latency to court female, but no effect were observed on the mating latency and duration. We demonstrated that this decrease in males' motivation to court could not be attributed to a decrease of females' perception. Finally, we showed that females preferred to mate with dominant males.

## Methods

### Flies

The *Drosophila melanogaster* Canton-Special (CS) strain was used for this study. Flies were raised on standard food medium at 25 °C and 50 % relative humidity under a 12:12 hr light:dark cycle.

### Experimental chamber

The experimental setup used in this study to examine social behaviors has already been described (29). Briefly, a divider was inserted through the top of the arenas (22mm diameter × 16mm height) which contained a food cup (13mm diameter × 6mm height) separating them into two equal sizes. Flies were then inserted on each side of the arenas by negative geotaxis, so they can acclimate without interacting with each other. Behavioral experiments start once the separator was removed allowing flies to interact together.

### Behavioral assays

Behavioral assays were performed in experimental chambers that involves minimal handling of flies(29). Males and females were reared in social isolation from late pupal, through eclosion to the time of the behavioral experiments in glass vials containing 1.5 mL of standard fly food. Behavioral assays were performed with 7-days old flies during the first 3 hours of the daily light cycle at 25°C and 50% relative humidity.

#### 1) Aggression assays

The experimental protocol was previously described in Trannoy, *et al.* Flies were anesthetized with CO<sub>2</sub> 48 hours before the behavioral assays and a dot of acrylic paint was applied on the dorsal thorax to facilitate visual tracking of individual flies. Food cups with standard fly food and a drop of yeast paste on the surface were used as an attractive resource in all fights. We defined subordinate males as the individuals that retreated at least 3 times from the food cup after receiving lunges. After 20 minutes of fights, we inserted the divider to separate dominants and subordinates. Then, they were tested in locomotion, courtship or preferences assays described below.

#### 2) Locomotion

10 and 60 minutes after fights, dominants and subordinates were inserted alone in a novel and empty experimental chamber and we counted the number of midlines crossing for 5 minutes after 1 minute of acclimation.

#### 3) Courtship assays

We performed courtship assays 10 and 60 minutes after fights by pairing one dominant or subordinate male with one virgin female in

experimental chamber without food cup. Courtship Vigor Index (CVI) was calculated as the fraction of time that males spent courting the female (including tapping, wing extension and vibration, chasing and attempted copulation) during a 10-min period after the first courtship behavior. The latencies to court and to copulate were the times between the first meeting and the first courtship behavior or the initiation of copulation.

#### 4) Male preference assays

60 minutes after fights, dominant and subordinate males were inserted into a novel experimental chamber containing a food cup. One immobilized virgin female and naïve male were placed on opposite side of the food cup. Time spent to interact with either immobilized female and male were scored to obtain the total portion of time spent with each, and a preference index. An index of 1 would reflect that males spent all the observation time interacting with the immobilized female, while an index of -1, that the male spent all the observation time interacting with the immobilized male.

#### 5) Female preference assays

One virgin female was inserted within an experimental chamber containing a food cup on which were placed immobilized dominant and subordinate males 60 minutes after their fighting experiences. Females were allowed to interact with immobilized males. From this, we calculated the total time spent interacting with experienced males, and deducted a preference index ranging from -1 to 1. An index of 1 would reflect that female spent all the observation time interacting with the dominant males, while an index of -1, with the subordinate males.

#### 6) Female Courtship Competition assays

60 minutes after fights - during this period of time, both dominant and subordinate males were still in the experimental chamber where they fought but separated from each other -, a virgin female was inserted. We observed which males displayed the first courtship event (one-wing extension), and which males succeed to copulate with the female.

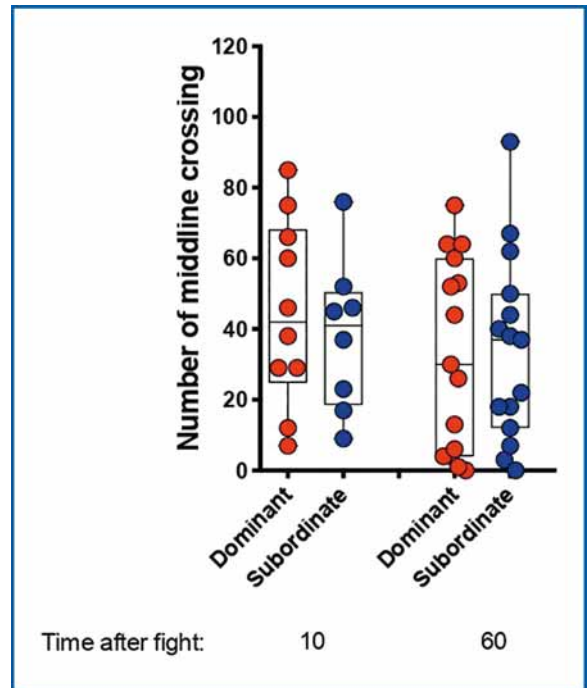
#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA). All data were subjected to a Grubb's test

( $\alpha = 0.05$ ) to determine whether extreme values were outliers. Since most of the dataset did not pass a Shapiro-Wilk normality test, non-parametric statistical tests were used for data analysis. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare data.

## Results

The aim of the study was to answer the following question: How does male dominance status influence female receptivity? To tackle this question, we performed male-male aggression assays to obtain dominant and subordinate males, and use these males in various courtship preferences assays and scored courtship, reproductive and receptivity behavioral parameters from both males and females. To ensure that fighting experience does not affect locomotion of dominants and subordinates, we first verified the locomotion capacities of males 10 and 60 minutes after fights. The total number of midline crossings were not different between the two groups of males (**Fig. 2**), demonstrating that any court-



**Figure 2:** Locomotion of dominant and subordinate flies. 10 and 60 minutes after fights, no differences were observed in the locomotor activity of males that experienced a previous victory or defeat (Mann-Whitney test 10 minutes  $p=0,65$ , 60 minutes  $p=0,99$ ;  $n > 8$ ).

ship phenotype could not be attributed to locomotor deficit. However, we can't exclude that the locomotion pattern would be different from these results if this parameter would have been measured in the same experimental chamber in which flies previously fought. Additional behavioral assays are required to conclude on this point.

In a first set of experiments, we asked whether a positive or negative fighting experience (victory vs defeat) influence males' courtship performances. To answer this, we paired dominant, subordinate and naïve males with a socially naïve and inexperienced female for courtship assays, 10 and 60 minutes after male's fighting experiences. From this, we quantified a) the pre-mating performances that reflects the males' courtship motivation by scoring the latencies to court (time between first meeting and first male's courtship event) and to mate (time between first meeting and mating), and the males' courtship capacities by scoring the

time spend by males courting the females 10 minutes after the first courtship event (CVI = Courtship Vigor Index) and b) the post-mating performances by scoring the mating success and mating duration. When comparing the males' pre-mating performances between dominant, subordinates and naïve flies, we observed significant differences in the latency to court the female. Indeed, 60 minutes after fights, subordinates presented an increase latency to court compared to the naïve and dominant males (Fig. 3 A). However, no differences were seen in the latency to mate (Fig. 3 B) and the CVI (Fig. 3 C) at both timing after fights between the three groups of males. These results indicate that subordinate males show a decrease of the courting motivation 60 minutes after their defeat. Then, we assessed the post-mating performances of males by scoring the mating success and duration. From these, we observed that subordinates presented a lower mating success rate than naïve and dominant males 60 minutes after their fighting experiences (Fig. 3 D). However, when subordinates did succeed at copulating, they mated for the same duration than the two other groups of males (Fig. 3 E). These results demon-

strate that subordinate males present a decrease of their motivation to court and a decrease of their mating success, but only 1 hour after their fighting experiences.

Following these results, we wondered whether the decreased of subordinates' mating success came from the males because they would not detect or perceive correctly the females, or came from the females because they would reject more subordinates than dominant or naïve males. To disentangle these two hypotheses, we performed two sets of preferences assays:

**(i) Male preference assays.** The increased latency to court the females by subordinates (Fig. 3 A) could be attributed to a decreased of sensory perception after having experienced a defeat. However, if dominant and subordinate males are able to perceive correctly the female, they would spend significantly more time interacting with the

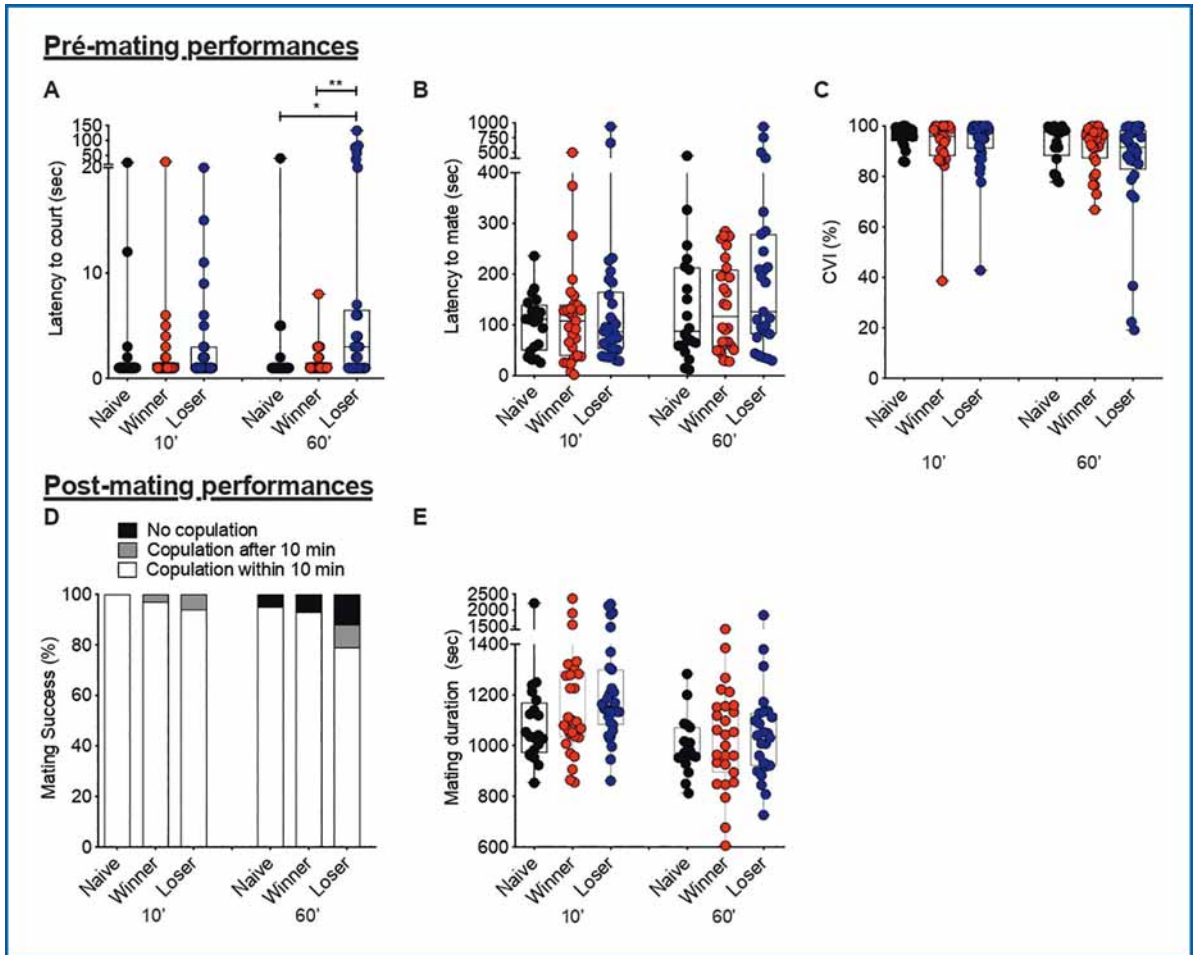
female flies. To test this, 60 minutes after fights, dominant and subordinate males were allowed to interact

with either an immobilized and naïve male or female. We quantified the time spend by dominant and subordinate males interacted with either immobilized naïve males and females. We observed that both groups of males spend significantly more time interacting with the females than with the males (Fig. 4 A). From this scoring, we calculated a preference index based on either the time spend to meet with female or the time spend to vibrate their wings. A preference index of 1 would reflect that dominant and subordinate male dedicated all the time of the assay interacting with the female or vibrating their wings towards the females. The results presented in Fig. 4 B clearly indicate that both dominant and subordinate males preferred interacting with the females than the males. These results demonstrate that fighting experiences don't impact the ability to detect and perceive females from males, suggesting that subordinate males, 60 minutes after their defeat preferred as much as dominant males interacting with females. These results show that sensory perception is not affected after defeated fighting experiences.

**(ii) Female preference assays.** To test the effect of chemosensory communication on

**“Subordinate males present a decrease of their motivation to court and a decrease of their mating success.”**



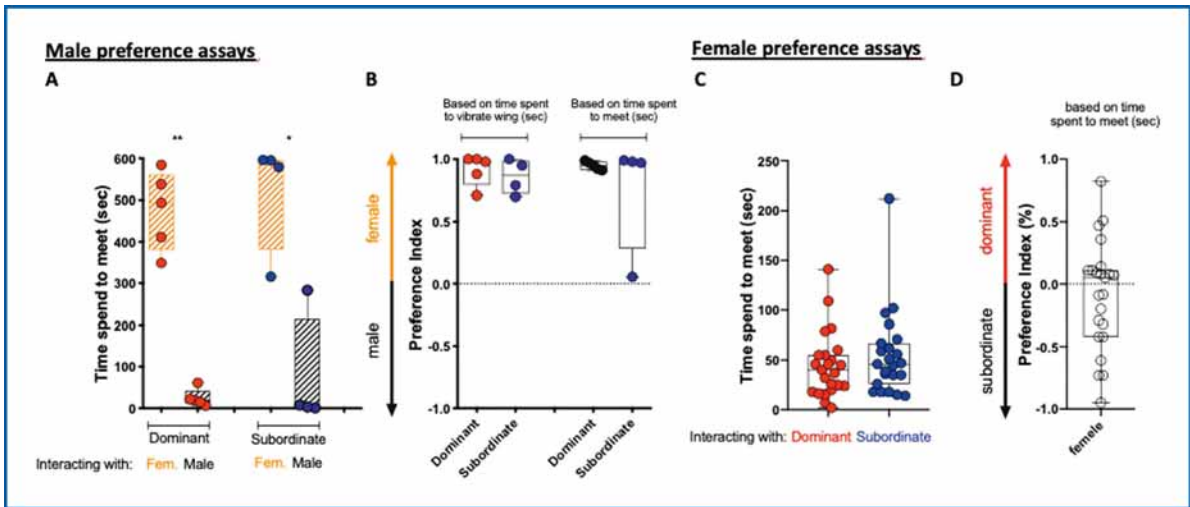


**Figure 3:** Pre and post-mating performances from naïve, dominant and subordinate males 10 and 60 minutes after their fighting experiences. A. Subordinates present a significantly increased latency to court 60 minutes after fights compared to naïve and dominant males (Kruskal-Wallis 12,36, Dunn's post-test,  $**p < 0,001$ ;  $n > 20$ ). B. The latency to mate and C. the Courtship Vigor Index did not differ between the three groups of males at both timing after fight (Kruskal-Wallis, Dunn's post-test,  $p > 0,05$ ). D. The percentage of mating success was significantly decreased in the subordinate group 60 minutes after fights (two-tailed Chi2test = 53,89,  $p < 0,0001$ ,  $n > 20$ ). E. The mating duration was not statistically different between groups (Kruskal-Wallis, Dunn's post-test,  $p > 0,05$ ).

females' receptivity, dominants and subordinates were immobilized, 60 minutes after their fighting experiences, during the behavioral assays while intact females were allowed to explore the arena. Then, we measured females' preference by scoring the time spent interacting with either male. When comparing the time spent by naïve females interacting with either decapitated dominant or subordinate males, no differences were found (Fig. 4 C). Accordingly, the preference index did not reveal any preferences by the females, they spent as much time interacting the dominants or sub-

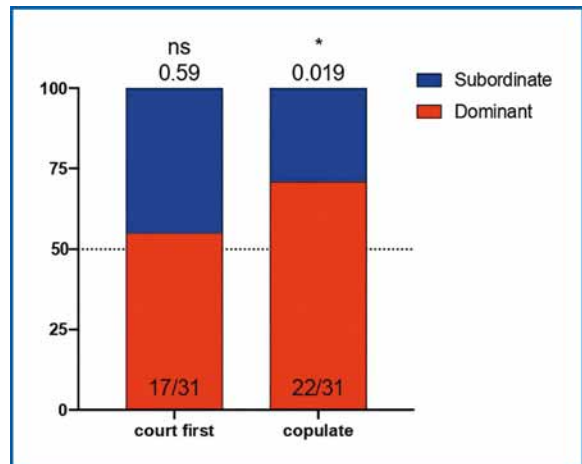
ordinates (Fig. 4 D), revealed by a preference index of 0. These results show that females do not have any preferences for dominants or subordinates when immobilized by decapitation 60 minutes after their fighting experiences, and suggest that, in these experimental conditions, chemosensory cues only are not sufficient to drive preference.

Finally, to test whether females present mating preferences between dominant and subordinate males, we setup a courtship competition assay in which females could choose to



**Figure 4:** Male courtship preference assays 60 minutes after fighting experience. A. Both dominant and subordinate males spent significantly more time interacting with the females than with males (Mann-Whitney test dominant  $p=0,0079$ , subordinate  $p=0,028$ ;  $n=5$ ). B Preference Index of dominant and subordinate males based on either the time spent to vibrate wing or time spent to meet. Both groups of males preferred interacting with females. Female preference assays. C. When giving the choice of interacting between dominants and subordinates that were decapitated 60 minutes after their fighting experiences, no differences were observed. Females spent as much as time interacting with dominant or subordinates (Mann-Whitney test dominant  $p0,0079$ , subordinate  $p=0,028$ ;  $n=23$ ). D. The preference index revealed no preference for either dominants or subordinates.

mate with either dominant or subordinate males. In this set of experiment, both dominant and subordinate males were placed in a courtship competition assay, allowing the female to choose its reproductive partner. For this, 60 minutes after males' fighting experience, a virgin female was inserted within the experimental chamber where dominant and subordinate males previously fought and waited separately. The two males were able to court the female and the female was able to choose with whom to mate. From this assay, we measured females' receptivity by scoring the mating preferences. In these conditions, we observed that even though both dominant and subordinate males had the same chance to court first the female (Fig5), dominant males presented mating advantages (Fig5). Indeed, dominants were more likely to copulate with the females than subordinates (Fig5). These results demonstrate that in competition with each other, dominant males had more chance to mate with the females. These results also suggest that females might present an increased receptivity for dominant individuals.



**Figure 5:** Females preferences assays. 60 minutes after fights, females were inserted into the experimental chamber. In these conditions, dominant and subordinate males presented the same chance to court first the females, but dominant males were more likely to mate with the females (two-tailed Chi2test = 5,45,  $p < 0,0001$ ,  $n=31$ ).

## Conclusion

The goal of this study was to investigate the fitness benefit for animals to communicate their dominance after fighting experiences. The results obtained allowed to shed light on some of these aspects. We were able to highlight crucial consequences of fighting experiences on males' reproductive success. Particularly, subordinate males seem to present mating disadvantages at a specific time window after fighting experience. Indeed, the effects were observed only 1h after the fighting experience of the animals. Subordinate males presented a decreased of their motivation to court females as well as mating disadvantages over dominant males 60 minutes after their defeat. Trying to understand the causes of this subordinates' mating disadvantages, we observed that it might result from both males' and females' sides. On one hand, subordinates showed a decreased to start courting females, even though they seemed to perceive them correctly. On the other hand, females showed a decreased of receptivity as they are more likely to copulate with dominants, even though they did not have preferences for interacting with immobilized dominants. Therefore, the decreased subordinates' mating success likely results from a combination of males' behavior and females' receptivity. Further investigations on the ultimate and proximate causes of this observation are the following steps to understand this negative consequence for defeated males.

These results are in accordance with the literature. Recent studies have also demonstrated that previous defeats may negatively impact the latency to court females(28). Here, we showed that it is attributed to the motivation to start courting, as when previously defeated males start courting, they performed normally, which is reflected by a normal Courtship Vigor Index (total time when males perform courtship behavior for 10 minutes after the first courtship event). However, when analyzing the Courtship Index (total time when males perform courtship behavior from t0 to t10 min)(28), this parameter

was decreased in the loser flies. This discrepancy between the two indexes can be easily explained by the fact that losers present an increased latency to court, therefore decreasing the observation time window. In line with what have been found by Filice et al, 2019, previously defeated males seem to present a tendency to have an increase mating duration even though this result was not statistically different in our study. Therefore, the outcome of aggressive interactions might have important consequences for males' reproductive success. When looking at the effect of fighting experiences on reproductive success, we found that dominant males presented mating advantages over subordinates. In classic courtship assays, dominants almost always mated with the females during the first 10 minutes of observation while losers presented a reduction of the mating success. In addition, in courtship competition assays, both dominants and subordinates present the same chance to court the females first, however, the likelihood of mating with the dominants is significantly increased. The increased mating success of dominants might be explained by differences in male attractiveness. One possibility is that fighting experience might affect expression or release of some cuticular hydrocarbons. Future studies are necessary to investigate whether cuticular hydrocarbon profiles are different between dominant and subordinate males.

Altogether, the results of this project contribute to increase our understanding on how communicating male dominance status dictates conspecifics behavioral responses to ultimately benefit male reproductive fitness.

## Acknowledgment

I thank the Fyssen Foundation for its support during my first years at the Research Center for Animal Cognition (CRCA), Toulouse. I also thank students and people from the IVEP team at the CRCA for participating to the project, collecting and analyzing data.

# Impact de l'apprentissage associatif sur les représentations corticales de stimuli visuels

Julien CORBO

*Center for Molecular and Behavioral Neuroscience. Rutgers University – Newark. 197 University Avenue. Newark, NJ 07102. USA*

## Résumé

Pour optimiser le processus de perception, le cerveau doit compléter les entrées sensorielles à l'aide des connaissances et des attentes qu'il a de ce qui doit être perçu. Sa connaissance des associations existant entre stimuli, actions et conséquences est créée lors de l'apprentissage associatif. Au cours de notre étude, nous avons examiné chez la souris comment l'apprentissage d'une tâche de discrimination modifie le traitement des stimuli de la tâche par le cortex visuel. Pour cela, nous avons comparé comment des stimuli visuels simples étaient représentés par l'activité des populations neuronales du cortex visuel lorsque ceux-ci étaient présentés à des animaux passifs ou à des souris utilisant ces stimuli pour effectuer une tâche comportementale. Nous montrons que les représentations neuronales des stimuli de la tâche sont plus précises et plus stables chez les souris expertes. Cette amélioration est accompagnée d'une distorsion des représentations des stimuli similaires ceux de la tâche, qui deviennent encodés comme s'ils étaient les stimuli de la tâche eux-mêmes.

## Mots clefs

Neurosciences, Perception, Vision, Cortex, Apprentissage

# Impact of associative learning on the cortical representation of visual stimuli

## Abstract

To optimize perception, the brain completes the sensory input using its knowledge and expectations of what should be perceived. This knowledge of the association existing between stimulus, action, and consequences is created during associative learning. In this study, we investigated the changes in early brain processing of visual inputs induced by learning a discrimination task. To do this, we compared how simple visual stimuli were represented by the activity of neuronal populations in visual cortex when they were presented to passive animals or to mice using these stimuli to perform a behavioral task. We show that neural representations of the task stimuli are more accurate and stable in expert mice. This improvement is accompanied by a distortion of the representations of stimuli close to that of the task, which become encoded as if they were the task stimuli themselves.

## Keywords

Neurosciences, Perception, Vision, Cortex, Learning

## Introduction

Les capteurs sensoriels dont nous sommes équipés (dans la rétine ou la peau par exemple) réalisent chacun une mesure locale, abstraite, et relativement bruitée de la quantité à laquelle ils sont sensibles. Ces entrées lacunaires sont intégrées et complétées par les systèmes sensoriels au cours d'un processus constructif pour donner lieu à une perception signifiante et unifiée. Aussi, nous ne percevons pas exactement la réalité, mais le fruit de la convergence entre des entrées sensorielles imprécises et les attentes de notre cerveau issues de sa connaissance de la structure du monde (von Helmholtz, 2005 ; Gregory, 1997). Cette distance entre *ce qui est* (les entrées sensorielles) et *ce qui est perçu* dépend notamment du contexte extérieur (autour de l'objet perçu) et comportemental (la motivation et l'état de l'individu). Comprendre comment ces facteurs influencent le traitement cérébral des entrées sensorielles dans le but d'optimiser la perception est un enjeu majeur des neurosciences sensorielles.

L'apprentissage, dans son acception la plus large, consiste en l'association entre des stimuli ou des situations, les actions prises dans ce contexte précis, et leurs résultats. Cette association permet à l'individu d'adapter son comportement à l'environnement. Si l'apprentissage est généralement accompagné de modifications de l'activité dans des régions cérébrales liées à la prise de décision et aux réponses motrices et émotionnelles, il peut aussi influencer le traitement des entrées sensorielles (Weinberger & Bieszczad, 2011). Comme nous l'avons vu, le traitement cérébral des informations sensorielles dépend du contexte, des attentes, et de la motivation. Dans cette étude, nous tentons d'améliorer notre compréhension des modifications du traitement cérébral des stimuli visuels induites par l'apprentissage d'une tâche de discrimination. Autrement dit, notre but est de déterminer comment la réponse neuronale à des stimuli identiques change en fonction de l'importance de ces stimuli pour l'animal.

Les neurones du cortex visuel primaire (V1), premier relais cortical des informations visuelles, sont sensibles à des caractéristiques dites basiques ou élémentaire des scènes visuelles. Ils sont en particulier bien connus pour encoder l'orienta-

tion des bords des objets contenus dans une image. On peut déterminer en enregistrant l'activité des neurones de V1 pendant la présentation de stimuli visuels d'orientations différentes (généralement des barres noires sur fond blanc) la *courbe d'accord* (tuning curve) aux orientations de chaque neurone. Cette courbe représente la relation entre l'activité évoquée et l'orientation présentée (voir les exemples de la **Fig. 1**). Ces courbes d'accord ont une allure gaussienne (autour du cercle des orientations), avec une réponse maximale évoquée par l'*orientation préférée* du neurone, chaque neurone ayant sa propre préférence et sélectivité. Ainsi, on dit que l'activité d'une population de neurones de V1 *représente* l'orientation des stimuli visuels, car des groupes différents de neurones ayant une orientation préférée similaire seront sélectivement activés par des orientations différentes.

Nous avons donc pris deux groupes de souris et établis comment un set de stimuli orientés était représenté dans V1. Dans le premier groupe (souris naïves), les animaux voyaient les stimuli passivement. Dans le second groupe (souris expertes), les souris avaient été entraînées à associer le même set de stimuli avec une récompense ou une punition. Nous avons enregistré les réponses neuronales à la présentation de ces stimuli et utilisé leur orientation préférée pour construire la représentation des orientations par la population neuronale de V1. Le principal changement lié à l'apprentissage que nous mettons en lumière est un affinement de l'activité dans l'espace des orientations préférées des neurones qui améliore la précision de la représentation des stimuli de la tâche. Cet affinement est supporté par la suppression de l'activité des neurones dont la préférence est proche des orientations utilisées dans la tâche, si bien que lorsque ces orientations voisines sont présentées chez les animaux experts, les neurones les plus activés sont ceux représentant les orientations de la tâche. Ainsi nous montrons que l'apprentissage a induit une distorsion de l'espace représentationnel des orientations qui favorise la représentation des orientations associées à la tâche.

## Méthodes

Afin d'étudier la représentation des orientations dans le cortex visuel primaire, nous avons enregistré l'activité neuronale à l'aide d'imagerie calcique par microscope bi-photon chez des sou-

ris éveillées avant et après apprentissage d'une tâche de discrimination.

### Préparation des animaux et dispositif expérimental

Les animaux ont été opérés sous anesthésie afin d'accéder au cortex visuel de l'hémisphère gauche. Un volet osseux de 3 mm de diamètre a été retiré et remplacé par un disque de verre, permettant d'imager le cortex de manière chronique. Durant les sessions d'enregistrement, les animaux éveillés avaient leur tête fixée au dispositif d'enregistrement, avec en face d'eux un écran occupant tout l'hémichamp visuel droit. Ils étaient sur une sphère libre de tourner dans toutes les directions, nous permettant d'enregistrer l'activité locomotrice des animaux (**Fig. 1a**).

### Protocole expérimental

L'activité des neurones de V1 a été d'abord enregistrée dans des sessions précédant l'apprentissage de la tâche (groupe de souris Naïves, 21 sessions sur 14 animaux), durant lesquelles les souris voyaient passivement des stimuli orientés ( $45^\circ$  et  $135^\circ$ ), répétés dans un ordre aléatoire (**Fig. 1b**), chaque stimulus durant trois secondes. A la fin de la session, 12 orientations espacées de  $30^\circ$ , de  $0^\circ$  à  $330^\circ$ , étaient présentées 10 fois chacune, elles aussi aléatoirement (**Fig. 1b**). Le but de ce dernier bloc de stimulation était de déterminer la réponse de chaque neurone à l'ensemble des orientations présentées afin de construire leur courbe d'accord aux orientations et de déduire leur orientation préférée (**Fig. 1f**).

Ensuite, les souris ont été entraînées à une tâche dite de « Go/NoGo » (groupe de souris Expertes, 16 sessions sur 10 animaux). Privées d'eau avant les sessions d'enregistrement, elles devaient lécher un embout qui délivrait de l'eau lorsque le stimulus était  $45^\circ$  (le signal « Go »), et se retenir de lécher lorsque le stimulus était de  $135^\circ$  (le signal « NoGo »). Si elles réalisaient une erreur (une omission lors du Go ou une fausse alarme lors du NoGo), le délai avant le prochain essai était augmenté (time out, **Fig. 1c**). Une fois que les animaux atteignaient une performance satisfaisante de manière consistante (**Fig. 1d**), nous avons procédé à d'autres sessions d'enregistrement sur le même format, avec un bloc de tâche (répétition de  $45^\circ$  et  $135^\circ$ ) et un bloc de courbe d'accord ( $0^\circ - 330^\circ$ ).

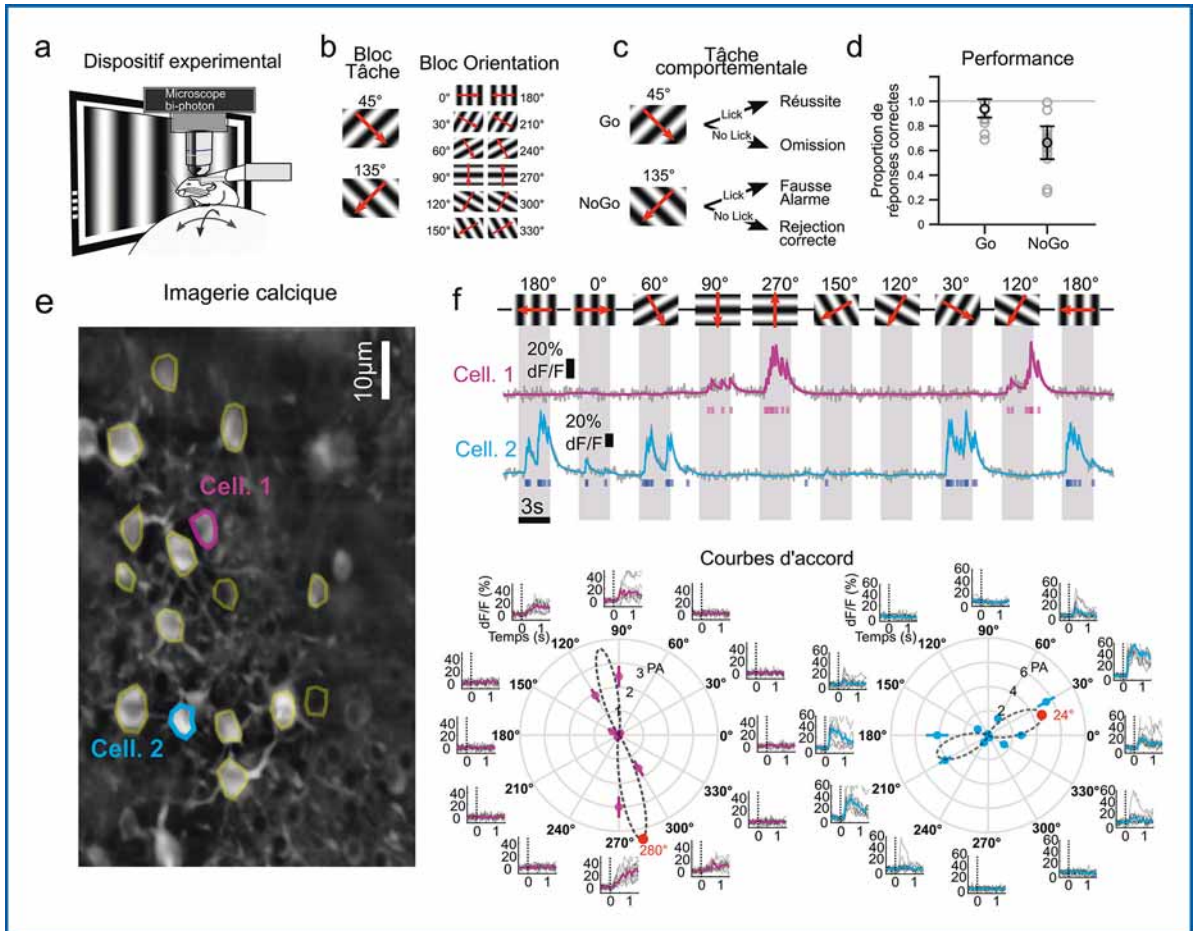
### Acquisition et pré-traitement des données

L'imagerie calcique repose sur la détection d'un rapporteur fluorescent du calcium intracellulaire, qui covarie avec la décharge de potentiel d'actions des neurones. Un laser avec une longueur d'onde spécifique est utilisé pour exciter le rapporteur du calcium, et la fluorescence en retour est mesurée avec un microscope bi-photon, permettant une grande précision spatiale. Les images ainsi acquises sont traitées pour délimiter la position des neurones (**Fig. 1e**), et le signal issu de chaque neurone est extrait individuellement (**Fig. 1f**, haut). Ainsi, l'activité de populations d'environ 100 à 300 neurones peut être enregistrée simultanément. Le signal de fluorescence a été déconvolué à l'aide d'un algorithme (Deneux et al., 2016) afin de quantifier les événements liés à l'émission de potentiels d'action par les neurones (**Fig. 1f**, haut, rectangles colorés). Cette étape permet de se prémunir des imprécisions inhérentes à l'imagerie calcique, notamment la constante de temps relativement longue pour que le rapporteur excité revienne à son niveau basal, et la relation supra-linéaire entre les potentiels d'actions et l'amplitude du signal.

### Résultats

#### Comparaison de la représentation corticale des orientations entre souris naïves et expertes

A partir des orientations préférées des neurones enregistrés (voir **Fig. 1f**), nous avons visualisé les représentations corticales populationnelles en construisant une carte de l'activité dans l'espace des orientations au cours du temps (**Fig. 2a-b**). Pour ce faire, les neurones ont été ordonnés selon leur orientation préférée, et leur activité moyennée (à titre d'exemple, la position des neurones de la figure 1 est représentée par les points colorés sur l'axe des abscisses dans le graphe de gauche, **Fig. 2a**). L'activité au cours de la première seconde après le début du stimulus a été ensuite moyennée dans le temps pour obtenir le profil de l'activation dans l'espace des orientations préférées (**Fig. 2c-d**). Chez les souris naïves, de manière attendue, les stimuli de  $45^\circ$  et  $135^\circ$  activent des neurones dont l'orientation préférée est proche de celle du stimulus (**Fig. 2c**). Chez les souris expertes, pour qui les mêmes stimuli sont associés à la présence ou l'absence d'une récompense, on trouve un profil d'activité



**Figure 1. Design expérimental et exemples de neurones enregistrés.** **a.** Schéma du dispositif expérimental, avec une souris dont le crane est fixé pendant la session d'imagerie via un microscope bi-photon. Un écran occupant tout l'hémichamps visuel controlatéral au cortex imagé est utilisé pour présenter les stimuli visuels. La souris est sur une boule sur coussin d'air leur permettant de courir sur place dans toutes les directions. **b.** Stimuli présentés lors du bloc tâche et bloc orientation. Les flèches rouges indiquent le sens de déplacement des barres orientées. **c.** Schéma de la tâche comportementale. 'Lick' et 'No lick' indiquent les réponses positives et négatives. **d.** Performance (pourcentage de réponses correctes) des animaux après entraînement, durant les sessions d'enregistrement. Chaque point gris correspond à une session, les points noirs correspondent à la moyenne, et les barres indiquent l'erreur standard de la moyenne (e.s.m.). **e.** Image moyenne d'une partie du cortex visuel obtenue par imagerie calcique lors d'une session exemplaire. En couleur les régions d'intérêt correspondant à des neurones segmentés à la main. En rose et bleu deux exemples de cellules dont l'activité au cours du temps est reportée dans le panneau **f**. **f.** Haut : Variation au cours du temps du signal calcique (fraction de la fluorescence moyenne,  $dF/F$ ). Sous le signal calcique figurent les événements liés à des potentiels d'actions (PA) inférés depuis le signal par déconvolution. Le signal brut est en gris, en couleur figure le signal reconstruit avec les événements inférés. La ligne du haut correspond aux stimuli, les zones grises indiquent le temps durant lequel ces derniers sont présentés. Bas : Courbes d'accord des deux cellules exemples. Autour du cercle figurent les réponses calciques à la présentation de chacune des orientations. En gris les essais individuels, en couleur la médiane. Le temps 0 correspond au début de la présentation du stimulus. Dans le cercle les points représentent la réponse moyenne en potentiel d'actions inférés et les barres l'e.s.m. La ligne pointillée indique le meilleur modèle des réponses trouvé par un algorithme Bayésien. Le point rouge représente le pic de ce modèle, soit l'orientation préférée du neurone.

dans l'espace des orientations préférées qui est affiné (**Fig. 2d**). Les neurones dont l'orientation préférée est précisément celle des stimuli sont les

seuls à être activés. Afin de tester si cette précision accrue de la représentation est due à une plus grande stabilité des réponses entre les

essais, nous avons utilisé une méthode de rééchantillonnage en tirant au hasard des réponses d'essais individuels provenant d'un sous-ensemble de neurones pour construire le profil d'activation d'un pseudo-essai aléatoire. En répétant cette procédure un grand nombre de fois (1000), nous avons extrait la position du pic de ces profils d'activations d'essais uniques, et comparé les distributions entre les groupes de souris naïves et expertes (**Fig. 2e-f**). Une mixture de distributions de von Mises (un équivalent de la distribution normale en statistiques circulaires) a été ajustée pour chacune des distributions, permettant de quantifier leur dispersion dans l'espace des orientations. La dispersion des distributions ajustées sur les réponses populationnelles des souris expertes était significativement inférieure à celle des souris naïves. Ce résultat suggère une plus grande stabilité des réponses chez les souris expertes, pour lesquelles le pic de l'activité dans l'espace des orientations est systématiquement très proche de l'orientation du stimulus. Pour résumer, les stimuli visuels de 45° et 135° sont représentés de manière plus précise et fiable chez les animaux qui ont appris à utiliser ces stimuli pour effectuer une tâche. Ainsi, des stimuli identiques peuvent être représentés différemment dans V1 selon leur importance apprise par l'animal.

### Distorsion de l'espace représentationnel des orientations

Nous avons ensuite investigué les potentiels changements des représentations des orientations en dehors de la tâche elle-même, en analysant de manière similaire les représentations de stimuli utilisés durant le bloc de courbe d'accord. Ce bloc intervenait après la tâche, ne comportait pas les stimuli utilisés durant celle-ci, et le tube approvisionnant la souris en eau était retiré. On peut voir dans l'exemple donné dans la **Fig. 3a** la réponse au stimulus orienté à 60° chez les souris expertes. Les neurones préférant l'orientation associée au Go (45°) sont les plus actifs. L'histogramme des pics est ajusté au mieux par une mixture de distributions de von Mises dont la composante principale est centrée sur le stimulus de la tâche (45°). Ainsi V1 semble représenter 60° comme si 45° était présenté. À l'inverse, chez ces mêmes souris expertes, 90°, une orientation éloignée de celles utiles pour la tâche, la représentation est fidèle, avec un pic d'activité centré sur

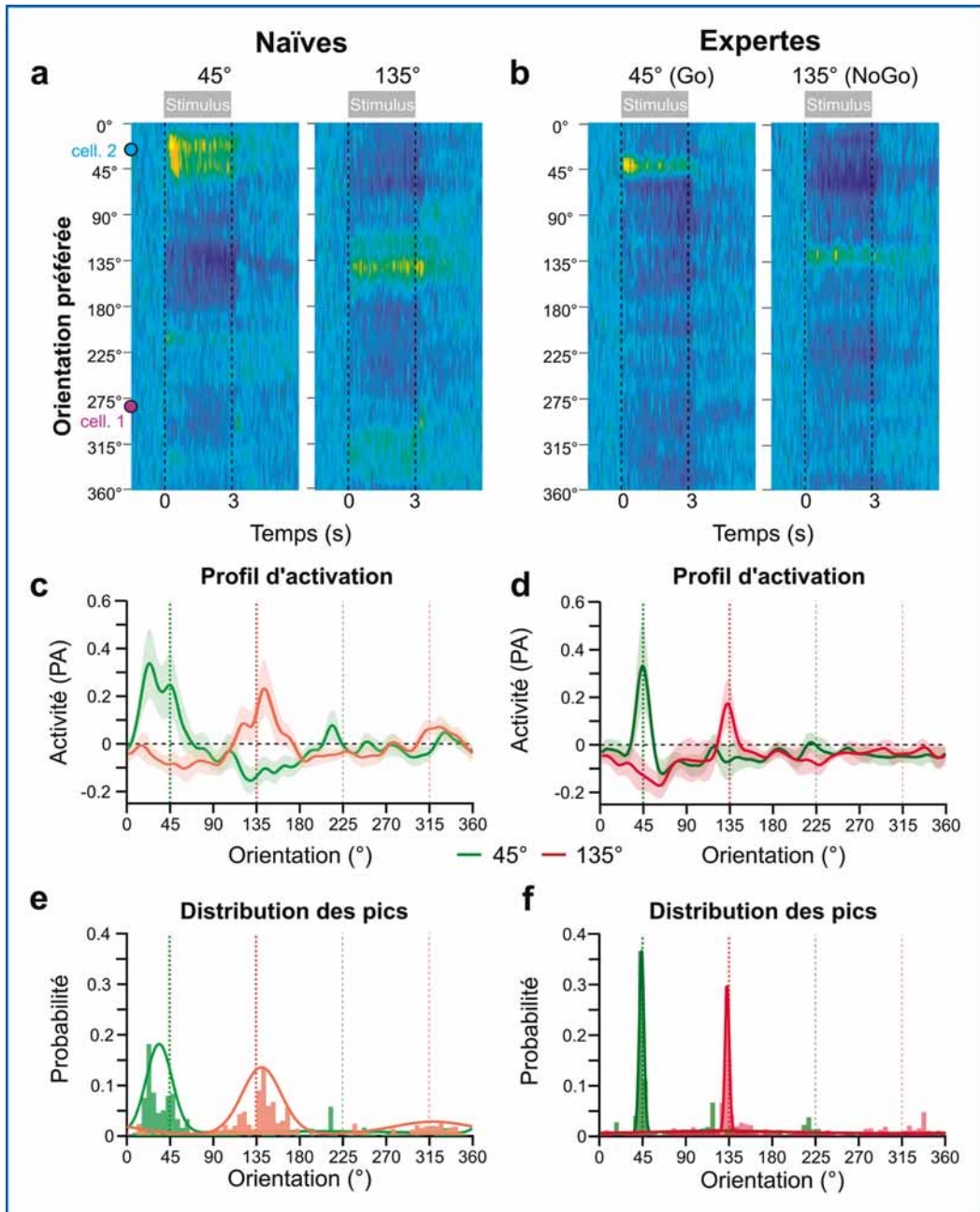
l'orientation effectivement présentée (**Fig. 3b**). Afin de confirmer cette tendance, nous avons regroupé les réponses aux orientations jouxtant celles de la tâche, soit 30°, 60°, 120° et 150°. Les données de 60° et 150° ont été retournées dans l'axe des orientations pour se superposer avec celles de 30° et 120° (**Fig. 3c**). Le regroupement des données mène au même résultat ; la position du pic du profil d'activité correspond aux neurones représentant les orientations des stimuli de la tâche et non pas les orientations effectivement présentées. En appliquant la même analyse aux orientations éloignées de celles de la tâche (0°, 90°, 180°, 270°), nous montrons que la distribution est centrée sur l'orientation présentée (**Fig. 3d**). Chez les souris naïves, pour qui ces orientations n'ont pas de valeur comportementale spécifique, aucune déformation n'est constatée et les représentations sont fidèles à la réalité, pour les orientations voisines de 45° et 135° (**Fig. 3e**) comme pour les autres (**Fig. 3f**).

Cette distorsion, révélée par la densité accrue des pics d'activité au niveau des orientations de la tâche pourrait être sous-tendue à plusieurs phénomènes : soit les neurones représentant ces dernières sont suractivés, soit les neurones représentant les orientations voisines voient leur activité supprimée, soit une mixture de ces deux hypothèses. Afin de trancher entre ces alternatives, nous avons d'abord regroupé les neurones en fonction de leur orientation préférée (groupes de 15°) et groupé les réponses aux orientations voisines à gauche (30° et 120°, **Fig. 3g**) et à droite (60° et 150°, **Fig. 3h**) de celles de la tâche. Nous avons ensuite soustrait les réponses moyennes de chaque groupe entre souris expertes et souris naïves. Une valeur proche de 0 indique que la réponse moyenne pour le groupe considéré n'aura pas changé, tandis qu'une valeur positive ou négative indique respectivement une augmentation ou une diminution constatée pour les neurones des souris expertes. Les résultats montrent que seul un phénomène de suppression touchant les neurones préférant les orientations voisines de 45° et 135° est à l'œuvre, tandis que les neurones représentant 45° et 135° n'ont pas changé leur niveau d'activité.

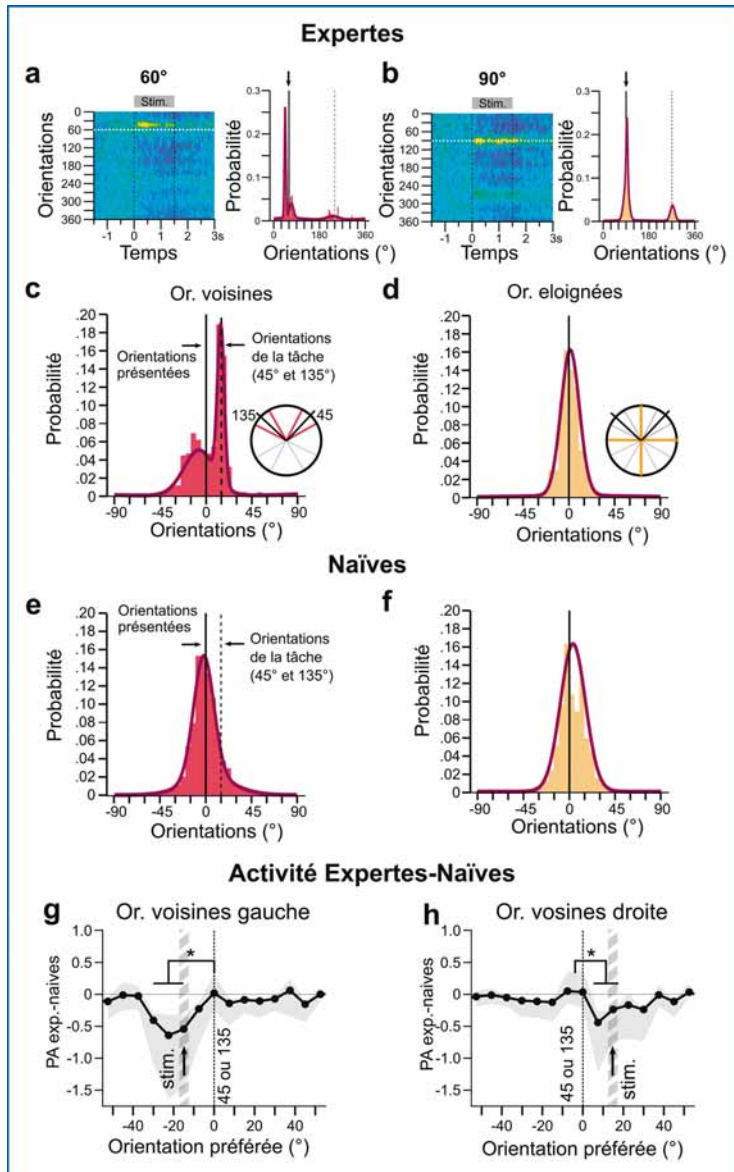
### Discussion

Afin d'étudier l'impact de l'apprentissage associatif sur la manière dont le cerveau traite des stimuli visuels basiques, nous avons déterminé





**Figure 2. Comparaison des réponses aux stimuli visuel de 45° et 135° entre souris naïves et expertes. a.** Cartes de l'activité en fonction de l'orientation préférée des neurones chez les souris naïves. Les couleurs chaudes indiquent une augmentation d'activité comparée à la seconde qui précède le stimulus, les couleurs froides indiquent une diminution. A gauche la réponse au stimulus visuel orienté à 45°, à droite 135°. Les points bleu et rose sur l'axe des abscisses indiquent la position des neurones exemples de la figure 1 dans ces graphes. **b.** Mêmes graphes que a. mais pour les souris expertes. **c.** Activité moyenne  $\pm$  déviation standard dans l'espace des orientations durant la première seconde post-stimulus, pour 45° (vert) et 135° (rouge) chez les souris naïves. **d.** Mêmes graphes que c. mais pour les souris expertes. **e.** Distribution des pics des profils d'activité des essais reconstitués par rééchantillonnage dans l'espace des orientations préférées pour 45° (vert) et 135° (rouge) chez les souris naïves. **f.** Mêmes graphes que e. mais pour les souris expertes



**Figure 3. Distorsion de la représentation des orientations voisines de celles de la tâche.** **a.** Gauche : Carte de l'activité en fonction de l'orientation préférée des neurones pour un stimulus de 60° chez les souris expertes. Droite : distribution des pics des profils d'activité des essais reconstitués par rééchantillonnage. **b.** Mêmes graphes que **a.** mais pour un stimulus de 90°. **c.** Distribution des pics pour les réponses voisines de celles de la tâche (30°, 60°, 120° et 150°) chez les souris expertes. Les données ont été agrégées et retournées dans l'espace des orientations pour être superposées. 0 indique l'orientation présentée. La ligne pointillée indique la position de l'orientation de la tâche (45° ou 135°). Le cercle représente les orientations utilisées pour construire le graphe (en couleur) et les orientations de la tâche (en noir) **d.** Distribution des pics pour les réponses aux orientations éloignées de celles de la tâche (0°, 90°, 180° et 270°). **e. et f.** mêmes graphes que **c** et **d** mais pour les souris naïves. **g.** Différence entre souris expertes et naïves dans l'activité moyenne des neurones groupés par orientation préférée (largeur 20°) suite à la présentation des orientations voisine de celles de la tâche (30° et 120°). La zone grisée indique l'e.s.m. L'orientation des stimuli est indiquée par la barre verticale pointillée grise. Les données sont recentrées afin que les orientations de la tâche correspondent à 0°. L'étoile indique une différence significative entre les groupes de neurones. **h.** Même graphe que **g.** mais pour 60° et 150°.

comment les mêmes stimuli visuels orientés sont représentés dans le cortex de souris voyant passivement les stimuli, et chez des souris ayant associé ces stimuli avec une récompense et une punition. Nos résultats révèlent une amélioration de la précision de la représentation des deux stimuli utilisés dans la tâche chez les souris expertes. De plus, nous avons observé une distorsion de la représentation des orientations voisines, qui se rapproche de la représentation des orientations de la tâche. Dans cette situation, le cortex visuel ne représente pas strictement la réalité, et son activité semble être sujette à un filtre conséquent à

**“Dans cette situation, le cortex visuel ne représente pas strictement la réalité, et son activité semble être sujette à un filtre conséquent à l'apprentissage associatif.”**

l'apprentissage associatif. Ces deux phénomènes sont sous-tendus par la suppression spécifique de l'activité des neurones dont l'orientation préférée est celle de ces orientations voisines.

Plusieurs études ont investigué les modifications des réponses neuronales dans V1 après l'apprentissage d'une tâche de discrimination entre deux orientations. Des effets différents, voire opposés, ont été reportés dans la littérature, mais un consensus existe quant à leur finalité : la réponse au stimulus récompensé est plus saillante après l'apprentissage (Goltstein et al., 2013, 2018 ; Poort et al., 2015 ; Jurjut et al., 2017 ; Henschke et al., 2020). La variété des résultats présents dans la littérature provient probablement de la variété des paradigmes expérimentaux utilisés (les stimuli, les réponses demandées, et la manière de mesurer les représentations dans V1). Par exemple, il a été montré que même en utilisant une tâche identique, les modulations de l'activité du cortex sensoriel primaire peuvent être opposées si les animaux utilisent des stratégies différentes pour apprendre la tâche (Berlau & Weinberger, 2008). De plus, deux aspects de l'apprentissage sont mis en jeu. Premièrement, le système doit améliorer sa capacité à détecter et discriminer les stimuli cibles (on parle d'apprentissage perceptif). Deuxièmement, l'activité évoquée par le stimulus cible doit être associée à la réponse comportementale demandée par la tâche de manière solide et stable (on parle d'apprentissage associatif). Ces deux

composantes étant confondues, leur superposition différentielle dans les différentes études peut générer de la variabilité. Ainsi, les résultats que nous montrons dans cette étude sont à interpréter dans son cadre spécifique.

Nous n'avons pas observé de modulation positive de la réponse populationnelle (Corbo et al., 2021) comme ont pu le faire les études précédentes, mais les effets que nous mettons en lumière participent tout de même à l'amélioration de la représentation des orientations de la tâche, et peuvent contribuer à sa réalisation. Nous avons choisi une tâche la plus simple possible, avec des orientations orthogonales.

Dans cette situation, les ensembles de neurones codant pour le Go et le NoGo sont théoriquement exclusifs, et les animaux sont préablement capable de les discriminer. Ainsi, l'enjeu computationnel principal de l'apprentissage est plus celui de l'association que celui de l'amélioration de la capacité à discriminer. Dans ce contexte, limiter la réponse populationnelle à un groupe consistant de neurones pourrait favoriser l'association entre la sortie de V1 et la réponse comportementale, par un phénomène de plasticité neurale (Olshausen & Field, 2004).

Un autre avantage computationnel découlant des phénomènes que nos résultats suggèrent est celui de la capacité à généraliser. La généralisation permet de la flexibilité lors d'un apprentissage, en rendant possible l'application d'une association apprise à une entrée ou une situation proche (Poggio & Bizzi, 2004). Dans notre cas, en représentant les orientations voisines de manière similaire à celle de la tâche, V1 favorise l'adaptation de l'animal si les règles de la tâche venaient à changer subtilement, ou si les stimuli associés venaient à avoir de la variabilité. Ce n'est pas le cas dans le contexte de stimuli contrôlés en laboratoire, mais prendre en compte la variance des entrées au moment de générer des associations peut représenter un avantage dans le milieu naturel.

Cette étude contribue à un élan relativement récent de remise en question de l'aspect passif des premières étapes du traitement cérébral des

entrées sensorielles. Le cortex visuel primaire a été longuement assimilé à une étape de représentation fidèle des entrées, avant l'application, plus tardive, de traitements cognitifs de plus haut niveau. Il s'avère, comme nous le démontrons ici, que les connaissances, les attentes, le contexte s'appliquent comme autant de filtres sur ces représentations précoces qui nourrissent les traitements de plus haut niveau. Avec cette étude nous avons développé un paradigme expérimental pour l'étude de ce type de filtre du traitement précoce, et semé les graines pour des explorations futures des distorsions des représentations sensorielles induites par l'apprentissage. Quelles sont leurs limites dans l'espace des orientations et dans le temps ? Dans quelle mesure dépendent-elles du contexte et de la motivation ? Ces distorsions peuvent-elles devenir délétères quand les orientations du Go et du NoGo sont très proches ? Autant de questions sur lesquelles nous travaillons actuellement au laboratoire.

## Remerciements

Je remercie la fondation Fyssen pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, Pierre-Olivier Polack pour son mentorat, Batuhan Erkat et John McClure pour leur contribution à cette étude et Hussein Khmour pour son soutien et commentaires éclairés.

## Bibliographie

- Berla, K. M., & Weinberger, N. M. (2008). Learning strategy determines auditory cortical plasticity. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(2), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.07.004>
- Corbo, J., McClure, J. P., Erkat, O. B., & Polack, P.-O. (2021). *Dynamic distortion of the orientation representational space after learning in the mouse primary visual cortex* (p. 2021.03.25.437032). <https://doi.org/10.1101/2021.03.25.437032>
- Deneux, T., Kaszas, A., Szalay, G., Katona, G., Lakner, T., Grinvald, A., Rózsa, B., & Vanzetta, I. (2016). Accurate spike estimation from noisy calcium signals for ultrafast three-dimensional imaging of large neuronal populations *in vivo*. *Nature Communications*, 7, 12190. <https://doi.org/10.1038/ncomms12190>
- Goltstein, P. M., Coffey, E. B. J., Roelfsema, P. R., & Pennartz, C. M. A. (2013). In Vivo Two-Photon Ca<sup>2+</sup> Imaging Reveals Selective Reward Effects on Stimulus-Specific Assemblies in Mouse Visual Cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(28), 11540–11555. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1341-12.2013>
- Goltstein, P. M., Meijer, G. T., & Pennartz, C. M. (2018). Conditioning sharpens the spatial representation of rewarded stimuli in mouse primary visual cortex. *ELife*, 7, e37683. <https://doi.org/10.7554/eLife.37683>
- Gregory, R. L. (1997). Knowledge in perception and illusion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 352(1358), 1121–1127.
- Henschke, J. U., Dylida, E., Katsanevaki, D., Dupuy, N., Currie, S. P., Amvrosiadis, T., Pakan, J. M. P., & Rochefort, N. L. (2020). Reward Association Enhances Stimulus-Specific Representations in Primary Visual Cortex. *Current Biology*, 30(10), 1866–1880.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.018>
- Jurjut, O., Georgieva, P., Busse, L., & Katzner, S. (2017). Learning Enhances Sensory Processing in Mouse V1 before Improving Behavior. *The Journal of Neuroscience*, 37(27), 6460–6474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3485-16.2017>
- Olshausen, B. A., & Field, D. J. (2004). Sparse coding of sensory inputs. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(4), 481–487. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.07.007>
- Poggio, T., & Bizzi, E. (2004). Generalization in vision and motor control. *Nature*, 431(7010), 768–774. <https://doi.org/10.1038/nature03014>
- Poort, J., Khan, A. G., Pachitariu, M., Nemri, A., Orsolich, I., Krupic, J., Bauza, M., Sahani, M., Keller, G. B., Mrsic-Flogel, T. D., & Hofer, S. B. (2015). Learning Enhances Sensory and Multiple Non-sensory Representations in Primary Visual Cortex. *Neuron*, 86(6), 1478–1490. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.037>
- von Helmholtz, H. (2005). *Treatise on physiological optics* (J. P. C. Southall, Trans. ; Vol. 3). Courier Corporation.
- Weinberger, N. M., & Bieszczad, K. M. (2011). Introduction: From Traditional Fixed Cortical Sensationism to Contemporary Plasticity of Primary Sensory Cortical Representations. In J. A. Gottfried (Ed.), *Neurobiology of Sensation and Reward*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92801/>

## Introduction

The sensory receptors with which we are equipped (in the retina or the skin for example) all realize a local, abstract, and relatively noisy measure of the quantity to which they are sensitive. These incomplete inputs are integrated and completed by the sensory systems in a constructive process, giving rise to a meaningful and unified perception. Thus, we do not exactly perceive reality, but the fruit of the convergence between imprecise sensory inputs and our brain's expectations derived from its knowledge of the structure of the world (von Helmholtz, 2005; Gregory, 1997). This distance between what is (the sensory inputs) and what is perceived depends in particular on the external context (around the perceived object) and behavioral context (the individual's motivation and state). Understanding how these factors influence the cerebral processing of sensory inputs in order to optimize perception is a major challenge in sensory neuroscience.

Learning, in its broadest sense, consists of the association between stimuli or situations, the actions taken in that specific context, and their results. This association allows the individuals to adapt their behavior to the environment. While it is generally accompanied by changes in activity in brain regions related to decision making, motor and emotional responses, learning can also influence the processing of sensory inputs (Weinberger & Bieszczad, 2011). As we have seen, brain processing of sensory information depends on context, expectations, and motivation. In this study, we investigated the impact of learning a discrimination task on the brain processing of visual stimuli. In other words, our goal was to determine how the neural responses to identical stimuli change as a function of their behavioral importance.

The neurons of the primary visual cortex (V1), the first cortical relay of visual information, are sensitive to so-called low-level or elementary characteristics of visual scenes. In particular, they are well known to encode the orientation of the edges of objects in an image. By recording the activity of V1 neurons during the presentation of visual stimuli of different orientations (generally black bars on a white background), we can determine the tuning curve for each neuron. This curve captures the relationship between the

evoked activity and the presented orientation (see examples in **Fig. 1**). These tuning curves have a Gaussian shape (around the circle of orientations), with a maximum response evoked by the preferred orientation of the neuron. Each neuron has its own preference and selectivity. Thus, the activity of a population of neurons in V1 is said to *represent* the orientation of visual stimuli, because different groups of neurons with similar preferred orientation will be selectively activated by different orientations.

We therefore took two groups of mice and investigated how a set of two oriented stimuli was represented in V1. In the first group (naive mice), the animals saw the stimuli passively. In the second group (expert mice), the mice were trained to associate the same set of stimuli with a reward or punishment. We recorded the neural responses to the presentation of these stimuli and used their preferred orientation to construct the representation of orientations by the V1 neural population. The main learning-related change we highlight is a refinement of activity in the space of preferred orientations that improves the accuracy of the task stimuli representation. This refinement was supported by the suppression of the activity of neurons whose preference was neighboring the orientations used in the task. When these flanking orientations were presented in expert animals, the most activated neurons became those representing the task orientations, instead of the neurons tuned to the presented orientations. Thus we show that learning has induced a distortion of the representational space of orientations that favors the representation of orientations associated with the task.

## Methods

To study the representation of orientations in the primary visual cortex, we recorded neural activity using two-photon calcium imaging in awake mice before and after learning a discrimination task.

### Animal preparation and experimental setup

The animals were operated under anesthesia to access the visual cortex of the left hemisphere. A 3-mm diameter window was removed from the skull and replaced by a glass disk, allowing chronic imaging of the cortex. During the recording sessions, awake animals had their heads atta-

ched to the recording device, with a screen in front of them straddling the entire right visual field. They were on a sphere free to rotate in all directions, allowing us to record the locomotor activity of the animals (**Fig. 1a**).

### Experimental protocol

The activity of V1 neurons was first recorded in sessions prior to learning the task (group of Naive mice, 21 sessions on 14 animals), during which the mice passively saw oriented stimuli ( $45^\circ$  and  $135^\circ$ ), repeated in a random order (**Fig. 1b**), each stimulus lasting three seconds. At the end of the session, 12 orientations spaced  $30^\circ$  apart, from  $0^\circ$  to  $330^\circ$ , were presented 10 times each, also randomly (**Fig. 1b**). The goal of this last block of stimulation was to determine the response of each neuron to orientations around the circle in order to construct their orientation tuning curve and deduce their preferred orientation (**Fig. 1f**).

Next, the mice were trained to perform a Go/NoGo task (Expert group, 16 sessions on 10 animals). Water-deprived before the recording sessions, they had to lick a nozzle that delivered water when the stimulus was  $45^\circ$  (the “Go” signal), and refrain from licking when the stimulus was  $135^\circ$  (the “NoGo” signal). If they made a mistake (an omission during the Go or a false alarm during the NoGo), the time to the next trial was increased (time out, **Fig. 1c**). Once the animals reached a consistently satisfactory performance (**Fig. 1d**), we proceeded with further recording sessions following the same format, with a task block ( $45^\circ$  and  $135^\circ$  repetition) and a tuning curve block ( $0^\circ - 330^\circ$ ).

### Data acquisition and pre-processing

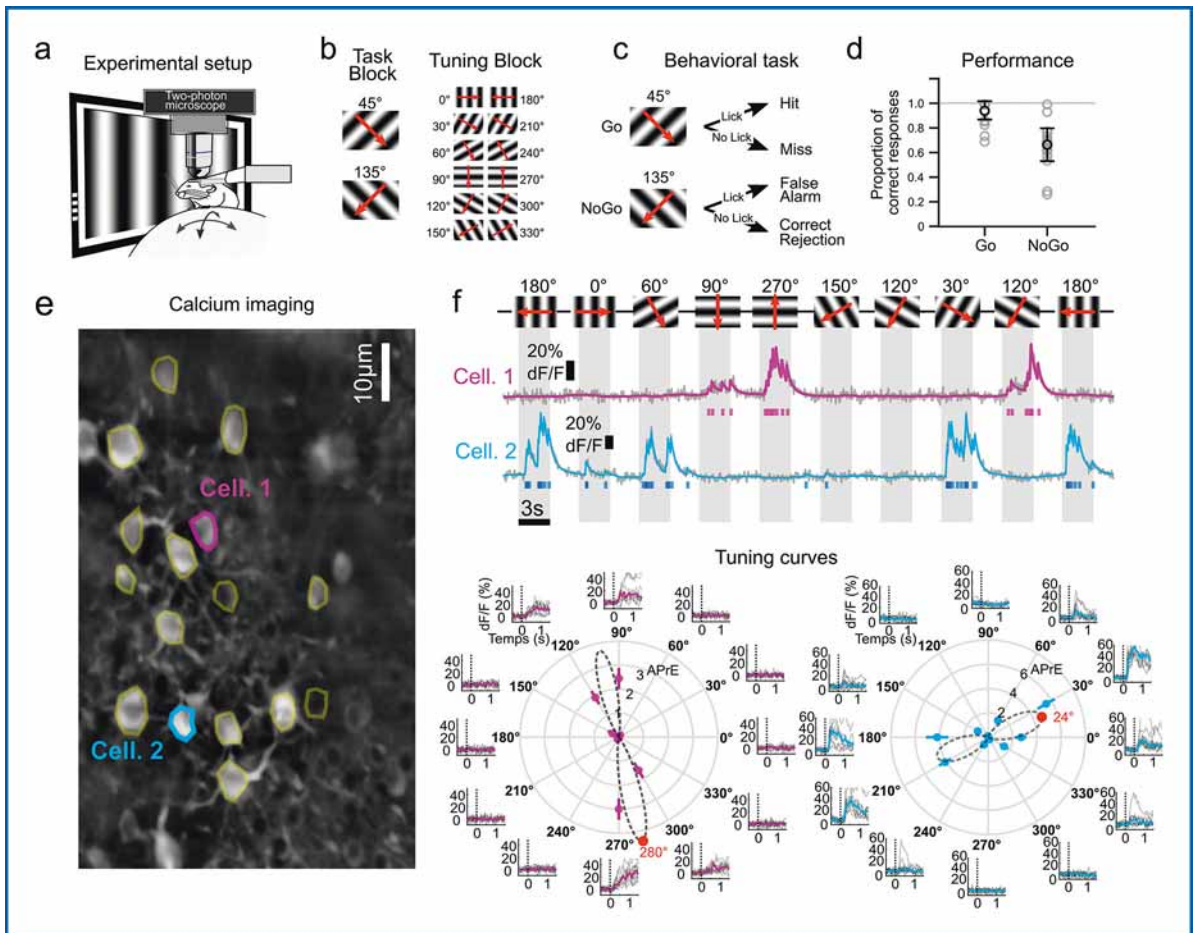
Calcium imaging relies on the detection of a fluorescent intracellular calcium reporter, which covaries with the action potential discharge of the neurons. A laser with a specific wavelength is used to excite the calcium reporter, and the fluorescence in return is measured with a two-photon microscope, allowing high spatial accuracy. The acquired images are processed to segment the position of the neurons (**Fig. 1e**), and the signal from each neuron is extracted individually (**Fig. 1f**, top). This way, the activity of populations of about 100 to 300 neurons can be recorded simultaneously. The fluorescence signal was deconvoluted using an algorithm (Deneux et al., 2016) to quantify events related to

the emission of neuronal action potentials (**Fig. 1f**, top, colored rectangles). This step helps to avoid the inaccuracies inherent to calcium imaging, namely the relatively long time constant for the excited reporter to return to its basal level, and the supra-linear relationship between action potentials and signal amplitude.

## Results

### Comparison of the cortical representation of orientations between naive and expert mice

Using the preferred orientations of the recorded neurons (see **Fig. 1f**), we visualized the population cortical representations by constructing a map of activity in orientation space over time (**Fig. 2a-b**). To do this, neurons were ordered according to their preferred orientation, and their activity averaged (as an example, the position of the neurons in Figure 1 is represented by the colored points on the x-axis in the left graph, **Fig. 2a**). The activity during the first second after stimulus onset was then averaged over time to obtain the activation profile in the space of preferred orientations (**Fig. 2c-d**). In naive mice, as expected, the  $45^\circ$  and  $135^\circ$  stimuli activated neurons with preferred orientations close to the stimulus (**Fig. 2c**). In expert mice, for whom the same stimuli were associated with the presence or absence of a reward, we found changes in the pattern of activity in the preferred orientation space leading to a sharpening of the representation (**Fig. 2d**). Indeed, only neurons whose preferred orientation was precisely that of the stimuli were activated. To test whether this increased accuracy of representation was due to an increased stability of responses across trials, we used a resampling method by randomly drawing individual trial responses from a subset of neurons to construct the activation profile of random pseudo-trials. After repeating this procedure a large number of times (1000), we extracted the peak locations, in the orientation space, of these single-trial activation profiles, and compared the distributions between the naive and expert mouse groups (**Fig. 2e-f**). A mixture of von Mises distributions (an equivalent of the normal distribution in circular statistics) was fitted to each of the distributions, allowing us to quantify their dispersion in orientation space. The dispersion of the distributions fitted to the population responses of the expert mice was



**Figure 1. Experimental design and examples of recorded neurons.** **a.** Schematic of the experimental setup. The mouse whose skull is fixed during the imaging session via a two-photon microscope. A screen straddling the entire visual hemi-field contralateral to the imaged cortex is used to present the visual stimuli. The mice are on a ball on an air cushion allowing them to run in all directions. **b.** Stimuli presented during the task block and orientation block. Red arrows indicate the direction of movement of the oriented bars. **c.** Schematic representation of the behavioral task. Lick and No lick indicate positive and negative responses. **d.** Performance (percentage of correct responses) of animals after training, during recording sessions. Each gray dot corresponds to a session, black dots correspond to the mean, and the bars indicate the standard error of the mean (s.e.m.). **e.** Average image of a portion of the visual cortex obtained by calcium imaging during an exemplar session. The hand-segmented regions of interest corresponding to neurons are in color. In pink and blue two examples of cells whose activity over time is reported in the **f** panel. **f.** Top: Time course of the calcium signal (fraction of the mean fluorescence, dF/F). Below the calcium signal are action potentials-related events (APrEs) inferred from the signal by deconvolution. The raw signal is shown in gray, in color is the reconvoluted signal with the inferred events. The top line corresponds to the stimuli, the grey areas indicate the time during which they are presented. Bottom: Tuning curves of the two example cells. Around the circle are the calcium responses to the presentation of each orientation. In gray the individual trials, in color the median. Time 0 corresponds to the beginning of the stimulus presentation. In the circle, the dots represent the mean response in APrEs and the bars indicate the s.e.m. The dotted line indicates the best model of the responses fitted by a Bayesian algorithm. The red dot represents the peak of this model, i.e., the preferred orientation of the neuron.

significantly lower than that of the naive mice. This result suggested an increased stability of responses in expert mice, for which the peak of

activity in orientation space was systematically very close to the orientation of the stimulus. To summarize, 45° and 135° visual stimuli were

represented more accurately and reliably in animals that had learned to use these stimuli to perform a task. Thus, identical stimuli can be represented differently in the visual cortex, depending on their learned importance to the animal.

### Distortion of the representational space of orientations

We then investigated potential changes in orientation representations outside the task itself, by similarly analyzing representations of stimuli shown during the tuning curve block. This block occurred after the task, did not include the stimuli used during the task, and the nozzle supplying the mouse with water was removed. The example in **Fig. 3a** shows the response to the 60° oriented stimulus in expert mice. Neurons preferring the orientation associated with Go (45°) were the most active. The peaks distribution was best fitted by a mixture of von Mises distributions with the principal component centered on the task stimulus (45°). Thus, V1 appeared to represent 60° as if 45° was presented. Conversely, in these same expert mice, 90°, an orientation far from those used for the task, the representation was not altered, with a peak of activity centered on the orientation actually presented (**Fig. 3b**). To confirm this pattern, we grouped responses at orientations close to those of the task, namely 30°, 60°, 120°, and 150°. The 60° and 150° data were flipped along the orientation axis to overlap with the 30° and 120° data (**Fig. 3c**). Clustering the data led to the same result; the peak location of the activity profile corresponded to the orientations of the task stimuli, not the actual presented orientations. Applying the same analysis to orientations distant from the task orientations (0°, 90°, 180°, 270°), we showed that the distribution was centered on the presented orientation (**Fig. 3d**). In naive mice, for whom these orientations had no specific behavioral value, no distortion was observed and the representations were faithful to reality, for orientations close to 45° and 135° (**Fig. 3e**) as well as for the others (**Fig. 3f**).

This distortion, revealed by the increased density of pseudo-trial peaks at the task orientations,

could be explained by several phenomena: either neurons representing the latter were overactivated, the neurons representing neighboring orientations had their activity suppressed, or a mixture of these two hypotheses. To find out what was the explanation, we first grouped the neurons according to their preferred orientation (groups of 15°) and grouped the responses to the neighboring orientations to the left (30° and 120°, **Fig. 3.g**) and to the right (60° and 150°, **Fig. 3.h**) of those in the task. We then subtracted the average responses of each group between expert and naive mice. A value close to 0 indicates that the average response for the considered group did not change, while a positive or negative value indicates an increase or a decrease respectively observed for the neurons of the expert mice. The results supported only the hypothesis about the suppression phenomenon affecting neurons preferring orientations close to 45° and 135°, while neurons representing 45° and 135° did not change their activity level.

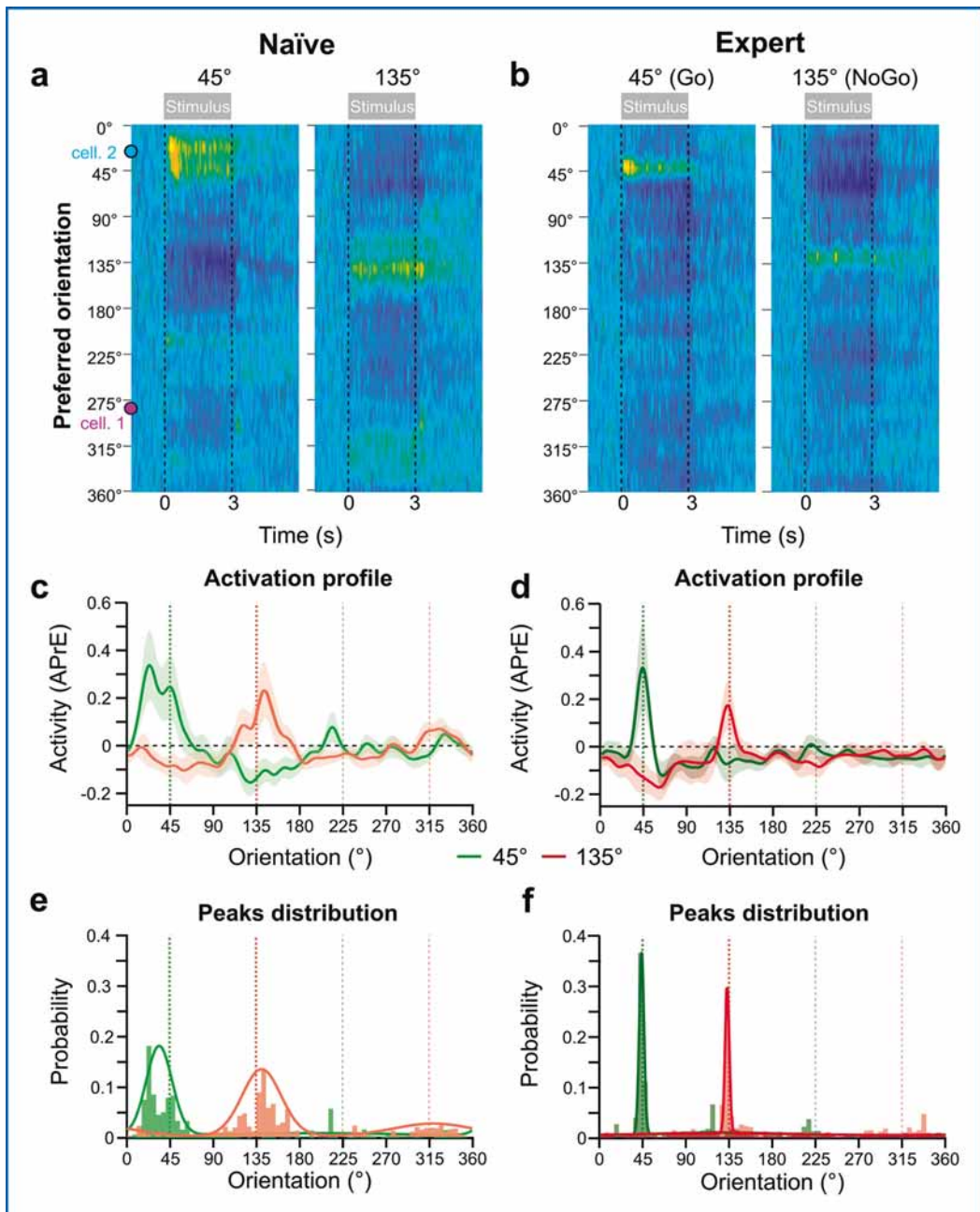
### Discussion

To study the impact of associative learning on how the brain processes basic visual stimuli, we determined how visual stimuli with the same orientation are represented in the cortex of naive mice passively seeing the stimuli, and in expert mice for which they were associated with a reward or a punishment. Our results show that for the expert mice there is an improvement in the accuracy of the representation of the two stimuli used in the task. In addition, we observed that the representation of neighboring orientations is distorted in a way which is skewed towards the representation of the orientations used in the task. In this case, the visual cortex does not strictly represent sensory stimuli, and its activity seems to be modified by a filter related to associative learning. Both phenomena are underpinned by the specific suppression of the activity of neurons whose preferred orientation is flanking the task orientations.

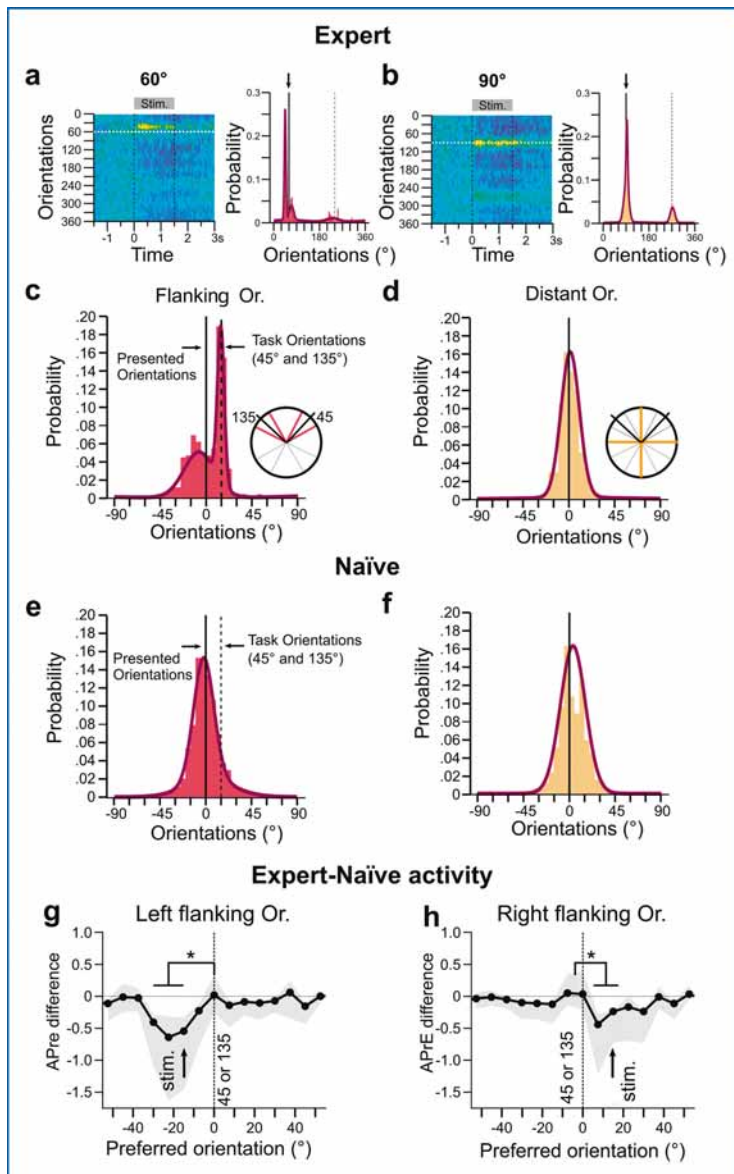
Several studies have investigated the changes in V1 neural responses after learning a discrimi-

**“In this case, the visual cortex does not strictly represent sensory stimuli, and its activity seems to be modified by a filter related to associative learning.”**





**Figure 2.** Comparison of responses to 45° and 135° visual stimuli between naive and expert mice. **a.** Maps of activity as a function of preferred neuron orientation in naive mice. Warm colors indicate an increase in activity compared to the second before the stimulus, cold colors indicate a decrease. On the left the response to the visual stimulus oriented at 45°, on the right 135°. The blue and pink points on the x-axis indicate the position of the example neurons in Figure 1 in these graphs. **b.** Same graphs as **a.** but for expert mice. **c.** Average activity  $\pm$  standard deviation in orientation space during the first post-stimulus second, for 45° (green) and 135° (red) in naive mice. **d.** Same graphs as **c.** but for expert mice. **e.** Distribution of the peaks of the activity profiles of resampled trials in the space of preferred orientations for 45° (green) and 135° (red) in naive mice. **f.** Same graphs as **e.** but for expert mice



**Figure 3. Distorted representation of orientations flanking the task orientation.** **a.** Left: Map of activity as a function of preferred neuron orientation for a 60° stimulus in expert mice. Right: Distribution of the peaks of the activity profiles from trials reconstructed by resampling. **b.** Same graphs as **a.** but for a 90° stimulus. **c.** Peak distribution for responses to all orientations close to those of the task (30°, 60°, 120° and 150°) in expert mice. Data were aggregated and flipped in the orientation space for them to overlay. 0 indicates the presented orientation. The dotted line indicates the position of the task orientation (45° or 135°). The circle represents the orientations used to construct the graph (in color) and the task orientations (in black). **d.** Peak distribution for responses to orientations distant from the task orientations (0°, 90°, 180° and 270°). **e.** and **f.** same graphs as **c** and **d** but for naive mice. **g.** Difference between expert and naive mice in the average activity of neurons grouped by preferred orientation (width 20°) following the presentation of orientations close to the task orientations (30° and 120°). The shaded area indicates the s.e.m. The orientation of the stimuli is indicated by the gray dotted vertical bar. The data are centered so that the task orientations correspond to 0°. The star indicates a significant difference between groups of neurons. **h.** Same graph as **g.** but for 60° and 150°.

nation task with two orientations. The effects reported in the literature were different, sometimes even opposite. However, there is a consensus about the purpose behind these changes: the response to the rewarded stimulus is more salient after learning (Goltstein et al., 2013, 2018; Poort et al., 2015; Jurjut et al., 2017; Henschke et al., 2020). The variety of results present in the literature probably stems from the difference between experimental paradigms used (the stimuli, the required responses, and the way the V1 representations are evaluated). For example, one study (Berlau & Weinberger, 2008) showed that even with an identical task, modulations of the primary sensory cortex activity can be opposite if animals use different strategies to learn the task. In addition, two aspects of learning are involved. First, the system must improve its ability to detect and discriminate target stimuli (referred to as perceptual learning). Second, the activity evoked by the target stimulus must be associated with the behavioral response required in the task in a consistent and reliable manner (referred to as associative learning). As it is difficult to disentangle the role of these components, their interaction can generate variability. Thus, the results we show in this study should be interpreted within the specific framework of the task used.

Contrary to previous studies, we did not observe a positive modulation of the population response amplitude (Corbo et al., 2021). Nevertheless, the effects we discovered still participate in improving the representation of the orientations used in the task, and may contribute to the performance of the mice. Importantly, we chose the simplest possible task with orthogonal orientations. In this case, the sets of neurons coding for Go and NoGo should in theory not overlap, and the animals are able to discriminate between them easily. Thus, the main computational requirement in learning this task is related to association rather than to improvement of the ability to discriminate. In this context, limiting the population response to a consistent group of neurons could favor the association between the V1 out-

put and the behavioral response, through neural plasticity (Olshausen & Field, 2004).

Our results suggest that another computational advantage arising from this phenomena is the ability to generalize. Generalization allows flexibility in learning, making it possible to apply a learned association to a nearby input or situation (Poggio & Bizzi, 2004). In our case, by representing neighboring orientations as the task cues, V1 facilitates the animal's adaptation in case the task rules were to change subtly, or if the associated stimuli would have some variability. This is not the case in the context of controlled stimuli in the laboratory, but in the natural environment it might be advantageous to take into account the variance of inputs in associative learning.

This study contributes to a relatively recent effort to question the passive aspect of the early stages of sensory processing in the brain. The processing in the primary visual cortex has long been considered to be a stage of faithful representation of inputs, happening before the involvement of higher-level cognitive processing. We demonstrated here that knowledge, expectations and context act as filters on these early representations that feed higher-level processing. With the current study we developed an experimental paradigm for exploring this type of early processing filter, and laid the ground for future explorations of learning-induced distortions of sensory representations. What are their limits in the orientation space and in time? To what extent do these distortions depend on context and motivation? Can these distortions become disadvantageous when the orientations of Go and NoGo are very close? These are some of the questions we are currently exploring in our laboratory.

### Acknowledgments

I thank the Fyssen Foundation for offering me the opportunity to do this work, Pierre-Olivier Polack for his mentorship, Batuhan Erkat and John McClure for their contribution to this study, and Hussein Khmour for the support and insightful comments. I also thank Anya for helping with the translation.

# Exploring the role of the paraventricular thalamus in the regulation of feeding and energy balance

Giuseppe GANGAROSSA (Assistant Professor)

*Université Paris Cité, Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), UMR 8251, CNRS, F-75013 Paris, France*

## Abstract

The paraventricular thalamus (PVT) has recently emerged as a critical hub involved in the regulation of cognitive processes but also in the integration of homeostatic and visceral signals, thus controlling adaptive and food-seeking behavioral responses. However, despite growing evidence, the neural mechanisms by which the PVT neurocircuitry gates feeding, energy balance and nutrients partitioning remain largely unknown.

Here, we show that catecholaminergic projections from the hindbrain to the PVT and a specific population of PVT-neurons, notably those expressing the dopamine D2 receptors, promptly and bidirectionally (activation/inhibition) gate feeding behaviors, thereby contributing to the control of energy balance.

In addition, by combining complementary cutting-edge strategies to functional metabolic readouts, we describe PVT-neurons as gatekeepers of hunger and satiety.

This project may lead to a new understanding of unconventional brain circuits involved in food-related disorders.

## Keywords

Food intake, energy balance, thalamus, DREADDs, eating disorders

## Résumé

Le thalamus paraventriculaire (PVT) est récemment apparu comme un relai majeur dans la régulation des processus cognitifs, ainsi que dans l'intégration de signaux homéostatiques et viscéraux, contrôlant les réponses adaptatives du comportement. Cependant, les mécanismes neuronaux à travers lesquels le PVT contrôle la prise alimentaire et la balance énergétique restent inconnus.

A l'aide de plusieurs approches complémentaires, nous montrons que les projections catécholaminergiques du rhombencéphale vers le PVT et qu'une sous-population du PVT, notamment celle exprimant le récepteur D2 à la dopamine, contrôle la prise alimentaire, contribuant ainsi à la régulation dynamique de la balance énergétique.

De plus, à travers des approches innovantes combinées à des analyses fonctionnelles du métabolisme, nous avons découvert que les neurones du PVT façonnent la prise alimentaire et la balance énergétique en régulant les signaux de faim et satiété.

Ce projet pourrait conduire à une nouvelle compréhension des circuits centraux non-canoniques impliqués dans plusieurs troubles alimentaires.

## Mots clés

Prise alimentaire, balance énergétique, thalamus, DREADDs, troubles alimentaires

## Introduction

In mammals, the regulation of body homeostasis intricately relies on the orchestration of signals mirroring the integration of interoceptive (nutritional, metabolic) and exteroceptive (environmental) states (Sweeney & Yang, 2017). This integration is particularly evident in stress-related contexts where emotional states compete with the homeostatic regulation of energy balance and feeding (Maniam & Morris, 2012; Herzog, 2020), thereby leading to feed-forward allostatic (*stability through changes*) adaptations which may culminate in psychiatric and metabolic disorders. Indeed, homeostasis represents a cardinal biological principle that requires a dynamic crosstalk among several brain regions. Although the hypothalamus and the brainstem are widely recognized as the master regulators of feeding and energy homeostasis (Dietrich & Horvath, 2013; Timper & Brüning, 2017), other central nuclei seem to play a key role in orchestrating body homeostasis, food intake and energy balance. This is, at least in part, associated with multiple regulatory brain hubs that, by governing emotional, arousal and motivational food-associated functions, in turn contribute to the complex dynamics of feeding behaviors (Rossi & Stuber, 2018).

The paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) belongs to the midline intralaminar thalamic nuclei and its excitatory-projecting glutamate neurons receive a plethora of neurochemically distinct inputs from the prelimbic cortex, the hypothalamus and brainstem, and mainly project to the extended amygdala (nucleus accumbens, BNST and central amygdala) (Kirouac, 2015). This complex interconnectivity highlights a unique feature of the PVT in potentially relaying homeostatic, visceral and arousal-associated information to cognitive functions. In fact, to date, the PVT has been involved in several functions including arousal (Colavito *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2018), stress (Beas *et al.*, 2018), fear (Penzo *et al.*, 2015; Do-Monte *et al.*, 2017), appetitive and associative learning (Zhu *et al.*, 2018; Otis *et al.*, 2019), reward (Hamlin *et al.*, 2009; Zhang & van den Pol, 2017; Do-Monte *et al.*, 2017) and feeding (Ong *et al.*, 2017; Sofia Beas *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). The latter (food-seeking behavior) has been mostly studied according the definition of positive (motivation, reward, rein-

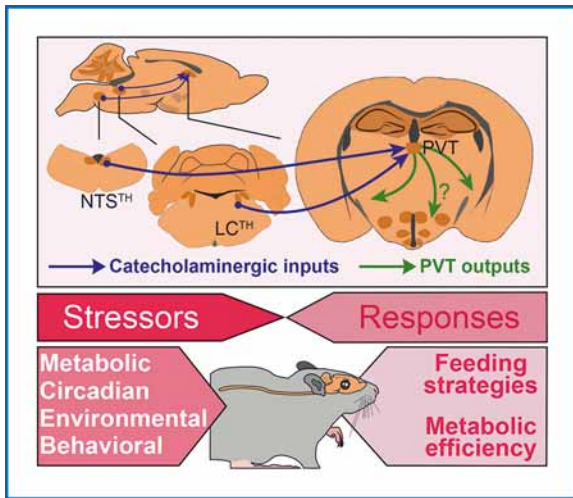
forcement) or negative valence (Labouèbe *et al.*, 2016a; Otis *et al.*, 2017; Do-Monte *et al.*, 2017; Otis *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021a; Engelke *et al.*, 2021). However, whether and how the PVT may govern feeding in its metabolic and energetic frame is still controversial.

## Hindbrain catecholaminergic inputs to the PVT scale feeding patterns

The involvement of PVT-neurons in the regulation of feeding and energy balance is also suggested by the variety of neurochemical inputs reaching the PVT. In fact, the PVT densely harbors fibers containing neuropeptide Y (NPY), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin (ORX) (Kirouac, 2015), thereby potentially pointing the PVT as an integrative node of energy-related homeostatic signals. In addition, the PVT receives dense catecholaminergic (CA) inputs [tyrosine hydroxylase (TH)-containing afferences] from homeostasis-related central nuclei such as the hypothalamus, locus coeruleus (LC) and brainstem (Kirouac, 2015; Beas *et al.*, 2018; Sofia Beas *et al.*, 2020). Recent reports have indicated that brain CA (norepinephrine, NE, and/or dopamine, DA), by modulating different homeostatic functions (*i.e.* wakefulness, arousal, glucoprivation-induced food seeking), may represent key neuromodulators of the PVT (Beas *et al.*, 2018; Sofia Beas *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021b). Moreover, brain CA are also important contributors to the regulation of stress-like responses (Valentino & Van Bockstaele, 2008; Kvetnansky *et al.*, 2009) which ultimately impact, directly and/or indirectly, on feeding patterns and behaviors (Xu *et al.*, 2019; Qu *et al.*, 2020).

We have recently demonstrated that hindbrain CA inputs to the PVT (TH-positive fibers from hindbrain<sup>TH</sup>-neurons, notably located in the LC and the nucleus tractus solitarius NTS) contribute in modulating feeding and homeostatic functions in stress-related contexts (**Figure 1**) (Dumont *et al.*, 2022).

Thus, we first decided to explore the role of PVT-receiving catecholaminergic inputs in the regulation of feeding patterns and metabolic efficiency. To study whether catecholaminergic (TH-positive) inputs to the PVT participate/contribute to the regulation of food intake, we decided to ablate TH-fibers projecting to the PVT by locally microinjecting 6-OHDA (**Figure 2A, B**), a



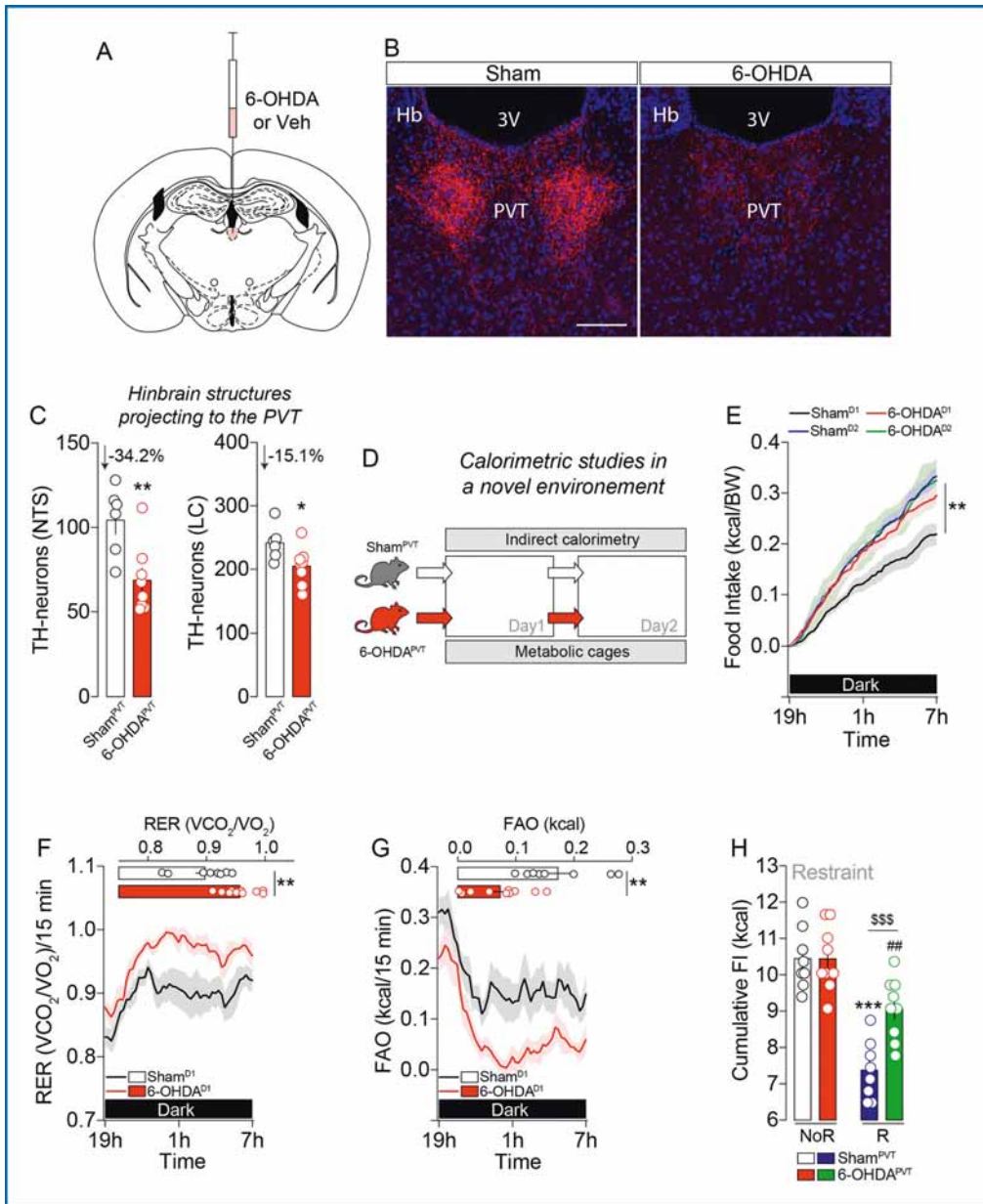
**Figure 1: Hindbrain<sup>TH</sup>→PVT catecholaminergic inputs regulate feeding responses.** Projections from NTS<sup>TH</sup> and LC<sup>TH</sup> neurons scale adaptive feeding strategies and metabolic efficiency in environmental, behavioral, metabolic and circadian stress-like contexts. This network contributes in placing the PVT and its input/output connections within a novel brain network involved in the regulation of homeostatic and allostatic processes at the functional crossroad between psychiatric and metabolic disorders (Dumont *et al.*, 2022).

neurotoxin reuptaken by DAT- and/or NET-expressing terminals. Immunofluorescence analysis revealed a significant reduction of TH-neurons in the nucleus tractus solitarius (NTS) and the locus coeruleus (LC) (**Figure 2C**), in line with the presence of *Slc6a2* (NET)-catecholaminergic neurons in these nuclei (Schroeter *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2021). Then, we analyzed the metabolic efficiency of 6-OHDA<sup>PVT</sup> and Sham<sup>PVT</sup> mice exposed to a novel environment during two consecutive exposures during the dark period (spontaneous feeding period, **Figure 2D**). While Sham<sup>PVT</sup> mice transiently (Day1) showed a reduction in food intake during the dark period (**Figure 2E**), 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice were less sensitive to novelty-induced hypophagia.

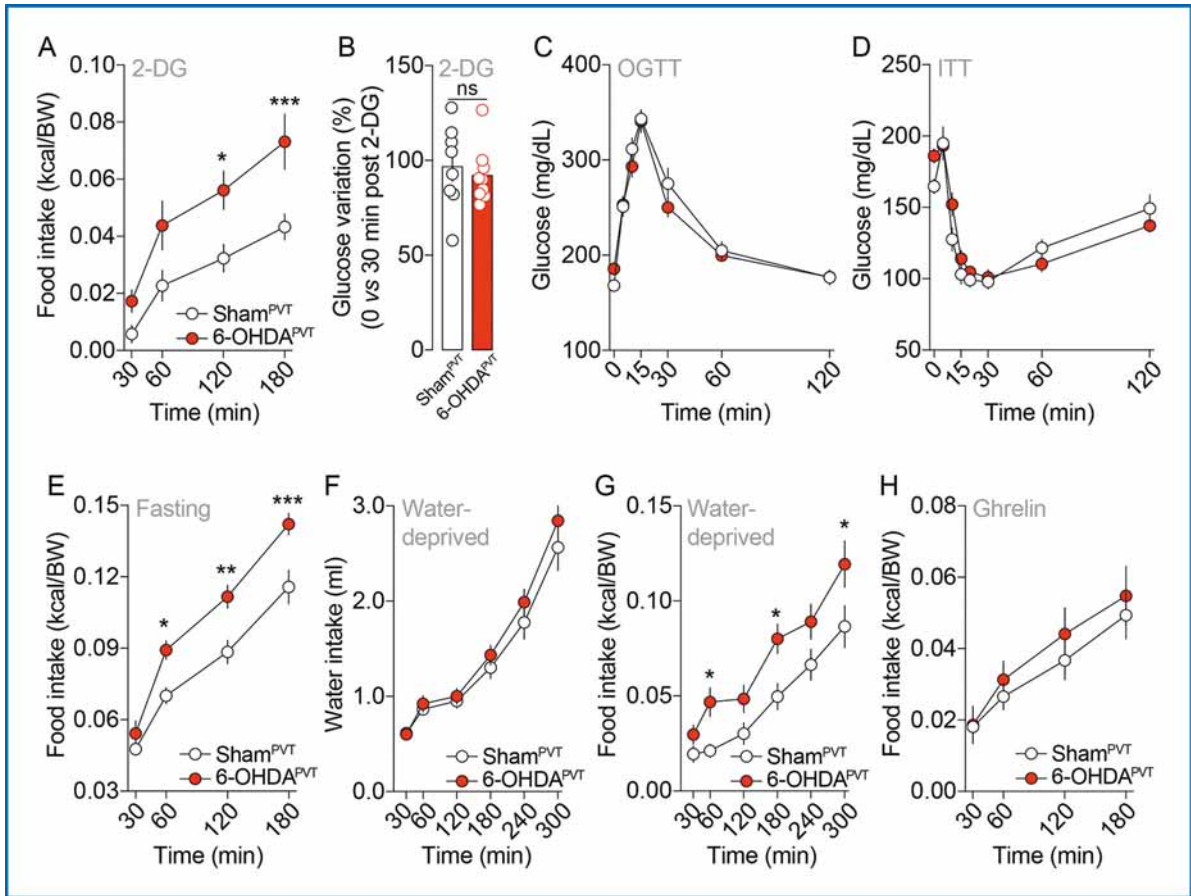
No differences in food intake were measured during Day2 period between the two groups, indicating a rapid restoration of homeostatic regulations associated to environmental habituation (**Figure 2E**). We also measured key whole-body metabolic parameters such as the respiratory exchange ratio (RER, indicative of the energy substrates used,  $RER \sim 1$  for carbohydrates,

$RER \sim 0.7$  for lipids) and fatty acid oxidation (FAO) during the exposure to the novel environment (Day1). Compared to Sham<sup>PVT</sup> mice, 6-OHDA<sup>PVT</sup> animals showed increased RER (**Figure 2F**) and decreased FAO (**Figure 2G**), mirroring the changes in food intake and indicating a shift of energy substrates use (carbohydrates and lipids) during exposure to a novel environment. These adaptations did not impact on energy expenditure (*data not shown*), suggesting that nutrient partitioning (Joly-Amado *et al.*, 2012), rather than total energy balance, was affected by the loss of hindbrain<sup>TH</sup>→PVT fibers. Next, we wondered whether hindbrain<sup>TH</sup>→PVT inputs guided feeding following physiological stressors. We used an acute restraint (immobilization) paradigm which is known to alter metabolism and food intake (Rybkin *et al.*, 1997; Vallès *et al.*, 2000; Rabasa & Dickson, 2016). Although both groups showed a significant reduction in food intake, stress-induced hypophagia was significantly more pronounced in Sham<sup>PVT</sup> compared to 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice (**Figure 2H**).

To further investigate the role of hindbrain<sup>TH</sup>→PVT inputs in scaling feeding, we used nutritional and metabolic stressors to modulate food intake. First, Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice were administered with 2-deoxy-d-glucose (2-DG) which, in virtue of its glucoprivic effects (neuroglucopenia), elicits food consumption as well as the typical glucose counterregulatory response (CRR) (Pénicaud *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 2006). Moreover, PVT-neurons are highly sensitive to glucoprivation (Labouèbe *et al.*, 2016a). In this conditions, 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice consumed more chow food than Sham<sup>PVT</sup> mice (**Figure 3A**), even though the magnitude of the glucose excursion as counterregulatory response was similar between groups (**Figure 3B**). This result suggests that hindbrain<sup>TH</sup>→PVT projections are required to fully express feeding adaptations to glucoprivic conditions but are dispensable for the autonomic control of glycogen breakdown and glucose production in CRR. In the same line, glucose clearance dynamics during an oral glucose tolerance test (OGTT, **Figure 3C**) or an insulin tolerance test (ITT, **Figure 3D**) were similar between sham and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice, indicating that glucose metabolism and insulin sensitivity remained unaltered following the loss of hindbrain<sup>TH</sup>→PVT inputs.



**Figure 2: Hindbrain<sup>TH</sup>→PVT catecholaminergic inputs regulate feeding and metabolic responses in stress-related contexts.** (A) Drawing represents the microinjection of 6-OHDA or Vehicle (Veh) in the mid-posterior PVT. (B) Immunofluorescence detection of tyrosine hydroxylase (TH) within the PVT in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice. Scale bar: 150  $\mu$ m. (C) Quantification of TH-positive neurons in the NTS and LC. Statistics: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , 6-OHDA<sup>PVT</sup> vs Sham<sup>PVT</sup> mice. (D) Investigation of food intake and metabolic efficiency using metabolic cages during two consecutive exposures to a novel environment. (E) Food intake during the dark phase (spontaneous eating) in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice during two consecutive exposures to a novel environment. Measurements of the respiratory exchange ratio (RER, F) and fatty acid oxidation (FAO, G) in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice during the first exposure (Day 1) to a novel environment. Statistics: \*\*  $p < 0.01$ , 6-OHDA<sup>D1</sup> vs Sham<sup>D1</sup> groups. (H) Food intake in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice after a restraint stress (immobilization). NoR: No Restraint (control conditions). R: Restraint. Statistics: \*\*\*  $p < 0.001$ , Restraint vs No Restraint (Sham<sup>PVT</sup>); ##  $p < 0.01$ , Restraint vs No Restraint (6-OHDA<sup>PVT</sup>); \$\$\$  $p < 0.001$ , 6-OHDA<sup>PVT</sup> vs Sham<sup>PVT</sup> mice (Restraint).



**Figure 3: Hindbrain<sup>TH</sup>→PVT catecholaminergic inputs regulate feeding responses following nutritional and metabolic stress.** (A) Food intake in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice administered with 2-DG (500 mg/kg, i.p., neuroglucopenia-induced feeding). (B) Glucose variation (%) following administration of 2-DG (0 vs 30 min post administration). Note: neuroglucopenia-induced hyperglycemia is the typical readout of the glucose counterregulatory response (CRR). (C, D) Glucose dynamics during the oral glucose tolerance test (OGTT, C) and the insulin tolerance test (ITT, D). No differences were observed between groups. (E) Food intake in overnight fasted Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice (refeeding). (F) Water intake in overnight water-deprived Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice. (G) Food intake in overnight water-deprived Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice. (H) Food intake in Sham<sup>PVT</sup> and 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice administered with ghrelin (0.5 mg/kg, i.p., orexigenic response). Statistics: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , 6-OHDA<sup>PVT</sup> vs Sham<sup>PVT</sup> mice.

Second, we performed a fasting-refeeding test to mimic a negative energy balance (food deprivation). After an overnight fasting, both experimental groups showed an enhanced food intake with 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice consuming more food than Sham<sup>PVT</sup> mice (Figure 3E). Third, we also decided to measure drinking and food intake in overnight water-deprived animals. After deprivation, mice were exposed to water. While no differences were observed in drinking behavior (Figure 3F), 6-OHDA<sup>PVT</sup> mice again consumed more food than Sham<sup>PVT</sup> mice (Figure 3G). These results suggest that hindbrain<sup>TH</sup>→PVT

inputs scale food intake also following physiological and metabolic stressors. In order to assess whether orexigenic signals without metabolic challenges also required an intact PVT catecholaminergic transmission, we administered ghrelin in fed mice. As shown in Figure 3H, ghrelin similarly induced an increase in food intake in both groups, thereby indicating that canonical orexinergic circuits are not altered.

Altogether, these results highlight the existence of a novel extra-hypothalamic circuit able to regulate feeding patterns.

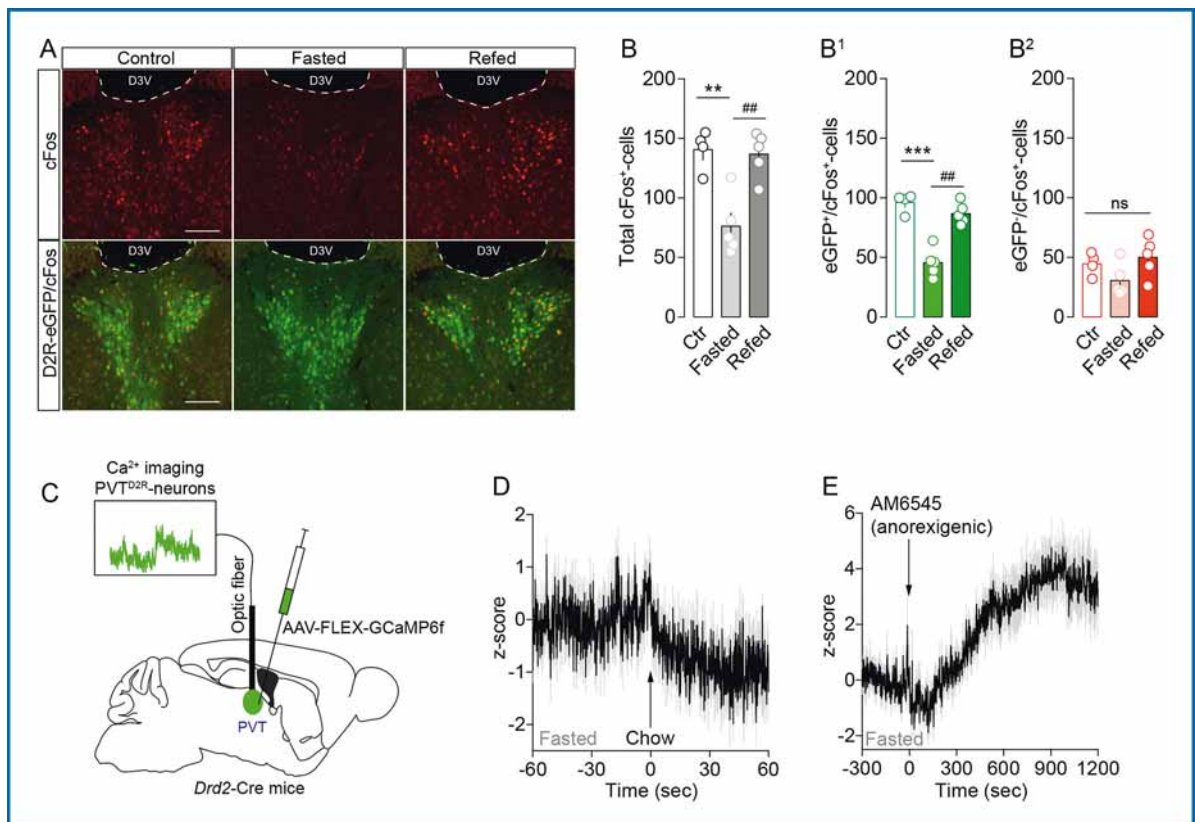


## D2R-containing PVT-neurons are critical regulators of feeding

The presence of strong CA projections indicate that the PVT may also harbor catecholamines-associated receptors. Only recently, it has been reported that the PVT contains at least two major cell type-specific neuronal populations, notably galanin- and dopamine D2R-expressing neurons (Gao *et al.*, 2020), with the latter representing the main cell type in the mid-posterior PVT. Interestingly, PVT<sup>D2R</sup>-neurons have recently been involved in modulating the psychomotor effects of cocaine (Clark *et al.*, 2017) and emotions-related behaviors (Gao *et al.*, 2020). Whether PVT<sup>D2R</sup>-neurons, as their CA-releasing fibers, contribute to the regulation of food intake and energy homeostasis remains largely unknown.

Here, taking advantage of region- and cell type-specific *in vivo* integrative approaches, we provide key evidence that DA/NE-sensitive PVT<sup>D2R</sup>-neurons (Gao *et al.*, 2020) are dynamically involved in scaling food intake. Using *Drd2-eGFP* mice, we investigated whether nutritional states were associated with a modulation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons. We observed that overnight fasting was associated with a significant decrease of cFos expression in PVT<sup>D2R</sup>-neurons (**Fig. 4A, B, B<sup>1</sup>**) and that such reduction was abolished in re-fed mice (**Fig. 4A, B, B<sup>1</sup>**). These first results indicate that PVT<sup>D2R</sup>-neurons can be modulated by nutritional and/or hunger/satiety signals.

Then we decided to explore *in vivo* dynamics using Ca<sup>2+</sup> monitoring techniques, notably fiber photometry, in freely moving mice. *Drd2-Cre*



**Figure 4: PVT<sup>D2R</sup>-neurons are modulated by food and nutritional states.** (A) Immunofluorescence detection of cFos (red) and eGFP (green) in the PVT. (B) Number of cFos-positive neurons in control, fasted and re-fed conditions. (B<sup>1</sup>) cFos activation in D2R-eGFP-positive neurons. (B<sup>2</sup>) cFos activation in D2R-eGFP-negative neurons. (C) Scheme represent *in vivo* fiber photometry strategy. (D) Longitudinal detection of Ca<sup>2+</sup> transients in PVT<sup>D2R</sup>-neurons during food intake of a regular chow pellet. (E) Longitudinal detection of Ca<sup>2+</sup> transients in PVT<sup>D2R</sup>-neurons of fasted animals injected with the satietogenic (anorexigenic) AM6545. Statistics: \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

mice were therefore injected with a Cre-dependent AAV9-hSyn-FLEX-GCaMP6f and implanted with an optic fiber to record longitudinal signals (**Fig. 4C**). In *Drd2-Cre<sup>PVT::GCaMP6f</sup>* fasted mice exposed to a pellet of standard diet (SD), we observed that initiation of feeding was associated with a significant decrease of Ca<sup>2+</sup> transients in PVT<sup>D2R</sup>-neurons (**Fig. 4D**). Such feeding-induced reduced activity of PVT<sup>D2R</sup>-neurons was also observed when *Drd2-Cre<sup>PVT::GCaMP6f</sup>* were exposed to high-fat high-sugar diet (HFHS) (*data not shown*). These results indicate that the modulation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons activity depends more on food availability than food palatability. Then, we decided to investigate whether satietogenic signals were efficient in modulating PVT<sup>D2R</sup>-neurons activity. Here, *Drd2-Cre<sup>PVT::GCaMP6f</sup>* fasted mice (overnight fasting) were administered with the peripheral CB1R antagonist AM6545, a compound known to reduce food intake and activate satietogenic pathways (Tam *et al.*, 2010; Berland *et al.*, 2020). Interestingly, pharmacologically mediated satietogenic signals induced a significant activation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons (**Fig. 4E**). These results indicate that PVT<sup>D2R</sup>-neurons are (i) rapidly modulated by food intake and (ii) bidirectionally respond to hunger and satiety signals.

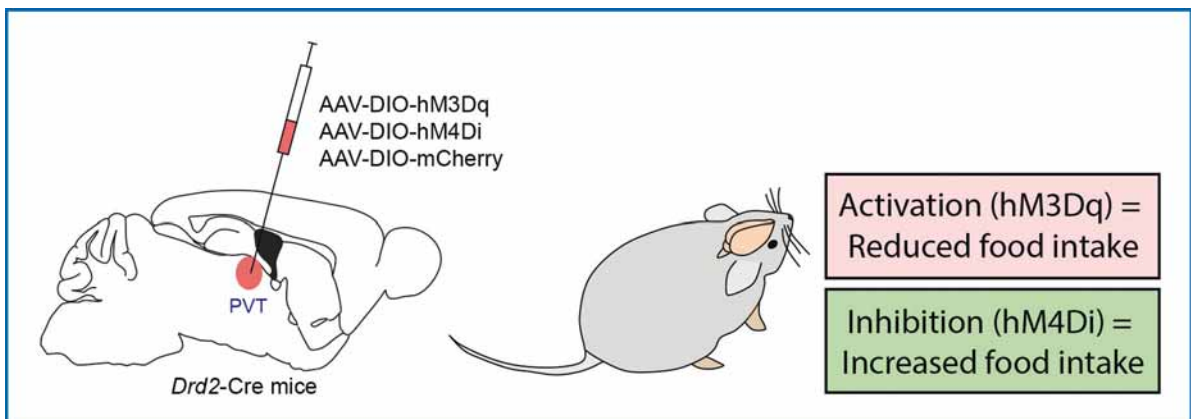
Currently, by using chemogenetic approaches (Roth, 2016) (DREADDs) to selectively and specifically manipulate PVT<sup>D2R</sup>-neurons, we are exploring whether and how selective activation (hM3Dq) and/or inhibition (hM4Di) of PVT<sup>D2R</sup>-neurons bidirectionally modulate food intake and energy balance. Our preliminary results indi-

cate that activation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons reduces food intake whereas inhibition promotes food intake (**Figure 5**).

## Discussion

In this study, we show for the first time that catecholaminergic (NE/DA) inputs to the PVT and a subpopulation of NE/DA-sensitive PVT-neurons, notably those expressing the dopamine D2 receptor (PVT<sup>D2R</sup>-neurons), acts as key player in modulating food intake and metabolic efficiency. Interestingly, taking advantage of *in vivo* techniques and cell type-specific approaches, we reveal that the PVT functions as gatekeeper of body homeostasis. These findings are novel and of interest as they demonstrate that non-canonical extra-hypothalamic structures are critical players in gating food-associated behaviors.

For decades the PVT has been acknowledged as an important node of the limbic system, thereby associating its functions to affective, motivated and emotional behaviors (Barson *et al.*, 2020). In addition, pioneering studies have also suggested that the PVT may influence feeding behaviors by a hypothalamic-thalamic-striatal circuit (Kelley *et al.*, 2005). This notion has been recently investigated in light of motivated behaviors, indicating that the PVT may participate to feeding by scaling reward events (Barson *et al.*, 2015; Labouèbe *et al.*, 2016b; Zhang & van den Pol, 2017; Haight *et al.*, 2017). Interestingly, optogenetic manipulations of either PVT-neurons or PVT efferents have shown a clear modulation of food intake (Betley *et al.*, 2013; Labouèbe *et al.*, 2016b; Zhang & van den Pol,



**Figure 5: Pharmacogenetic modulation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons scale food intake.** Activation and inhibition of PVT<sup>D2R</sup>-neurons bidirectionally alter feeding patterns in lean animals.

2017). Only recently, it has been shown that PVT-neurons, despite all being glutamatergic, can be distinguished at least in two cell type-specific populations, notable galanin- and D2R-containing neurons (Gao *et al.*, 2020). While galanin-neurons are present in the anterior PVT (aPVT), D2R-neurons are located in the posterior PVT (pPVT) (Gao *et al.*, 2020). Although the developmental mechanisms underlying this segregation are still unknown, this rostro-caudal regionalization of PVT neurons is of interest as catecholaminergic inputs arising from the locus coeruleus (LC) and brainstem have been involved in mediating feeding patterns and may mediate the modulation of catecholamine-sensitive PVT neurons, notably PVT<sup>D2R</sup>-neurons (Beas *et al.*, 2018; Sofia Beas *et al.*, 2020). In line with this latter hypothesis, our results suggest that PVT catecholaminergic inputs (Dumont *et al.*, 2022) and PVT<sup>D2R</sup>-neurons participate in the control of food take and metabolic efficiency. Although our findings do not yet point to a specific mechanism of central regulation, it is interesting to highlight the connections between PVT<sup>D2R</sup>-neurons and hypothalamic regions (Dumont *et al.*, 2022). These two key structures strongly govern both food intake and glucose homeostasis (Stuber & Wise, 2016; Chen *et al.*, 2017; Stanley *et al.*, 2019). Therefore, it is reasonable to hypothesize that PVT<sup>D2R</sup>-to-LH and PVT<sup>D2R</sup>-to-DMH projections may be critical in allowing the regulation of homeostatic functions. Indeed, the use of retrograde or anterograde chemogenetic strategies will be useful to dissect out projections-specific functions.

Importantly, our current results open future research lines of investigation aimed at exploring whether and how PVT<sup>D2R</sup>-neurons may be a functional target to counteract the hyperphagic phenotype and the metabolic maladaptations observed in obesity. In fact, in the near future we will explore whether chemogenetic activation of PVT<sup>D2R</sup>-neurons may be a valuable therapeutic approach to reduce food intake in obese animals and restore their metabolic deficits.

In conclusion, our study may pave the way (i) to a better understanding of non-canonical

homeostatic circuits as well as (ii) to the exploration of alternative therapeutic strategies to counteract eating and homeostatic disorders.

## Acknowledgements

This study was supported by the Fyssen Foundation. The author wishes to thank all the members of the C2OFFEE team (Unité BFA, Université Paris Cité) and Dr. Emmanuel Valjent (IGF, Université de Montpellier).

## Bibliography

- Barson JR, Ho HT & Leibowitz SF (2015). Anterior thalamic paraventricular nucleus is involved in intermittent access ethanol drinking: role of orexin receptor 2. *Addict Biol* 20, 469–481.
- Barson JR, Mack NR & Gao W-J (2020). The Paraventricular Nucleus of the Thalamus Is an Important Node in the Emotional Processing Network. *Front Behav Neurosci* 14, 598469.
- Beas BS, Wright BJ, Skirzewski M, Leng Y, Hyun JH, Koita O, Ringelberg N, Kwon H-B, Buonanno A & Penzo MA (2018). The locus coeruleus drives disinhibition in the midline thalamus via a dopaminergic mechanism. *Nat Neurosci* 21, 963–973.
- Berland C, Castel J, Montalban E, Foppen E, Martin C, Muccioli GG, Luquet S & Gangarossa G (2020). Identification of an endocannabinoid gut-brain vagal mechanism controlling food reward and energy homeostasis. *bioRxiv*2020.11.14.382291.
- Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD & Sternson SM (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155, 1337–1350.
- Chen M, Shrestha YB, Podyma B, Cui Z, Naglieri B, Sun H, Ho T, Wilson EA, Li Y-Q, Gavrilova O & Weinstein LS (2017). Gs $\alpha$  deficiency in the dorsomedial hypothalamus underlies obesity associated with Gs $\alpha$  mutations. *J Clin Invest* 127, 500–510.
- Clark AM, Leroy F, Martyniuk KM, Feng W, McManus E, Bailey MR, Javitch JA, Balsam PD & Kellendonk C (2017). Dopamine D2 Receptors in the Paraventricular Thalamus Attenuate

**“Our results suggest that PVT catecholaminergic inputs and PVT<sup>D2R</sup>-neurons participate in the control of food take and metabolic efficiency.”**

Cocaine Locomotor Sensitization. *eNeuro*; DOI: 10.1523/ENEURO.0227-17.2017.

- Colavito V, Tesoriero C, Wirtu AT, Grassi-Zucconi G & Bentivoglio M (2015). Limbic thalamus and state-dependent behavior: The paraventricular nucleus of the thalamic midline as a node in circadian timing and sleep/wake-regulatory networks. *Neurosci Biobehav Rev* 54, 3–17.

- Dietrich MO & Horvath TL (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 36, 65–73.

- Do-Monte FH, Minier-Toribio A, Quiñones-Laracuenta K, Medina-Colón EM & Quirk GJ (2017). Thalamic Regulation of Sucrose Seeking during Unexpected Reward Omission. *Neuron* 94, 388–400.e4.

- Dumont C, Li G, Castel J, Luquet S & Gangarossa G (2022). Hindbrain catecholaminergic inputs to the paraventricular thalamus scale feeding and metabolic efficiency in stress-related contexts. 2022.02.03.478953. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.03.478953v1> [Accessed March 22, 2022].

- Engelke DS, Zhang XO, O'Malley JJ, Fernandez-Leon JA, Li S, Kirouac GJ, Beierlein M & Do-Monte FH (2021). A hypothalamic-thalamostriatal circuit that controls approach-avoidance conflict in rats. *Nat Commun* 12, 2517.

- Gao C, Leng Y, Ma J, Rooke V, Rodriguez-Gonzalez S, Ramakrishnan C, Deisseroth K & Penzo MA (2020). Two genetically, anatomically and functionally distinct cell types segregate across anteroposterior axis of paraventricular thalamus. *Nat Neurosci* 23, 217–228.

- Haight JL, Fuller ZL, Fraser KM & Flagel SB (2017). A food-predictive cue attributed with incentive salience engages subcortical afferents and efferents of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Neuroscience* 340, 135–152.

- Hamlin AS, Clemens KJ, Choi EA & McNally GP (2009). Paraventricular thalamus mediates context-induced reinstatement (renewal) of extinguished reward seeking. *Eur J Neurosci* 29, 802–812.

- Herzog H (2020). Integrated pathways that control stress and energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 16, 75–76.

- Joly-Amado A, Denis RGP, Castel J, Lacombe A, Cansell C, Rouch C, Kassis N,

Dairou J, Cani PD, Ventura-Clapier R, Prola A, Flamment M, Foufelle F, Magnan C & Luquet S (2012). Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J* 31, 4276–4288.

- Kelley AE, Baldo BA & Pratt WE (2005). A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. *J Comp Neurol* 493, 72–85.

- Kirouac GJ (2015). Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 56, 315–329.

- Kvetnansky R, Sabban EL & Palkovits M (2009). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89, 535–606.

- Labouèbe G, Boutrel B, Tarussio D & Thorens B (2016a). Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. *Nat Neurosci* 19, 999–1002.

- Labouèbe G, Boutrel B, Tarussio D & Thorens B (2016b). Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. *Nat Neurosci* 19, 999–1002.

- Lewis SR, Ahmed S, Khaimov E, Israel Y, Singh A, Kandov Y, Kest B & Bodnar RJ (2006). Genetic variance contributes to ingestive processes: a survey of 2-deoxy-D-glucose-induced feeding in eleven inbred mouse strains. *Physiol Behav* 87, 595–601.

- Maniam J & Morris MJ (2012). The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63, 97–110.

- Ong ZY, Liu J-J, Pang ZP & Grill HJ (2017). Paraventricular Thalamic Control of Food Intake and Reward: Role of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Signaling. *Neuropsychopharmacology* 42, 2387–2397.

- Otis JM, Namboodiri VMK, Matan AM, Voets ES, Mohorn EP, Kosyk O, McHenry JA, Robinson JE, Resendez SL, Rossi MA & Stuber GD (2017). Prefrontal cortex output circuits guide reward seeking through divergent cue encoding. *Nature* 543, 103–107.

- Otis JM, Zhu M, Namboodiri VMK, Cook CA, Kosyk O, Matan AM, Ying R, Hashikawa Y, Hashikawa K, Trujillo-Pisanty I, Guo J, Ung RL, Rodriguez-Romaguera J, Anton ES & Stuber GD (2019). Paraventricular Thalamus Projection

Neurons Integrate Cortical and Hypothalamic Signals for Cue-Reward Processing. *Neuron* 103, 423-431.e4.

- Pénicaud L, Thompson DA & Le Magnen J (1986). Effects of 2-deoxy-D-glucose on food and water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav* 36, 431–435.
- Penzo MA, Robert V, Tucciarone J, De Bunder D, Wang M, Van Aelst L, Darvas M, Parada LF, Palmiter RD, He M, Huang ZJ & Li B (2015). The paraventricular thalamus controls a central amygdala fear circuit. *Nature* 519, 455–459.
- Qu N, He Y, Wang C, Xu P, Yang Y, Cai X, Liu H, Yu K, Pei Z, Hyseni I, Sun Z, Fukuda M, Li Y, Tian Q & Xu Y (2020). A POMC-originated circuit regulates stress-induced hypophagia, depression, and anhedonia. *Mol Psychiatry* 25, 1006–1021.
- Rabasa C & Dickson SL (2016). Impact of stress on metabolism and energy balance. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 9, 71–77.
- Ren S et al. (2018). The paraventricular thalamus is a critical thalamic area for wakefulness. *Science* 362, 429–434.
- Rossi MA & Stuber GD (2018). Overlapping Brain Circuits for Homeostatic and Hedonic Feeding. *Cell Metab* 27, 42–56.
- Roth BL (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694.
- Rybkin II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin GN, Ryan DH & Harris RB (1997). Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol* 273, R1612-1622.
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, Sesack SR & Blakely RD (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *J Comp Neurol* 420, 211–232.
- Sofia Beas B, Gu X, Leng Y, Koita O, Rodriguez-Gonzalez S, Kindel M, Matikainen-Ankney BA, Larsen RS, Kravitz AV, Hoon MA & Penzo MA (2020). A ventrolateral medulla-midline thalamic circuit for hypoglycemic feeding. *Nat Commun* 11, 6218.
- Stanley S, Moheet A & Seaquist ER (2019). Central Mechanisms of Glucose Sensing and Counterregulation in Defense of Hypoglycemia. *Endocr Rev* 40, 768–788.
- Stuber GD & Wise RA (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19, 198–205.
- Sweeney P & Yang Y (2017). Neural Circuit Mechanisms Underlying Emotional Regulation of Homeostatic Feeding. *Trends Endocrinol Metab* 28, 437–448.
- Tam J, Vemuri VK, Liu J, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Godlewski G, Osei-Hyiaman D, Ohnuma S, Ambudkar SV, Pickel J, Makriyannis A & Kunos G (2010). Peripheral CB1 cannabinoid receptor blockade improves cardiometabolic risk in mouse models of obesity. *J Clin Invest* 120, 2953–2966.
- Timper K & Brüning JC (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Dis Model Mech* 10, 679–689.
- Valentino RJ & Van Bockstaele E (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *Eur J Pharmacol* 583, 194–203.
- Vallès A, Martí O, García A & Armario A (2000). Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1138-1144.
- Wang C, Zhou W, He Y, Yang T, Xu P, Yang Y, Cai X, Wang J, Liu H, Yu M, Liang C, Yang T, Liu H, Fukuda M, Tong Q, Wu Q, Sun Z, He Y & Xu Y (2021a). AgRP neurons trigger long-term potentiation and facilitate food seeking. *Transl Psychiatry* 11, 11.
- Wang Y, Xu L, Liu M-Z, Hu D-D, Fang F, Xu D-J, Zhang R, Hua X-X, Li J-B, Zhang L, Huang L-N & Mu D (2021b). Norepinephrine modulates wakefulness via  $\alpha 1$  adrenoceptors in paraventricular thalamic nucleus. *iScience* 24, 103015.
- Xu Y, Lu Y, Cassidy RM, Mangieri LR, Zhu C, Huang X, Jiang Z, Justice NJ, Xu Y, Arenkiel BR & Tong Q (2019). Identification of a neurocircuit underlying regulation of feeding by stress-related emotional responses. *Nat Commun* 10, 3446.
- Zhang C, Kaye JA, Cai Z, Wang Y, Prescott SL & Liberles SD (2021). Area Postrema Cell Types that Mediate Nausea-Associated Behaviors. *Neuron* 109, 461-472.e5.

- Zhang J, Chen D, Sweeney P & Yang Y (2020). An excitatory ventromedial hypothalamus to paraventricular thalamus circuit that suppresses food intake. *Nat Commun* 11, 6326.
- Zhang X & van den Pol AN (2017). Rapid binge-like eating and body weight gain driven by zona incerta GABA neuron activation. *Science* 356, 853–859.
- Zhu Y, Nachtrab G, Keyes PC, Allen WE, Luo L & Chen X (2018). Dynamic salience processing in paraventricular thalamus gates associative learning. *Science* 362, 423–429.

# Circuits longs pour l'apprentissage d'une tâche audio-motrice : étude du contrôle cholinergique de l'apprentissage sensorimoteur

Jennifer LAWLOR

*Johns Hopkins University, Department of Psychological and Brain Sciences, Baltimore, MD*

## Résumé

L'hypothèse selon laquelle la plasticité cérébrale supporte l'apprentissage est ancienne. Au niveau du cortex auditif, cette idée émerge de nombreuses observations où l'encodage fonctionnel est modifié en direction du stimulus appris. Plusieurs études suggèrent que les projections cholinergiques du prosencéphale basal sont essentielles pour modifier la plasticité du cortex auditif. ***Quel rôle joue la neuromodulation au cours de l'acquisition rapide d'une tâche ?*** Nous testons l'hypothèse selon laquelle le mode phasique de la neuromodulation cholinergique produit un 'signal instructeur' qui instruit la plasticité du cortex auditif, augmente la discriminabilité du stimulus et lie le stimulus avec le renforcement. Nous combinons une nouvelle approche comportementale avec l'imagerie calcique à deux-photons bicolore afin d'observer simultanément l'activité corticale et l'activité cholinergique au cours de l'apprentissage d'une tâche audio-motrice. Nous utilisons ensuite une manipulation optogénétique afin de déterminer si la neuromodulation cholinergique est impliquée dans la phase d'acquisition de la tâche.

## Mots-clés

Apprentissage, Cortex Auditif, Neuromodulation Cholinergique, Imagerie calcique à deux-photons

## Long-range circuits for learning of audiomotor tasks : investigating cholinergic control of sensorimotor learning

### Summary

It has long been thought that the brain's plastic nature supports learning. At the level of the auditory cortex, this idea stems from reported changes in functional encoding of sounds towards learned stimuli. Learning an audiomotor task requires pairing sensory inputs with the adequate motor response. Prior work has pointed to cholinergic projections from the basal forebrain as a key mediator of auditory cortex plasticity. ***What role does neuromodulation play in enabling rapid, task acquisition?*** Here, we test the hypothesis that phasic, cholinergic neuromodulation provides a 'teaching signal' that drives primary auditory cortex (A1) plasticity, enhances stimulus discrimination, and links these discriminative representations with reinforcement. To test this, we exploit a novel behavioral approach and combine this with two-color, two-photon imaging to simultaneously observe cortical and cholinergic activity during learning of an audiomotor task.

### Keywords

Learning, Auditory Cortex, Cholinergic Neuromodulation, Two-photon calcium imaging

## Introduction

L'apprentissage est une fonction fondamentale du monde vivant et fait référence à des changements de comportement durables résultant de l'expérience. Dans un environnement dynamique, apprendre à réagir de manière appropriée face à une nouvelle situation est un avantage évolutif. ***Comment une nouvelle association sensorimotrice est-elle mise en place dans le cerveau ?*** Les changements de comportement sont présumés être sous-tendus par des modifications des circuits cérébraux liés aux caractéristiques apprises. Les modèles hebbiens mettent l'accent sur le rôle de la plasticité synaptique dans l'apprentissage et sont étayés par un vaste corpus de travaux expérimentaux<sup>1-4</sup>. Au niveau macroscopique, la plasticité se manifeste par une réorganisation corticale orientée vers le stimulus ou l'action apprise<sup>5-9</sup>. La mise en place d'un nouvel appariement sensorimoteur est un problème qui comprend plusieurs niveaux car il nécessite d'apparier des événements temporels distincts (sensoriels, moteurs et résultats) en utilisant des substrats fonctionnellement et anatomiquement séparés (les différentes aires corticales). Par conséquent, un mécanisme neuronal qui fonctionne à plusieurs échelles de temps et dans toutes les régions du cerveau pourrait favoriser la plasticité liée à l'apprentissage. Les systèmes neuromodulateurs avec leurs activités qui évoluent temporellement sur plusieurs échelles<sup>10,11</sup> et leurs larges projections<sup>12,13</sup> remplissent ces critères. Plus précisément, un ensemble de travaux robustes indique que le prosencéphale basal cholinergique (CBF) joue un rôle clé dans la plasticité corticale sensorielle et motrice<sup>14-18</sup>. Une stimulation du CBF concomitante avec la présentation de stimuli suffit à induire une plasticité corticale liée au stimulus apparié dans les cortex sensoriels<sup>15,18,19</sup>. De plus, l'activité du CBF semble corrélée avec différents aspects de la séquence stimulus-action-effet. Chez les rongeurs, les neurones CBF répondent précisément au renforcement<sup>20,21</sup>, au mouvement<sup>22,23</sup> et aux sons qui prédisent une récompense<sup>22,24,25</sup>. Ici, nous testons l'hypothèse selon laquelle le mode phasique de la neuromodulation cholinergique produit un 'signal instructeur' qui instruit la plasticité du cortex auditif, augmente la discriminabilité du stimulus et lie le stimulus avec le renforcement.

## Matériels et Méthodes

### Imagerie calcique bicolore à deux photons

Afin de caractériser l'activité des projections axonales cholinergiques dans le cortex auditif (AC), une injection virale de GCaMP6s<sup>26</sup> axonal (AAV5-hsyn-flex-axons-GCaMP6s) fut réalisée dans le prosencéphale basal de souris ChAT-Cre (ChAT-IRES-Cre, Jackson Laboratory). Cela permet l'expression spécifique de GCaMP dans les projections axonales cholinergiques. Une partie des animaux (6/10 des animaux comportementaux) ont reçu multiples injections (3 à 6) d'une protéine fluorescente rouge<sup>27</sup> (RGECO1) dans le AC ciblant localement tous les neurones. Une fenêtre en verre a été implantée (diamètre : 3 mm) au-dessus de l'AC ainsi qu'une pièce en métal permettant la fixation de la tête. Au cours de chaque session d'imagerie, un animal est placé dans une boîte insonorisée, équipée pour la présentation de stimuli auditifs, le comportement et l'imagerie. Les canaux vert et rouge ont été simultanément enregistrés afin d'obtenir une imagerie bicolore à deux photons lors du comportement ou d'une écoute passive.

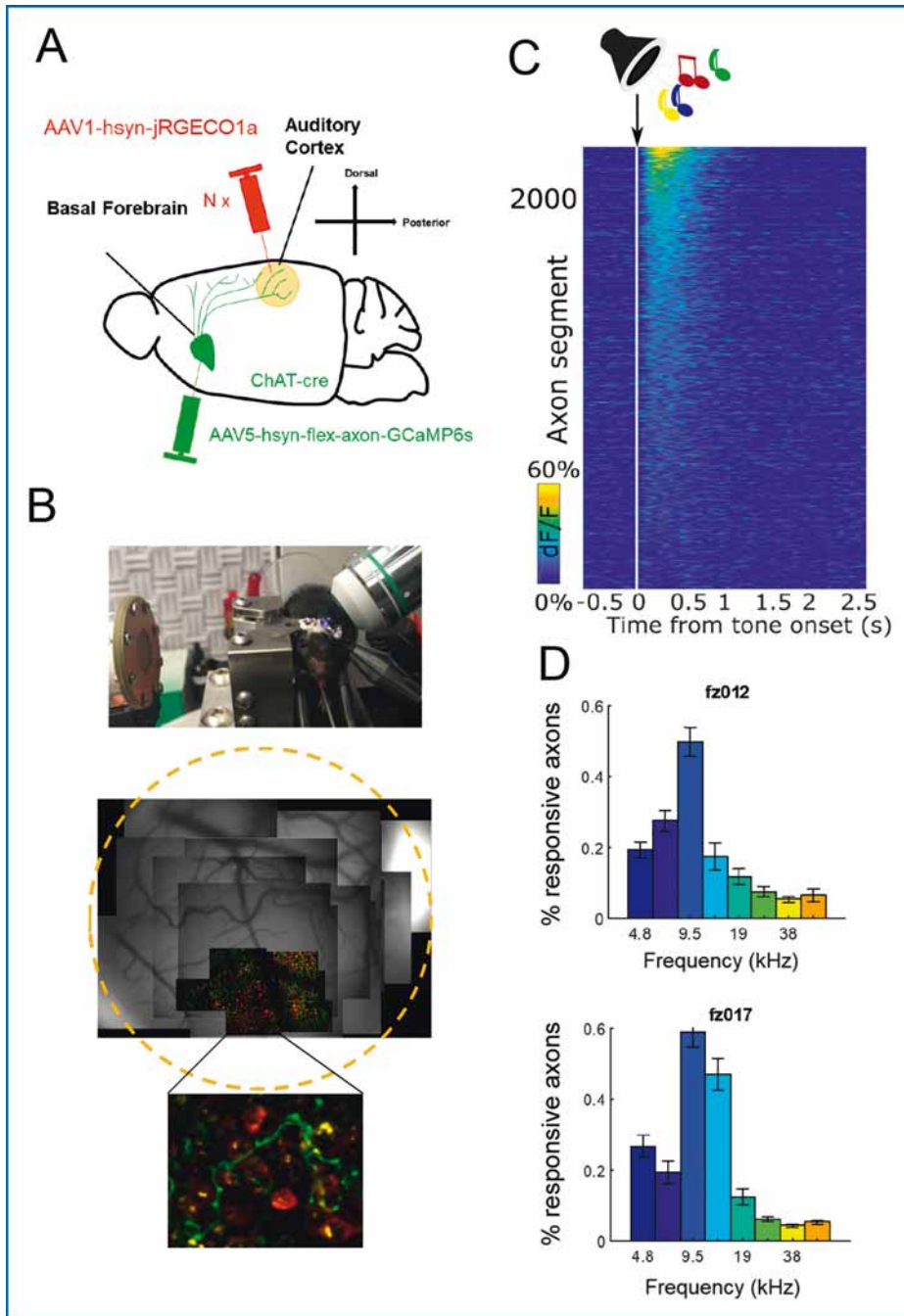
### Stimuli auditifs

Afin de caractériser les propriétés auditives fonctionnelles des axones cholinergiques dans l'AC, nous avons présenté 3 types de stimuli auditifs : des sons purs présentés de manière pseudo-aléatoire (4-64 kHz, espacement ½ oct.), du bruit blanc et des stimuli modulés en fréquence (ascendants et descendants : 4-64 kHz). Tous les stimuli ont été calibrés pour une présentation au-dessus du seuil à 70 dB (à 5 cm de l'oreille). Deux tons purs espacés de ¾ d'oct. ont été sélectionnés pour le comportement et présentés à 70 dB.

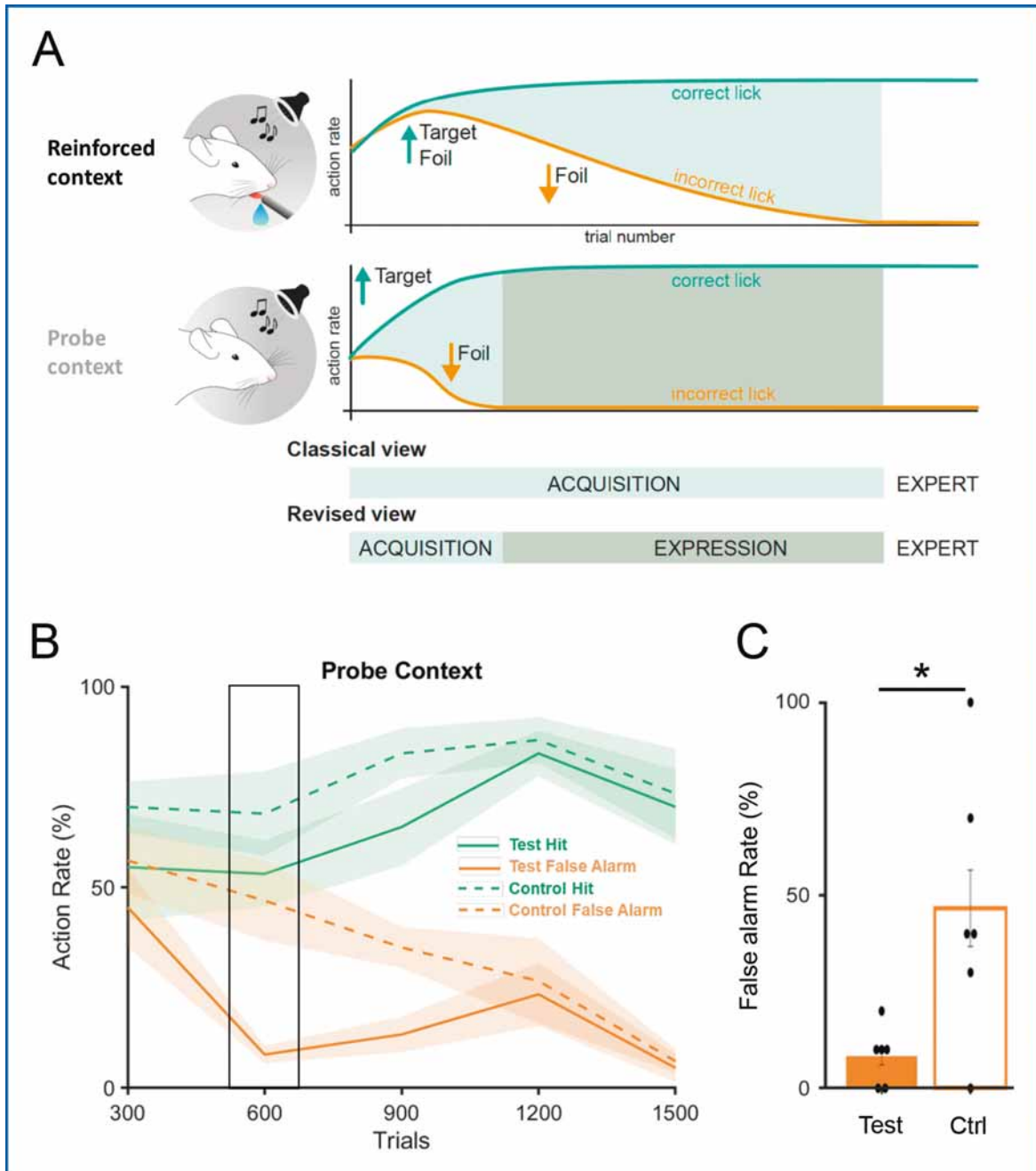
### Paradigme comportemental

Dans un article récemment publié par mon laboratoire d'accueil, Kuchibhotla et al. démontrent qu'il est possible de dissocier l'acquisition de l'expression comportementale en interrogeant les performances en présence et en absence de renforcement<sup>28</sup> (**Fig. 2A**). Les souris ont appris à lécher un tube pour obtenir une récompense en eau après avoir entendu un stimulus conditionné (le ton « target ») et à s'abstenir de lécher après avoir entendu un autre ton pur non récompensé (« foil ») (**Fig. 2A**). Dans le





**Figure 1 :** (A) Double injection pour observer l'activité des axons cholinergiques du CBF dans le AC, ainsi que la population corticale locale. Une injection de GCaMP axonal dans le CBF de souris ChAT-cre permet d'enregistrer les projections cholinergiques dans l'AC (en vert). Plusieurs injections de RGECO permettent d'observer l'activité des neurones locaux de l'AC. (B) De haut en bas : set-up d'imagerie, fenêtre d'un animal exemple, et superposition du canal vert (projections axonales) et rouge (neurones AC). (C) Réponse évoquée moyenne aux tons pour chaque segment axonal dans une souris exemple. L'activité évoquée est claire et robuste dans la population des projections axonales du CBF. (D) Pourcentage d'axones qui répondent significativement par ton. Les caractéristiques fonctionnelles sont 1) larges 2) homogènes entre animaux.



**Figure 2 : L'activation phasique du CBF accélère l'acquisition.** (A) Vue classique de l'apprentissage par renforcement : les animaux apprennent à discriminer entre un ton « target » (récompensé) et un autre ton « foil » (non récompensé) au fur à mesure. Le taux d'action augmente pour le ton « target » (bleu) et décroît pour le ton « foil » (orange). Contexte « probe », manipulation du renforcement (absent pour un petit nombre d'essais), révèle deux processus d'apprentissage : l'acquisition (meilleure performance dans le contexte « probe ») et l'expression plus tardive. (B) Taux d'action pour le ton « target » et « foil » pendant l'acquisition pour le groupe test (ChR,  $n = 5$ , plain lines) et le groupe témoin (EYFP,  $n = 5$ , dashed lines). Le taux de fausses alarmes décroît plus rapidement pour le groupe test, indiquant que l'activation phasique du CBF accélère l'acquisition. (C) Taux de fausses alarmes pour le jour 2 (essai 600), chaque point et un individu ( $p = 0.0238$ ).

contexte « probe », le tube a été retiré pour un petit nombre d'essais (< 40). Lors d'un bloc au début de l'apprentissage, les animaux ont répondu de la même manière aux deux tons lorsque le renforcement est présent. Lorsque le tube a été retiré pour les essais du contexte « probe » à ce stade précoce de l'apprentissage, les souris ont léché de manière fiable aux tons « target » et rarement aux tons « foil », présentant une meilleure performance. Les souris discriminent donc correctement les tons bien plus tôt dans ce contexte « probe » que dans le contexte de renforcement classique. Deux processus d'apprentissage parallèles ont ainsi été identifiés, l'un lié à l'acquisition des contingences de la tâche (révélé par le contexte « probe ») et l'autre lié à l'expression de ces connaissances (dans le contexte « renforcement »). La modification du contexte de renforcement a révélé une trajectoire d'apprentissage décrivant plus fidèlement l'acquisition des associations sensorimotrices.

### Paradigme optogénétique

Le prosencéphale basal de souris ChAT-Cre (mâles, 2-3 mois) a reçu soit une injection de channelrhodopsine (ChR) (groupe test, n = 5), soit une injection de EYFP (groupe témoin, n = 5) (Fig. 2B, panneau de gauche). Tous les animaux ont été entraînés avec le paradigme comportementale décrit précédemment. Le CBF a été stimulé ontogénétiquement pendant le contexte « renforcement », 100 ms avant chaque ton, quelle que soit l'identité du ton, jusqu'au renforcement. Il n'y a pas eu de stimulation lumineuse pendant les essais de type « probe » (20 essais consécutifs chaque jour).

## Résultats

### Les projections cholinergiques présentent une réponse auditive robuste chez la souris naïve

Afin de caractériser les propriétés auditives des projections cholinergiques dans le AC, nous avons enregistré l'activité des projections axonales du CBF et les neurones locaux de l'AC simultanément (voir Méthodes Imagerie calcique bicolore à deux photons et Fig. 1A et Fig. 1B)

chez 4 ChAT-Cre (2-3 mois). Plusieurs sites de l'AC ont été enregistrés (Fig. 1B : animal exemple) dans les couches 1 et 2. Nous avons observé que l'activité cholinergique chez les animaux naïfs présentait une réponse sensorielle robuste aux tons purs (voir Fig. 1C) et aux stimuli plus complexes (données non présentées). La réponse évoquée sensorielle cholinergique est hétérogène et sans organisation tonotopique claire, contrairement à l'activité corticale locale (données non présentées). Les tons basse fréquence sont représentés par un plus grand nombre d'axones (voir Fig. 1D) chez tous les animaux enregistrés. Ces résultats suggèrent que les projections cholinergiques présentent une réponse sensorielle évoquée robuste qui est peut-être liée à la saillance du stimulus.

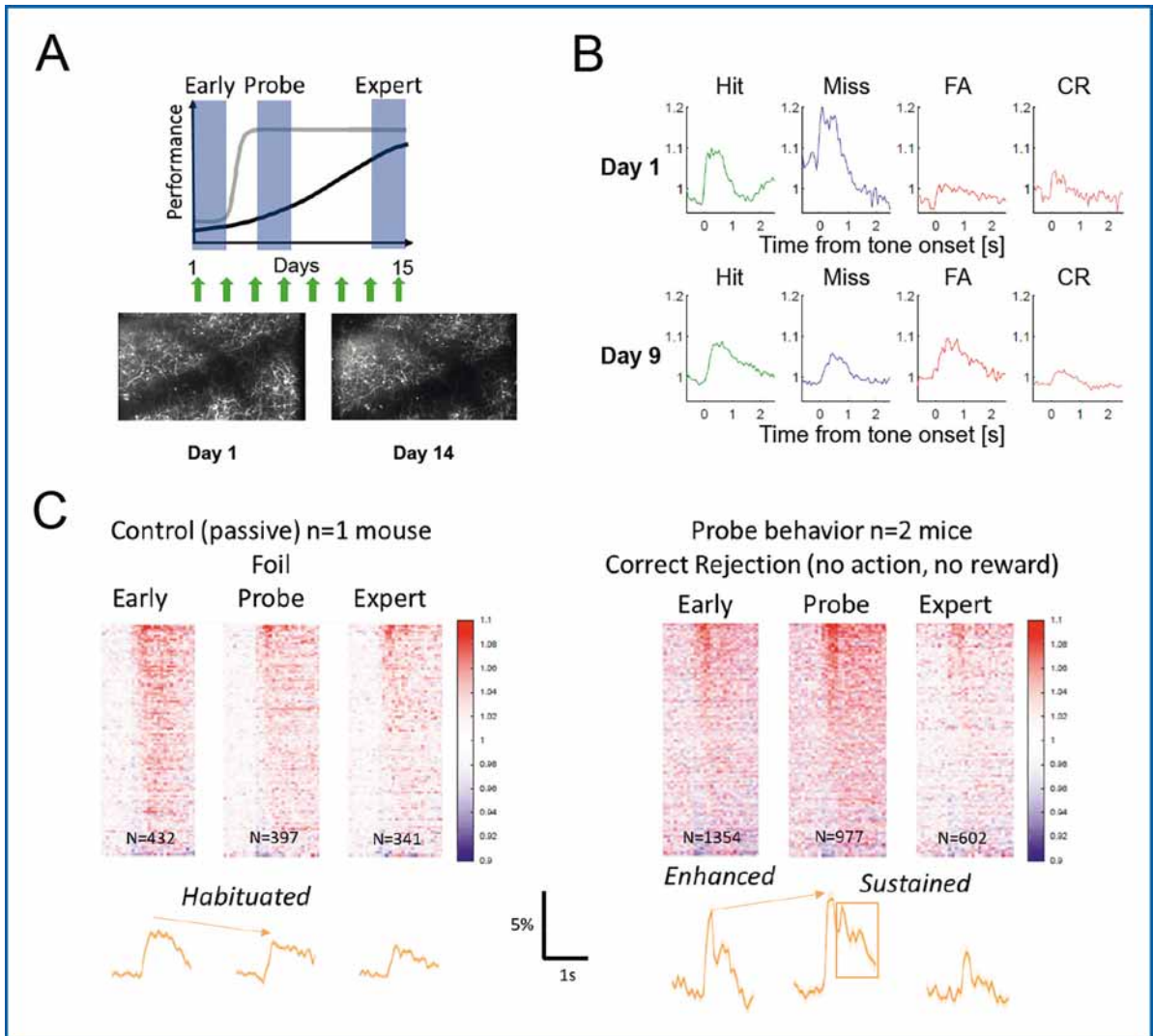
### L'activation « phasique » du CBF accélère la phase d'acquisition

Des souris ChAT-Cre ont reçu une injection de channelrhodopsine (test, n = 5) ou d'EYFP (témoin, n = 5) dans le CBF. Tous les animaux ont suivi notre protocole d'apprentissage (voir Fig. 2A et le paradigme comportemental dans les méthodes) avec une stimulation lumineuse pendant le renforcement (voir le paradigme optogénétique dans

les méthodes). Pour tester l'effet de la stimulation phasique du CBF sur le taux d'acquisition, nous avons comparé le taux d'action du groupe test et du groupe témoin

pendant le contexte « probe » au cours de l'apprentissage. Les souris du groupe test et du groupe témoin ont appris à lécher le tube au ton « target » (en bleu) et à s'abstenir de lécher le tube au ton « foil » (en orange) après 1200 essais (4 jours, 300 essais par jour). Cependant, le taux de fausses alarmes a diminué plus rapidement pour le groupe test que pour le groupe témoin (voir la Fig. 2B, encadré noir). Le taux de fausses alarmes était significativement plus faible au jour 2 pour les animaux du groupe test (voir Fig. 2C), tandis que les animaux témoins n'ont atteint cette performance qu'au jour 4. Cela suggère que l'activation phasique du CBF pendant l'apprentissage accélère l'acquisition, indiquant que le CBF joue un rôle crucial dans l'acquisition de la tâche audio-motrice.

**“Cela suggère que l'activation phasique du CBF pendant l'apprentissage accélère l'acquisition, indiquant que le CBF joue un rôle crucial dans l'acquisition de la tâche audio-motrice.”**



**Figure 3 : L'activité de la population axonale cholinergique dans l'AC évolue avec la phase d'acquisition.** (A) Schéma de la courbe d'apprentissage, avec renforcement (en noir) et dans le contexte « probe » (en gris). Imagerie longitudinale représentée par des flèches vertes. Un site de la couche I pour le jour 1 et 14 chez un animal pour montrer que l'on tente de cibler le même site de jour en jour. (B) Activité moyenne pour la population des projections cholinergiques dans l'AC pendant le renforcement pour le jour 1 et 9 et séparée par type d'essai. Les différences d'activité entre types d'essai (avec et sans action motrice) montrent que le signal cholinergique est complexe. (C) Comparaison de l'activité des projections cholinergiques pour un animal témoin (à gauche) et deux animaux en comportement (à droite) au cours de l'apprentissage (trois époques indiquées en A) pour le ton « foil ». L'activité moyenne de la population axonale évolue avec la période d'acquisition pour les animaux en comportement, tandis qu'elle diminue lentement au cours du temps pour l'animal passif.

### L'activité cholinergique évolue avec la phase d'acquisition

Afin de décrire le rôle du système cholinergique lors de l'apprentissage d'une tâche audio-motrice, nous avons enregistré l'activité des projections axonales cholinergiques (GCaMP6 axonale) du CBF (et l'activité de la population neuronale

auditive  $n = 3$ ) dans 7 souris ChAT-Cre (6 mâles, 1 femelle, 3-4 mois) longitudinalement pendant l'apprentissage de l'animal (voir **Fig. 3A**) en utilisant l'imagerie calcique à deux-photons. Nous avons également enregistré l'activité cholinergique chez des animaux passifs ( $n = 3$ ), où les deux tons étaient présentés sans aucun renforcement.

Une analyse préliminaire suggère que les axones cholinergiques encodent partiellement le stimulus sensoriel (animal exemple, **Fig. 3B**) et ce tout au long de l'apprentissage. Des réponses sensorielles évoquées étaient présentes dans l'activité de la population axonale, ainsi que des signaux liés au mouvement et à la récompense, comme l'indique la différence d'activité entre un essai correct et un essai incorrect pour le ton « target » et le ton « foil » (voir **Fig. 3B**). Nous avons limité notre analyse aux réponses évoquées purement sensorielles lors du contexte « probe » (essais incorrects pour le ton « target » et essais corrects pour le ton « foil » : pas de récompense, pas d'activité motrice) pour un sous-ensemble de notre cohorte (2 animaux comportementaux et 1 passif). L'activité moyenne évoquée par le ton pour chaque segment de la population axonale est présentée en **Figure 3C**, ainsi que la moyenne de la population pour 3 époques d'apprentissage (voir **Fig. 3A**, surlignée en bleu) : « Early », « Probe » (performance maximale pour le contexte « probe ») et « Expert ». Le ton « target » (données non présentées) et le ton « foil » (voir **Fig. 3C**) ont évoqué une augmentation de l'activité (en rouge) de la population cholinergique pour tous les animaux pendant les 3 étapes d'apprentissage présentées ici. Cependant, alors que l'activité a diminué lentement au cours de « l'apprentissage » pour l'animal témoin, la dynamique d'activité diffère pour les animaux en comportement. L'activité est plus longue pour la phase « Probe » de l'apprentissage, puis diminue de manière significative pour la phase « Expert » pour le ton « target » (données non présentées) et le ton « foil » (voir **Fig. 3C**). Dans l'ensemble, cela suggère que la présentation passive conduit à une légère habituation tandis que la dynamique de la réponse sensorielle évoquée évolue avec l'acquisition pendant le comportement.

## Discussion

Notre objectif était d'étudier le rôle des projections neuromodulatrices au cours de l'apprentissage d'une tâche audio-motrice simple. Nous avons ciblé spécifiquement le système cholinergique, car des travaux précédents ont démontré son implication dans de nombreux aspects de la tâche audio-motrice : mouvement<sup>29</sup>, récompense<sup>30</sup>, association stimulus-récompense<sup>31</sup>. Afin de tester l'hypothèse selon laquelle le sys-

tème cholinergique fournit un signal « instructeur » qui sous-tend la plasticité du cortex auditif et permet l'acquisition, nous avons mené une série d'expériences.

Nous avons d'abord décrit les réponses auditives fonctionnelles des projections axonales du CBF dans le cortex auditif. Des réponses sensorielles évoquées ont été récemment dans le CBF<sup>31</sup>, mais elles n'ont pas été caractérisées dans leurs cibles corticales. Les axones cholinergiques possèdent des réponses évoquées auditives robustes qui ne présentent pas une organisation tonotopique claire. L'origine du signal sensoriel transmis au CBF reste inconnue, et d'autres expérimentations sont nécessaires pour identifier cette source non canonique d'entrées sensorielles.

Nous avons ensuite activé phasiquement le CBF pour manipuler son impact sur la phase d'acquisition. Nous avons montré un taux d'acquisition plus rapide dans notre groupe test par rapport aux animaux témoins. Ceci suggère que le CBF est impliqué dans l'acquisition de cette tâche audio-motrice. Nous espérons que les données d'imagerie calcique collectées au cours de l'apprentissage permettront d'éclairer des mécanismes potentiels.

Enfin, nous avons enregistré l'activité de la population axonale cholinergique du CBF dans le AC longitudinalement au cours de l'apprentissage. L'analyse préliminaire suggère que la dynamique des populations évolue avec l'acquisition, ce qui n'est pas le cas pour un animal témoin. Une analyse plus approfondie permettra d'identifier les contributions des différents composants de la tâche.

Un autre aspect qui reste à explorer est l'activité tonique du CBF qui a été liée au changement de contexte. Une étude approfondie des données de l'imagerie calcique peut nous aider à affiner un futur paradigme expérimental d'inactivation visant à rapprocher la performance entre le contexte « renforcement » et le contexte « probe ».

## Remerciements

L'auteur souhaite remercier le Professeur Kishore Kuchibhotla qui dirige le laboratoire dans lequel cette recherche a été menée, ainsi que Sarah E. Elnozahy et Fangchen Zhu qui ont participé à cette recherche. L'auteur remercie aussi la Fondation Fyssen pour son soutien financier.

## Bibliographie

- 1. Hebb, D. O. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. xix, 335 (Wiley, 1949).
- 2. Nicoll, R. A. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron***93**, 281–290 (2017).
- 3. Mayford, M., Siegelbaum, S. A. & Kandel, E. R. Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb Perspect Biol***4**, a005751 (2012).
- 4. Roth, R. H. *et al.* Cortical Synaptic AMPA Receptor Plasticity during Motor Learning. *Neuron***105**, 895-908.e5 (2020).
- 5. Bi, G. & Poo, M. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons : Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.***18**, 10464–10472 (1998).
- 6. Kleim, J. A., Barbay, S. & Nudo, R. J. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. *J Neurophysiol***80**, 3321–3325 (1998).
- 7. Pascual-Leone, A. *et al.* Modulation of muscle responses evoked by transcranial magnetic stimulation during the acquisition of new fine motor skills. *J Neurophysiol***74**, 1037–1045 (1995).
- 8. Feldman, D. E. & Brecht, M. Map plasticity in somatosensory cortex. *Science***310**, 810–815 (2005).
- 9. Polley, D. B., Steinberg, E. E. & Merzenich, M. M. Perceptual Learning Directs Auditory Cortical Map Reorganization through Top-Down Influences. *J. Neurosci.***26**, 4970–4982 (2006).
- 10. Disney, A. A. & Higley, M. J. Diverse Spatio-temporal Scales of Cholinergic Signaling in the Neocortex. *J. Neurosci.***40**, 720–725 (2020).
- 11. Sarter, M. & Lustig, C. Forebrain Cholinergic Signaling: Wired and Phasic, Not Tonic, and Causing Behavior. *J. Neurosci.***40**, 712–719 (2020).
- 12. Hasselmo, M. E. & Sarter, M. Modes and Models of Forebrain Cholinergic Neuromodulation of Cognition. *Neuropsychopharmacol***36**, 52–73 (2011).
- 13. McCormick, D. A. Cholinergic and noradrenergic modulation of thalamocortical processing. *Trends Neurosci***12**, 215–221 (1989).
- 14. Conner, J. M., Culberson, A., Packowski, C., Chiba, A. A. & Tuszynski, M. H. Lesions of the Basal Forebrain Cholinergic System Impair Task Acquisition and Abolish Cortical Plasticity Associated with Motor Skill Learning. *Neuron***38**, 819–829 (2003).
- 15. Kilgard, M. P. & Merzenich, M. M. Cortical Map Reorganization Enabled by Nucleus Basalis Activity. *Science***279**, 1714–1718 (1998).
- 16. Conner, J. M., Kulczycki, M. & Tuszynski, M. H. Unique Contributions of Distinct Cholinergic Projections to Motor Cortical Plasticity and Learning. *Cerebral Cortex***20**, 2739–2748 (2010).
- 17. Ramanathan, D., Tuszynski, M. H. & Conner, J. M. The Basal Forebrain Cholinergic System Is Required Specifically for Behaviorally Mediated Cortical Map Plasticity. *Journal of Neuroscience***29**, 5992–6000 (2009).
- 18. Ma, X. & Suga, N. Long-term cortical plasticity evoked by electric stimulation and acetylcholine applied to the auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A***102**, 9335–9340 (2005).
- 19. Weinberger, N. M. The nucleus basalis and memory codes: Auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory. *Neurobiology of Learning and Memory***80**, 268–284 (2003).
- 20. Hangya, B., Ranade, S. P., Lorenc, M. & Kepecs, A. Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell***162**, 1155–1168 (2015).
- 21. Sturgill, J. F. *et al.* Basal forebrain-derived acetylcholine encodes valence-free reinforcement prediction error. 2020.02.17.953141 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.953141v1> (2020)
- 22. Harrison, T. C., Pinto, L., Brock, J. R. & Dan, Y. Calcium Imaging of Basal Forebrain Activity during Innate and Learned Behaviors. *Front Neural Circuits***10**, 36 (2016).
- 23. Nelson, A. & Mooney, R. The Basal Forebrain and Motor Cortex Provide Convergent yet Distinct Movement-Related Inputs to the Auditory Cortex. *Neuron***90**, 635–648 (2016).
- 24. Kuchibhotla, K. V. *et al.* Parallel processing by cortical inhibition enables context-dependent behavior. *Nat Neurosci***20**, 62–71 (2017).
- 25. Crouse, R. B. *et al.* Acetylcholine is released in the basolateral amygdala in response to predictors of reward and enhances the lear-

ning of cue-reward contingency. *eLife***9**, e57335 (2020).

- 26. Broussard, G. J. *et al.* In vivo measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging. *Nature Neuroscience* (2018).
- 27. Dana, H. *et al.* Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *eLife* (2016).
- 28. Kuchibhotla, K. V. *et al.* Dissociating task acquisition from expression during learning reveals latent knowledge. *Nature Communications* (2019).
- 29. Nelson, A. & Mooney, R. The Basal Forebrain and Motor Cortex Provide Convergent yet Distinct Movement-Related Inputs to the Auditory Cortex. *Neuron***90**, 635–648 (2016).
- 30. Hangya, B., Ranade, S. P., Lorenc, M. & Kepecs, A. Central Cholinergic Neurons Are Rapidly Recruited by Reinforcement Feedback. *Cell***162**, 1155–1168 (2015).
- 31. Guo, W., Robert, B. & Polley, D. B. The Cholinergic Basal Forebrain Links Auditory Stimuli with Delayed Reinforcement to Support Learning. *Neuron***103**, 1164–1177.e6 (2019).

## Introduction

**L**earning is a ubiquitous function of living systems and refers to enduring changes in behavior resulting from experience. In a dynamic environment, learning to react appropriately to a novel situation is an evolutionary advantage. ***How is a new sensorimotor pairing implemented in the brain?*** Behavioral changes are thought to be supported by modifications of brain circuits related to learned features. Foundational Hebbian models emphasize the role of synaptic plasticity in enabling learning and are supported by a vast body of experimental work<sup>1–4</sup>. At the macroscopic level, plasticity is evidenced by cortical map reorganization that is oriented towards the learned stimulus or action<sup>5–9</sup>. A new sensorimotor pairing is an inherently multiscale problem as it requires pairing distinct temporal events (sensory, motor and outcome) using functionally and anatomically separated substrates (the different cortical areas). Therefore, a neural mechanism that operates at multiple timescales and across brain regions could

promote learning-related plasticity. Neuromodulatory systems with their multiple timescales of activity<sup>10,11</sup> and broad projections<sup>12,13</sup> fulfill these criteria. More specifically, a robust body of work indicates that the cholinergic basal forebrain (CBF) plays a key role for sensory and motor cortical plasticity<sup>14–18</sup>.

Sensory event pairing with cholinergic stimulation induces cortical plasticity towards the paired stimulus in sensory cortices<sup>15,18,19</sup>. Furthermore, CBF activity appears to correlate with different aspects of the stimulus-action-outcome sequence. In rodents, CBF neurons respond precisely to reinforcement<sup>20,21</sup>, movement<sup>22,23</sup> and reward predictive sounds<sup>22,24,25</sup>. Here, we test the hypothesis that phasic, cholinergic neuromodulation provides a 'teaching signal' that drives plasticity in a sensory cortex (auditory cortex), enhances stimulus discrimination, and links these discriminative representations with reinforcement.

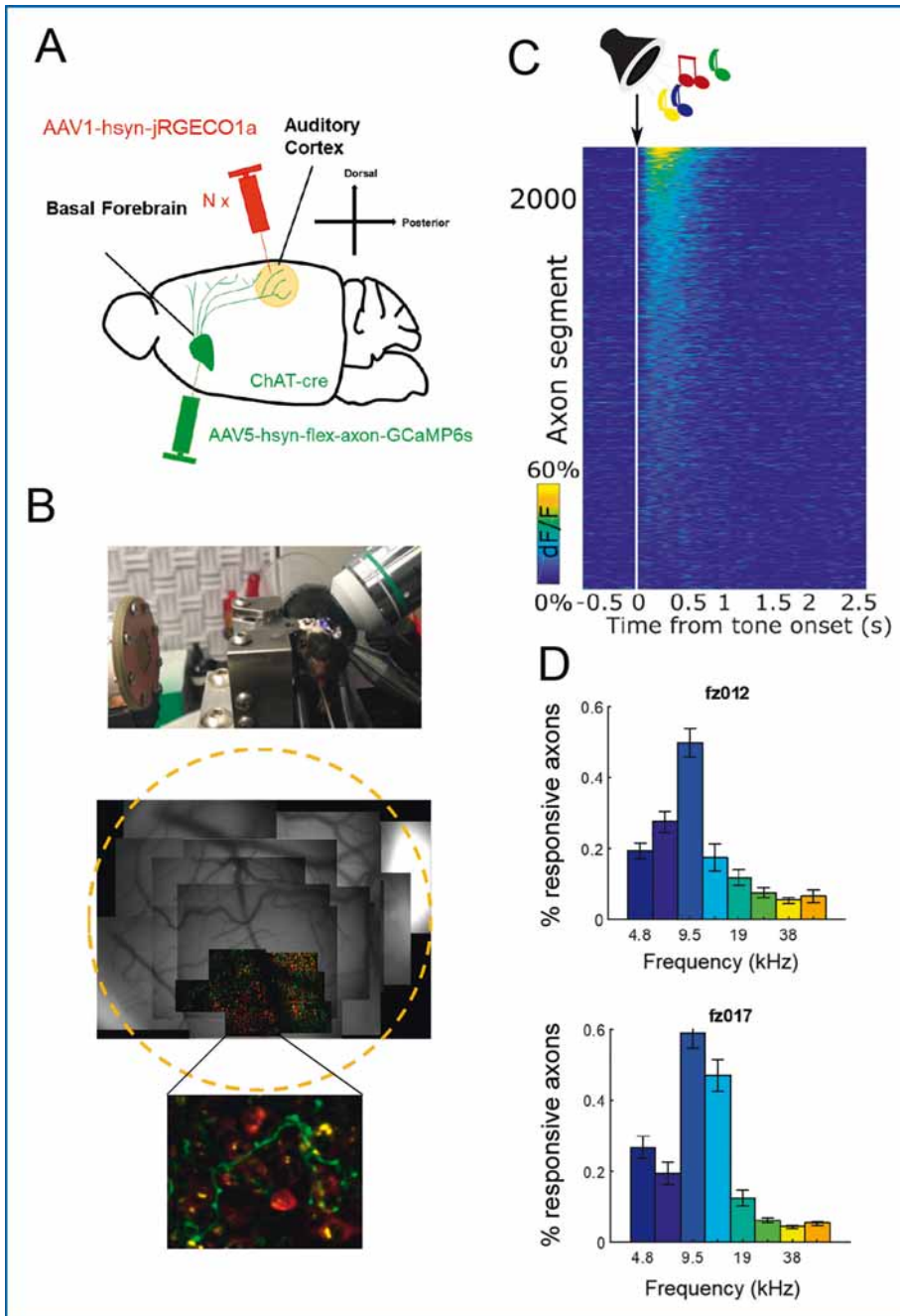
## Methods

### Dual-color two-photon imaging

To characterize the tuning properties and monitor the activity of the cholinergic axonal projection in auditory cortex (AC), we injected axonal GCaMP6s<sup>26</sup> (AAV5-hsyn-flex-axons-GCaMP6s) in the Basal Forebrain of ChAT-Cre mice (ChAT-IRES-Cre, Jackson Laboratory), enabling specific expression of GCaMP in cholinergic axonal projections. A portion of animals (6/10 of behavioral animals) additionally received multiple injections (3 to 6) of a red fluorescent protein<sup>27</sup> (RGECO1) in the AC targeting all cortical neurons locally. A glass window was implanted (diameter: 3mm) over the AC as well as a custom-designed headpost allowing headfixation. During each imaging session, an animal was head fixed in a soundproof custom-built imaging box, equipped for sound presentation and behavior. Green and red channels were simultaneously recorded for dual-color two-photon imaging during behavior or passive listening.

### Auditory stimuli

To characterize the functional auditory properties of cholinergic axons in the AC, we presented 3 types of auditory stimuli: pseudo-randomly presented pure tones (4-64 kHz, ½ oct. spacing), white noise, and up and down sweeps (4-64 kHz).



**Figure 1:** (A) Dual injection preparation for dual-color two-photon imaging to monitor BF cholinergic axon projection in the AC and local cortical activity. BF injection of axon GCaMP in ChAT-cre animals allows imaging of projection in the AC (in green). Multiple injection of RGECO in AC allows imaging of cortical neuron population (in red). (B) Top to bottom: imaging set-up, window tiling technique example mouse, and green (axonal projections) and red (AC cortical neurons) channel overlay for one site of the window. (C) Axonal population tone-evoked responses heatmap sorted from most to less responsive, example mouse. There is a clear, robust sensory-evoked activity of the cholinergic projections. (D) Percentage of significantly responsive axons per frequency for two example mice. The tuning of the axonal segment is 1) broad 2) homogenous across animals.



All stimuli were calibrated for suprathreshold presentation at 70dB (5 cm away from the ear). Two pure tones spaced by  $\frac{3}{4}$  of oct. were selected for behavior and presented at 70 dB.

### Behavioral paradigm

In a recently published paper from my host laboratory, Kuchibhotla et al. demonstrate that it is possible to dissociate acquisition from expression behaviorally by probing performance in the presence and absence of reinforcement<sup>28</sup> (**Fig. 2A**). Mice learned to lick for a water reward provided through a lick-tube after hearing a conditioned stimulus (the 'target' tone) and to withhold from licking after hearing an unrewarded ('foil') tone of a different frequency (**Fig. 2A**). In the probe context, the lick-tube was removed for a small subset of trials (< 40). Those trials were interleaved over the course of learning. At a trial block early in learning, animals responded indiscriminately to both target and foil tones in the reinforced context. Surprisingly, when the lick-tube was removed for the probe trials at this early stage of learning, mice reliably licked to targets and rarely licked to foils, exhibiting expert performance. Mice thus discriminated correctly between the tones earlier in learning than in the reinforced context. Two parallel learning processes were identified, one related to the acquisition of task contingencies (revealed in the probe context) and the other related to the expression of that knowledge (in the reinforced context). Modification of the reinforcement context revealed a learning trajectory that more faithfully described the acquisition of stimulus-action associations.

### Optogenetic paradigm

BF of ChAT-Cre mice (males, 2-3 months) was injected with either channelrhodopsin (ChR) (test cohort, n=5) or EYFP for control (n=5) (**Fig. 2B**, left panel). All animals underwent our Go/No-Go learning protocol with light stimulation to the BF during reinforcement, 100ms before each tone, regardless of the identity of the tone, up to the outcome. There was no light stimulation during probe trials (20 consecutive trials every day).

**“This suggests that phasic activation of BF during reinforcement learning speeds-up acquisition in test animals compared to control, indicating that BF plays a crucial role in acquisition of the audiomotor task.”**

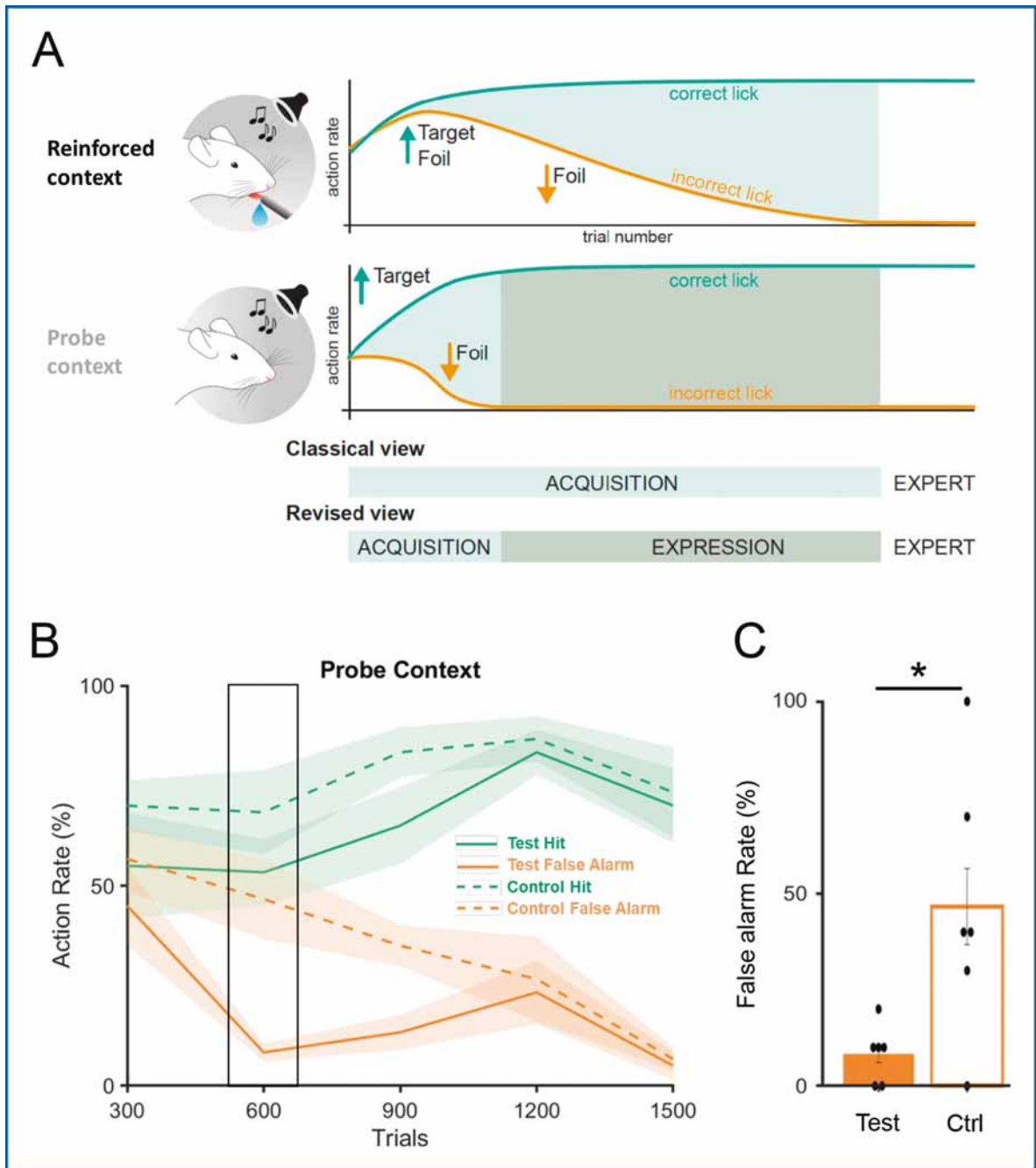
## Results

### Cholinergic axons projections exhibit significant robust sensory-evoked responses in naïve mice

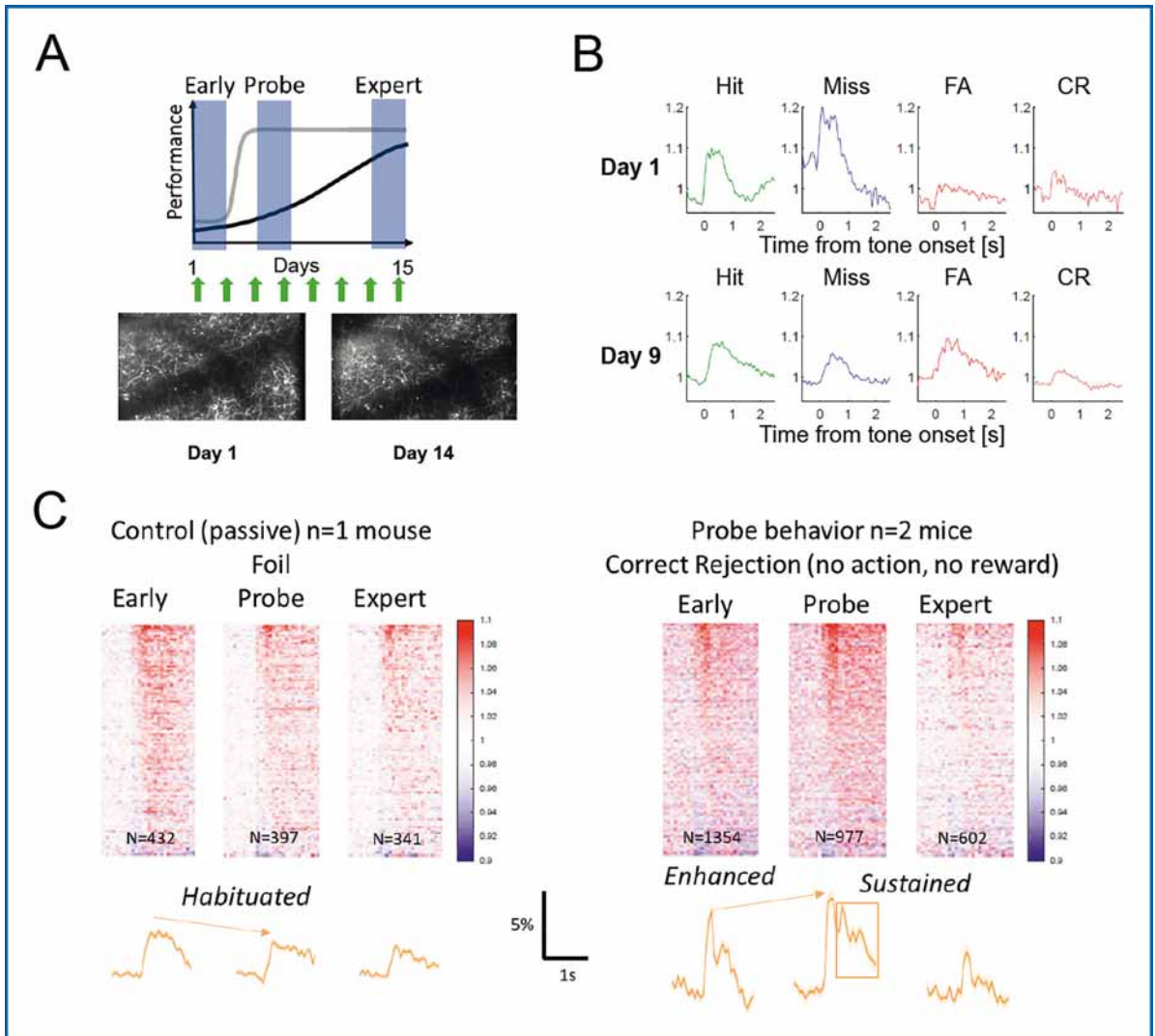
To characterize the tuning properties of the cholinergic axonal projection, we simultaneously imaged CBF axonal projections and local cortical neurons of the AC (see **Methods Dual-color two-photon imaging** and **Fig. 1A** and **Fig. 1B**) in 4 ChAT-Cre males (2-3 months). Multiple sites of the AC were imaged in a tiling fashion (**Fig. 1B**: example animal) in layer 1 and 2. We found that cholinergic activity in naïve animals presented a strong and robust sensory-evoked response to tones (see **Fig. 1C**) and more complex stimuli (data not shown). Cholinergic sensory-evoked response showed sparse heterogeneity with no clear tonotopical organization in contrast with local cortical activity (data not shown). Low-frequency tones recruited the largest number of axons (see **Fig. 1D**) in all recorded animals. Together, those results suggest that cholinergic axonal projection present robust non-habituating sensory-evoked response that may be related to stimulus saliency.

### 'Phasic' activation of BF speeds-up acquisition

ChAT-Cre mice were injected with either channelrhodopsin (test, n=5) or EYFP (control, n=5). All animals underwent our Go/No-Go learning protocol (see **Fig. 2A** and **Behavioral paradigm** in **Methods**) with light stimulation during reinforcement (see **Optogenetic paradigm** in **Methods**). To test the effect of phasic stimulation of the BF on acquisition rate we compared the action rate of the test and control cohort during probe during early learning (expected acquisition phase). Both test and control mice learned to lick to the target (in blue) and refrain from licking to the foil (in orange) over the course of 1200 trials (4 days, 300 trials per day). However, the foil action rate decreased faster for the test compared to control animals (see **Fig. 2B**, highlighted box black). Foil rate was significantly lower on day 2 for the test animals (see



**Figure 2: Phasic optogenetic manipulation of cholinergic BF speeds-up acquisition.** (A) Classical view of reinforcement learning ‘Reinforced context’: animals learn to discriminate between target tone (rewarded) and foil tone (no reward) over time. Action rate increases for target tone (blue) and decreases for foil tone (orange). ‘Probe context’, behavioral manipulation of reinforcement context reveals two-learning stages: early acquisition (improved performance in the probe context) and slower expression in the reinforced context. (B) Action rate for target and foil during acquisition (during probe) for test (ChR,  $n=5$ , plain lines) and control animals (EYFP,  $n=5$ , dashed lines). Action rate for foil tone drops faster for test animals than controls (significant day highlighted in black), indicating that phasic activation of BF speeds-up acquisition. (C) Foil action rate highlighted on the right for day 2 (trial 600), individual mouse corresponds to individual dots ( $p = 0.0238$ ).



**Figure 3: Population activity of cholinergic axons in AC show changes with acquisition.** (A) Schematic representation of learning curve, reinforcement (in black) and probe (in gray). Longitudinal imaging is represented by green arrows. The layer I site at day 1 vs, day 14 is depicted for 1 example animal, to emphasize that we aimed at targeting the same site every day during learning. (B) Average population activity for cholinergic population in AC during reinforcement, separated by trial outcome for day 1 and day 9. Differences in between outcomes (with and without lick) suggest that the cholinergic signal is multiplexed. (C) Comparison between the cholinergic activity for the axonal population between control (to the left, n=1) and behaving animals (to the right, n=2) over the course of learning (three stages highlighted in A) for foil (top, orange) (data not shown for target). Mean population axonal activity in behaving animals evolves with acquisition while the activity for the control animals only mildly habituates.

**Fig. 2C)**, while the control animals only reached this performance on day 4. This suggests that phasic activation of BF during reinforcement learning speeds-up acquisition in test animals compared to control, indicating that BF plays a crucial role in acquisition of the audiomotor task.

### Population activity of cholinergic axons in AC show changes with acquisition

To describe the role of the cholinergic system during learning of Go/No-Go discrimination system we imaged the activity of cholinergic axonal projections (axonal GCaMP6s) from BF (and the activity of the auditory neuronal population n=3)

in 7 ChAT-Cre (6 males, 1 female, 3-4 months) longitudinally while the animal underwent training on our Go/No-Go paradigm (see **Fig. 3A**). In addition, we imaged passive controls ( $n=3$ ), where target and foil were presented without any reinforcement. Preliminary analysis suggests that cholinergic axons during learning encode at least partly for both target and foil (example animal, **Fig. 3B**) and do so during the course of the experiment. Sensory-evoked responses were present in the axonal population activity, as well as motor and reward related signals, indicated by the difference in activity between hit and miss for the target and false alarm and correct rejection for the foil tone (see **Fig. 3B**). We constrained our analysis on the purely sensory-evoked responses during probe (no reinforcement, no-motor activity: miss for target tone and correct-rejection for foil tone) for a subset of our cohort (2 behaving animals and 1 passive). The average tone-evoked activity for each axon segment of the axonal population is presented in **Figure 3C**, as well as the population average for 3 learning epochs (see **Fig. 3A**, highlighted in blue) labeled: 'Early', 'Probe' (maximum probe performance), 'Expert'. Both target (data not shown) and foil (see **Fig. 3C**) evoked an increase in activity (in red) after the tone in the cholinergic population for all animals in the 3 learning stages presented here. However, while the activity slowly decreased over 'learning' for the control animal, the dynamics of the activity differed for behaving animals. The population became more sustained (longer activity) for the 'probe' stage of the learning and then decreased significantly at the expert level for both target (data not shown) and foil. Overall, this suggests that passive presentation leads to mild habituation while during behavior the dynamics of sensory-evoked response evolve with acquisition.

## Discussion

We aimed at investigating the role of long-range neuromodulatory projections during learning of a simple audiomotor task. We targeted specifically the cholinergic system, given its puta-

tive role in motor activity<sup>29</sup>, reward<sup>30</sup> signaling, stimulus-reward associations<sup>31</sup>. In order to test the hypothesis that the cholinergic system provides a 'teaching' signal that supports the auditory cortex plasticity and enables early learning we conducted a series of experiments.

We first described the tuning characteristics of the BF axonal projections in the auditory cortex. Sensory-evoked responses have been recently described in the CBF<sup>31</sup>, but have not been characterized in their target cortical locations. Cholinergic axons present robust, broadly-tuned auditory-evoked responses that do not show a clear tonotopic organization. How the sensory signal reaches the BF remains unknown, and further experimentation is necessary to identify this non-canonical source of sensory inputs.

We then phasically activated the BF to ascertain its impact on the acquisition phase. We showed a faster acquisition rate in our test compared to control animals. This suggests that the BF is implicated in task acquisition. We hope that the imaging behavior experiments while shed some light on the specific mechanisms.

Finally, we imaged the BF cholinergic axonal population in AC longitudinally over the course of learning. Preliminary analysis suggests that the population dynamics evolve with acquisition, which is not the case for a control animal. Further analysis will help disentangle the different contributions of the different task contingencies to the axonal activity.

Another aspect that remains to be explored is the tonic activity of the cholinergic BF which has been linked to context switching. Insight for the imaging data may help us refine future inactivation experimental paradigm.

## Acknowledgements

The author would like to thank Pr. Kishore Kuchibhotla in whose lab this work was conducted, as well as Sarah E. Elnozahy and Fangchen Zhu who participated in this work. The author would also like to thank the Fyssen Foundation for its financial support.

# Représentations d'objets indépendantes du contexte dans la mémoire de travail humaine

Darinka TRÜBUTSCHEK

*Postdoctoral Fellow, Department of Experimental Psychology, University of Oxford, Oxford, UK*

## Résumé

La flexibilité cognitive est une caractéristique du comportement intelligent. Selon vos objectifs, vous pouvez facilement décider de tourner à gauche ou à droite à une intersection, ou d'acheter de la bière plutôt que du vin. Des décennies de recherche ont montré que la mémoire de travail, un type particulier de mémoire à court terme, est impliquée dans une prise de décision aussi flexible. Cependant, il n'est pas encore exactement compris comment les souvenirs sont codés et stockés dans la mémoire de travail pour guider un comportement flexible. Au cours de ma bourse, j'ai analysé l'activité du cortex préfrontal directement enregistrée à partir du cerveau de patients atteints d'épilepsie réfractaire, alors qu'ils effectuaient une tâche cognitive nécessitant une utilisation flexible des mémoires de travail. À l'aide de techniques d'apprentissage automatique, j'ai pu suivre dans le temps l'activité cérébrale responsable de souvenirs spécifiques, formés dans deux différents contextes, et j'ai pu démontrer que les mêmes motifs d'activation cérébrales ont représenté le même souvenir dans les deux contextes. Cela représente un pas en avant important dans un débat actuel sur la dépendance vis-à-vis du contexte des représentations de la mémoire de travail.

## Mots-clés

Mémoire de travail, codage dépendant du contexte, électroencéphalographie intracrânienne, analyse de modèle multivariée

# Context-independent item representations in human working memory

## Abstract

Cognitive flexibility is a hallmark of intelligent behavior. Depending on your goals, you can easily decide to turn left or right at an intersection, or to buy beer instead of wine. Decades of research have shown that working memory, a special type of short-term memory, is involved in such flexible decision making. However, how exactly memories are encoded into and stored in working memory to guide flexible behavior is not yet understood. During the course of my fellowship, I analyzed prefrontal cortex activity directly recorded from the brains of patients with intractable epilepsy, as they performed a cognitive task requiring flexible usage of working memories. Using machine learning techniques, I was able to track individual memories in two different task contexts and demonstrate that similar patterns of brain activity represented the same memory in either context. This represents an important step forward in a current debate about the context-dependency of working memory representations.

## Keywords

Working memory, context-dependent coding, intracranial electroencephalography, multivariate pattern analysis

Imaginez ce scénario : vous roulez sur une route et arrivez à un carrefour en T. Que ferez-vous lorsque le feu passera au vert ? Le résultat de cette décision dépend des objectifs que vous avez en tête : si vous voulez vous rendre au bureau, vous tournerez à gauche ; si vous voulez vous détendre à Paris plage, vous tournerez à droite. Le même stimulus visuel (c.-à-d. un feu vert) déclenchera une réponse différente (c.-à-d. tourner à gauche ou à droite) en fonction de vos plans (c.-à-d. travailler ou se détendre).

Comment est-il possible pour vous de changer votre comportement avec une telle souplesse ? Un type particulier de mémoire à court terme, la mémoire de travail, sert comme base fonctionnelle à ce type de flexibilité cognitive<sup>1,2</sup>. La mémoire de travail stocke des informations sensorielles<sup>3</sup> et des contextes abstraits, telles que les règles de tâche<sup>4</sup>, et s'appuie sur une région à l'avant du cerveau, le cortex préfrontal (PFC)<sup>5</sup>, caractérisé par la sélectivité flexible de ses neurones<sup>6,7</sup>. La mémoire de travail constitue, en tant que telle, un système idéal pour fournir et utiliser les informations pertinentes nécessaires à un comportement flexible.

Ce que nous n'avons pas encore compris, c'est comment ces informations sont représentées dans la mémoire de travail pour faciliter cette flexibilité. Deux explications concurrentes ont été formulées. Traditionnellement, la mémoire de travail a été conceptualisée comme fournissant un aperçu du passé : les neurones spécifiquement adaptés à des informations récemment rencontrées stockent ces informations (en maintenant leur activation) jusqu'à ce qu'elles ne soient plus nécessaires<sup>5,8-10</sup>. Selon ce point de vue, lorsque vous naviguez dans Paris, vous gardez à l'esprit un souvenir de votre itinéraire en permanence. Surtout, quelle que soit votre destination finale, jusqu'au moment de l'intersection, ce souvenir est le résultat de la même représentation dans votre cerveau (**hypothèse 1 : codage indépendant du contexte**). Ce n'est qu'à partir de ce moment que ces représentations divergeraient (car elles présenteraient un contenu différent).

En revanche, de récents développements conceptualisent la mémoire de travail comme étant tournée vers l'avenir<sup>11,12</sup>. Motivés par des observations selon lesquelles les souvenirs peuvent être conservés dans la mémoire de tra-

vail en l'absence d'activation neuronal soutenu<sup>13-15</sup> et les neurones du PFC modifient leurs profils de réponse en fonction du contexte<sup>16,17</sup>, ces points de vue considèrent que les souvenirs stockés dans la mémoire de travail servent de condition initiale, déterminant le traitement ultérieur<sup>7,12</sup>. Tout comme la mise en place d'aiguillages ferroviaires pour s'assurer qu'un train arrive à destination, les représentations contextuelles conservées dans la mémoire de travail orientent le traitement des entrées futures vers le comportement souhaité. Pour que vous puissiez traverser Paris à vélo, cela pourrait signifier que, dès que vous avez enregistré votre destination finale dans votre mémoire, les représentations qui en découlent de votre carte mentale devraient différer avant même que les itinéraires ne commencent à diverger au carrefour en T. En d'autres termes, une même information stockée en mémoire doit être codée différemment selon l'usage qui en sera fait (**hypothèse 2 : codage dépendant du contexte**).

Il est difficile de démêler ces hypothèses car cela nécessite de suivre dans le temps des souvenirs individuels dans la mémoire de travail avec une excellente résolution temporelle dans le PFC humain. Les recherches par le passé ont été limitées par les outils d'analyse disponibles (permettant uniquement de comparer des moyennes entre conditions) et les techniques d'imagerie cérébrale, étant trop lentes dans le temps ou spatialement trop grossières. Ici, mes collaborateurs et moi avons combiné les avancées récentes du machine learning (c.-à-d. analyse de modèle multivariée) avec des enregistrements neuronaux d'une population unique de patients traités pour épilepsie, afin de suivre le contenu de la mémoire de travail dans différents contextes de tâches directement dans le cerveau humain.

## Matériels et méthodes

### Sujets

La plupart des études en neurosciences cognitives reposent sur des volontaires d'âge adultes en bonne santé. Cela facilite le recrutement de sujets et la généralisation des résultats à la population générale, mais il y a un inconvénient évident : il est impossible d'obtenir des enregistrements directs anatomiquement précis de l'activité cérébrale, car aucun outil d'imagerie cérébrale non-invasif n'existe pour accomplir cet

exploit. Pourtant, pour comprendre comment le PFC humain code le contenu de la mémoire de travail au niveau des objets individuels, cela est nécessaire.

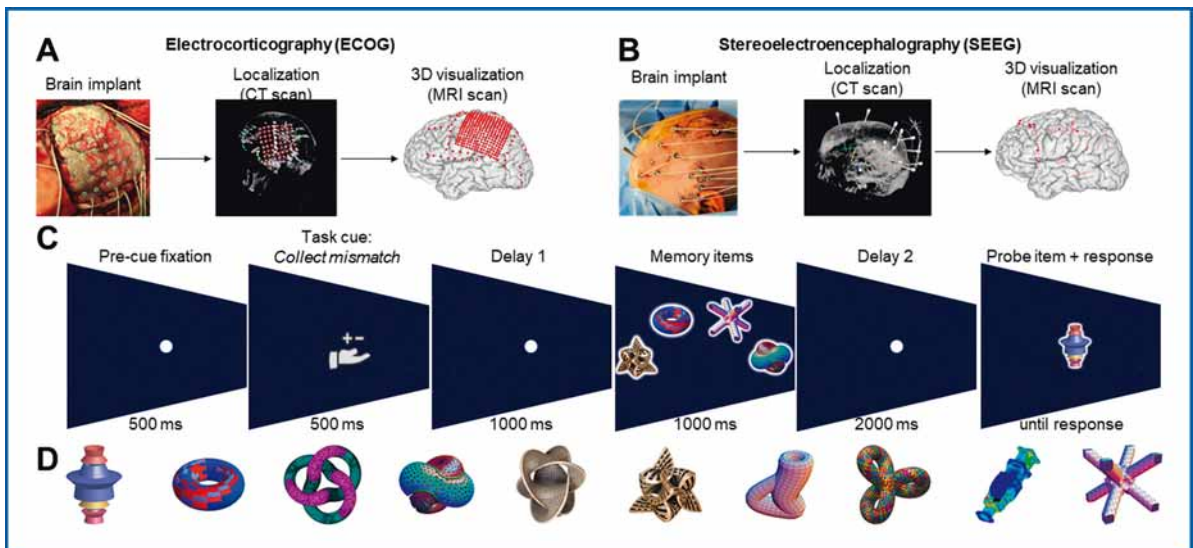
Grâce à une collaboration avec le Bethel Epilepsy Center à Bielefeld, j'ai eu accès à une population de sujets unique : les personnes souffrant d'épilepsie pharmaco-résistante. Trouble du système nerveux central provoquant une activité cérébrale anormale et des convulsions, l'épilepsie est généralement prise en charge avec des médicaments anti-épileptiques<sup>18</sup>. Cependant, > 30 % des patients atteints d'épilepsie ne répondent pas à ces médicaments<sup>19</sup> et subissent une intervention chirurgicale pour retirer la partie affectée de leur cerveau. Pour identifier l'origine anatomique de leurs crises, avant la chirurgie, les patients sont temporairement implantés avec des grilles d'électrodes pour surveiller l'activité électrique de zones individuelles du cerveau. Ces électrodes intracrâniennes enregistrent l'activité neuronale de la surface corticale (**Figure 1A**) ou de structures enfouies profondément à l'intérieur du cerveau (**Figure 1B**). Il est

important de noter que la décision d'implanter, le placement des électrodes et la durée de cette surveillance invasive dépendent exclusivement des besoins cliniques du patient et sont indépendants de tout objectif de recherche.

Pendant leur séjour à l'hôpital, les patients peuvent choisir de participer à des études de recherche. Bien que cela n'affecte pas les soins cliniques des patients, cela les aide à passer leur temps lorsqu'ils sont confinés dans un lit et permet aux chercheurs d'enregistrer des données neuronales autrement impossibles à obtenir directement à partir du cerveau humain. Au cours de cette bourse, j'ai pu obtenir des enregistrements neuronaux de 11 de ces patients. Tous ont donné leur consentement éclairé et l'étude a reçu l'approbation éthique de toutes les institutions impliquées.

### Tâche cognitive

Les données neuronales ont été enregistrées pendant que les patients exécutaient une tâche de type jeu cognitif, conçue pour engager leur mémoire de travail dans le cadre d'exigences de



**Figure 1** : Aperçu de la méthodologie. **(A)** Exemple de bandelettes et d'une grille d'électrodes intracrâniennes implantées sur la surface cérébrale corticale d'un patient atteint d'épilepsie médicalement réfractaire (à gauche), la localisation anatomique desdites électrodes à l'aide d'un scanner (au milieu), et la projection des mêmes électrodes sur un modèle 3D du cerveau du patient basé sur une imagerie par résonance magnétique (IRM). **(B)** Identique à (A), mais pour les électrodes de profondeur. **(C)** 11 patients ont effectué une tâche d'appariement à l'échantillon/non-appariement à l'échantillon de mémoire de travail. Lors de chaque essai, les participants devaient se souvenir de 1 (charge 1), 2 (charge 2) ou 4 (charge 4) objets de mémoire. Selon le repère de la tâche, ils devaient alors soit signaler des stimuli de sonde conformes (non illustrés) ou des stimuli de sonde nonconformes (comme illustré ici). **(D)** Pool des dix objets utilisés comme stimuli de mémoire et de sonde dans la présente expérience.

tâches flexibles (**Figure 1C**). Chaque essai commençait par une croix de fixation affichée pendant 500 ms, suivie de la présentation de l'un des deux repères de tâche possibles (500 ms). Deux signes plus (++) correspondaient à la demande aux patients de sélectionner un objet de sonde conforme au contenu de leur mémoire de travail (via une pression sur le bouton droit) et de rejeter simultanément tout objet non-conforme (via une pression sur le bouton gauche), tandis qu'un signe plus et un signe moins (+-) nécessitaient les actions opposées. Après une période de délai de 1 s, un (charge 1), deux (charge 2) ou quatre (charge 4) objets de mémoire ont été affichés pendant 1 s. Ces objets ont été choisis au hasard parmi un ensemble de 10 images abstraites (**Figure 1D**), et ont été présentés au hasard dans quatre emplacements possibles disposés le long d'un cercle invisible centré sur l'écran (angles : 45, 75, 105 ou 135°). Une autre période de délai de 2 s a précédé la présentation du stimulus de sonde conforme ou non-conforme aux objets en mémoire indiqués lors de cet essai. Conformément au repère de tâche initial, les patients ont ensuite poussé l'un des deux joysticks sur un contrôleur X-Box. Les patients ont été invités à répondre aussi rapidement et précisément que possible et ont complétés entre une et trois sessions expérimentales à 400 essais de mémoire de travail chacune.

### Enregistrements et analyse de données neuronales

L'objectif principal de cette étude était de déterminer si les représentations neuronales gardées en mémoire de travail étaient indépendantes (**hypothèse 1**) ou dépendantes (**hypothèse 2**) du contexte de la tâche. En tant que tel, je me suis principalement appuyé sur des outils d'apprentissage automatique sensibles pour suivre dans le temps les représentations neuronales d'objets individuels en mémoire de travail lors de l'encodage, de la maintenance et de la récupération dans les différents contextes de tâche (c.-à-d. sélection conforme vs sélection non-conforme).

#### L'acquisition des données

L'activité cérébrale directe a été enregistrée à partir de 611 électrodes ( $M \pm SD = 55,5 \pm 15,2$  par patient) implantées en intracrânien sous forme de grilles/bandes sur la surface corticale

(**Figure 1A**) ou sous la forme d'électrodes de profondeur (**Figure 1B**).

#### Prétraitement des données

J'ai suivi le pipeline de prétraitement défini par Stolk et ses collègues<sup>20</sup> pour nettoyer le signal neuronal des sources de bruit (non-)physiologiques et l'extraire uniquement des points temporels pertinents de la série chronologique échantillonnée en continu. À cette fin, j'ai d'abord filtré les données brutes pour le bruit haute fréquence et de la ligne électrique, et j'ai découpé ce signal en trois époques distinctes : (1) époques verrouillées par stimulus (0 s = début du repère ; [- 200 ms - 4,5 s /début de la sonde]) ; (2) époques verrouillées par la sonde (0 s = début de la sonde ; [- 4,5 s/début du repère - 0,5 s]) ; et (3) époques verrouillées à la réponse (0 s = pression sur le bouton du patient ; [- 4 s - 0 s]). J'ai ensuite inspecté visuellement le signal pour retirer les essais et/ou les électrodes contaminées par une activité épileptique ou un bruit électrique excessif.

#### Analyse d'apprentissage automatique

Par rapport aux techniques d'analyse univariée en électrophysiologie (dans lesquelles l'activité cérébrale moyenne d'essai de différentes conditions expérimentales est comparée séparément pour chaque électrode et point de temps), la puissance des analyses multivariées (MVPA) réside dans leur capacité à détecter des patterns spatio-temporels de l'activité cérébrale spécifiques au niveau de l'essai unique. Cette fonctionnalité est cruciale pour suivre les représentations neuronales qui évoluent dynamiquement dans le temps et/ou sont codées par des populations distribuées de neurones – comme c'est le cas ici.

À la base, la MVPA implique trois étapes : (1) estimer un modèle sur un sous-ensemble de données neuronales pour apprendre à séparer les patterns d'activité cérébrale de différentes conditions expérimentales ; (2) appliquer ce modèle entraîné à des nouvelles données laissées de côté pendant la phase d'entraînement pour prédire laquelle des conditions expérimentales apprises correspond le mieux au pattern observé d'activité cérébrale ; et (3) évaluer les performances du modèle en comparant ces prédictions à la vérité (c.-à-d. la condition expérimentale réelle de cet essai). Les performances globales de décodage peuvent être résumées par l'aire sous la courbe (AUC), exprimant la capacité du modèle à distin-



guer les différentes conditions expérimentales (gamme = 0 - 1 ; chance = 0,5).

Dans le cas de l'étude actuelle, j'ai entraîné une série de modèles multivariés pour prédire sept variables de tâche à chaque instant de l'essai à partir de l'activité cérébrale à large bande (c.-à-d. 0 à 30 Hz) d'un seul patient : (1) repère de tâche (c.-à-d. conforme vs non-conforme) ; (2) position spatiale de l'objet (c.-à-d. 45 vs 75 vs 105 vs 135°) ; (3) l'identité de l'objet (c.-à-d. image 1 vs image 2 vs ... image 10) ; (4) charge de la mémoire de travail (c.-à-d. 1 vs 2 vs 4) ; (5) l'identité de l'objet de sonde (c.-à-d. objet 1 vs objet 2 vs ... objet 10) ; (6) catégorie de sonde (c.-à-d. conforme vs non-conforme) ; et (7) la décision du patient (c.-à-d. pression sur le bouton gauche vs droit). Chacune de ces analyses a été traitée comme un problème de classification binaire un-contre-repos, de sorte que les analyses impliquant plus de deux conditions expérimentales (l'identité de l'objet, etc.) ont été menés en calculant toutes les prédictions par paire (p. ex., identité 1 vs repos, identité 2 vs repos, etc.) et en faisant la moyenne des scores AUC résultants. Le test principal pour les deux hypothèses concurrentes consistait à évaluer si un modèle entraîné pour distinguer l'identité d'un objet dans un contexte de tâche (par exemple, dans le contexte de sélection conforme) se généraliserait à l'autre contexte de tâche (par exemple, dans le contexte de sélection non-conforme). J'ai donc estimé des modèles sur les essais conformes des repères de tâche et les ai testés/évalués sur les essais non-conformes des repères de tâche (et vice versa).

### Statistiques

J'ai effectué des analyses de décodage séparément pour chaque patient, y compris tous les essais avec des réponses correctes. Les performances de décodage au-dessus du seuil du hasard ont ensuite été évaluées au niveau du groupe à chaque moment de l'essai, en s'appuyant sur des tests *t* à un échantillon et en corrigeant les comparaisons multiples avec une approche de permutation basée sur les clusters<sup>21</sup>. Des résultats statistiquement significatifs à un niveau alpha de  $p < 0,05$  sont représentés sous forme de lignes/zones colorées sous les cours du temps de décodage. Pour la généralisation inter-conditions, j'ai utilisé une analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) pour comparer les performances de décodage moyennes spécifiques à la condition

dans cinq fenêtres temporelles : la période de référence (- 0,2 - 0 s), la présentation de repère (0 - 0,5 s), la première période de délai (0,5 - 1,5 s), la présentation de l'objet (1,5 - 2,5 s) et la deuxième période de délai (2,5 - 4,5 s).

## Résultats

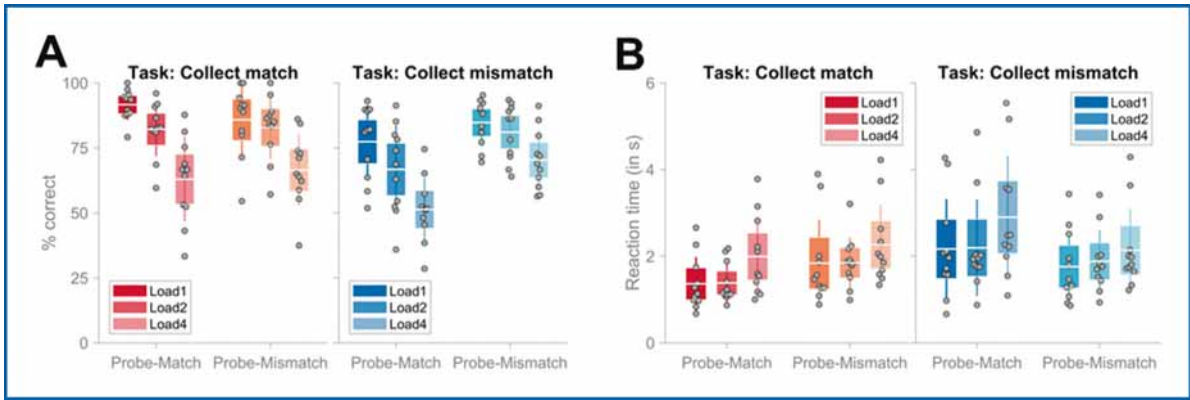
### Les patients présentent un pattern bien connu d'effets comportementaux

Le groupe de patients inclus dans cette étude souffre d'un trouble neurologique, qui peut affecter le fonctionnement du cerveau. Pour que les résultats rapportés soient applicables à la population générale, il est important d'établir si le comportement dans la tâche de mémoire de travail est comparable à celui des adultes sans épilepsie. Ce fut effectivement le cas.

En moyenne, les patients ont répondu correctement dans  $75,8 \pm 7,4$  % ( $M \pm SD$ ) des essais, tous les patients obtenant des résultats supérieurs au seuil du hasard (c.-à-d. intervalle de confiance = [64,0 - 85,1 % ; tous les  $\chi^2_s(1) > 34,9$ , tous les  $ps < 3,37 \times 10^{-9}$ ). Cela suggère que les patients ont effectué la tâche de manière adéquate et satisfaisante.

Les patients ont également présenté un comportement attendu pour ce type de tâche. D'une part, j'ai observé un effet de charge classique<sup>22,23</sup>. Moins les patients avaient d'objets à retenir, plus ils étaient précis ( $F(2,20) = 59,67$ ,  $p < 0,001$  ; **Figure 2A**), répondant correctement à  $84,8 \pm 9,1$  % des essais de charge 1, à  $78,6 \pm 8,8$  % des essais de charge 2, et à seulement  $63,3 \pm 7,2$  % des essais de charge 4. De même, lors d'essais corrects, les patients ont été plus rapides à répondre pour les charges 1 et 2 que pour la charge 4 ( $F(2,20) = 17,09$ ,  $p < 0,001$  ; **Figure 2B**), en appuyant sur les boutons de réponse, en moyenne, avec un délai de  $1,75 \pm 0,81$  s et  $1,79 \pm 0,61$  s pour les essais de charge 1 et charge 2, respectivement, et avec un délai de  $2,24 \pm 0,90$  s pour les essais de charge 4.

D'autre part, un effet de tâche fut observé<sup>24</sup>. Les patients répondaient correctement dans  $79,3 \pm 7,2$  % des essais lorsqu'ils devaient sélectionner des objets de sonde conformes, mais ont répondu correctement dans seulement  $72,5 \pm 8,8$  % des essais lorsqu'ils devaient sélectionner des objets de sonde non-conformes ( $F(1, 10) = 11,60$ ,  $p = 0,007$  ; **Figure 2A**). Cet effet de la tâche a été modulé par la catégorie de sonde



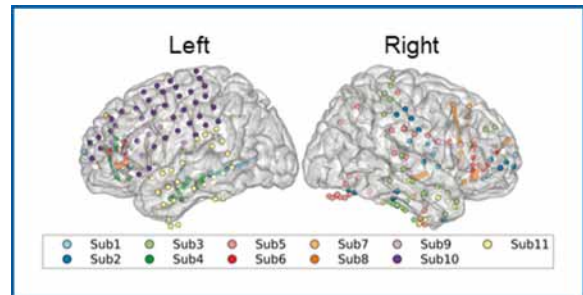
**Figure 2.** Les patients présentent des effets comportementaux standard de la charge de la mémoire de travail et de la tâche. **(A)** L'exactitude des patients en fonction de la tâche (c.-à-d., sélection conforme vs sélection non-conforme ; parcelles séparées), la catégorie de sonde (c.-à-d. sonde conforme vs sonde non-conforme ; l'axe des x) et la charge (c.-à-d., 1 vs 2 vs 4 objets en mémoire ; nuances de couleurs différentes). Les rectangles colorés indiquent l'intervalle de confiance à 95 % autour de la moyenne indiquée par une ligne blanche. Les cercles gris représentent la précision moyenne des patients individuels. Une analyse de variance à mesures répétées (ANOVA) a révélé les principaux effets de la tâche ( $p = 0,007$ ) et de la charge ( $p < 0,001$ ), ainsi qu'une interaction tâche  $\times$  sonde ( $p = 0,002$ ). **(B)** Identique à (A), mais pour le temps de réaction moyen des patients sur les essais corrects. Encore une fois, il y avait des effets principaux de la tâche ( $p = 0,005$ ) et de la charge ( $p < 0,001$ ), ainsi qu'une interaction tâche  $\times$  sonde ( $p = 0,002$ ).

(interaction tâche  $\times$  sonde :  $F(1, 10) = 17,51$ ,  $p = 0,002$ ), les patients étant les moins précis lorsqu'un repère non-conforme était suivi d'un objet de sonde conforme ( $M \pm SD = 65,7 \pm 12,6$  %). Encore une fois, les données sur le temps de réaction des patients reflétaient ce pattern de résultats (**Figure 2B**). Ils ont été plus rapides à répondre sur les essais sélectionner conforme ( $M \pm SD = 1,73 \pm 0,64$  s) que sur les essais sélectionner-non-conforme ( $M \pm SD = 2,09 \pm 0,91$  s ;  $F(1,10) = 12,53$ ,  $p = 0,005$ ), et cet effet de repère de tâche a été modulé par une interaction significative tâche  $\times$  catégorie de sonde ( $F(1, 10) = 16,49$ ,  $p = 0,002$ ). Les temps de réaction étaient les plus lents sur les essais incongrus, l'élément de sonde présenté n'appariant pas à la catégorie indiquée pour être sélectionnée. Ces résultats suggèrent que les patients ont effectué cette tâche de la même manière que ce à quoi on s'attendrait chez des témoins sains.

### Les variables liées au stimulus, à la tâche et à la décision peuvent être décodées à partir de l'activité neuronale à large bande à essai unique

J'ai analysé les enregistrements neurophysiologiques directs d'un total de 358 électrodes intracrâniennes chez 11 patients ( $M \pm SD = 32,5 \pm 10,5$  électrodes par sujet ; % exclusion :  $M \pm SD = 42,4 \pm 13,5$  % électrodes par sujet), couvrant principalement les zones cérébrales frontales

bilatérales, mais aussi les cortex pariétal et temporal (**Figure 3**).



**Figure 3.** Couverture des électrodes dans l'espace de l'Institut neurologique de Montréal (MNI). Toutes les électrodes incluses dans les analyses actuelles sont présentées en fonction de l'hémisphère (left = hémisphère gauche, right = hémisphère droit) et du patient (différentes couleurs).

Dans un premier temps, j'ai appliqué des techniques de décodage multivariées à l'activité à large bande à essai unique (c.-à-d. 0 - 30 Hz) chez chaque patient pour décomposer la séquence d'étapes de traitement permettant aux patients de transformer un stimulus visuel en une représentation de la mémoire guidant un comportement flexible.

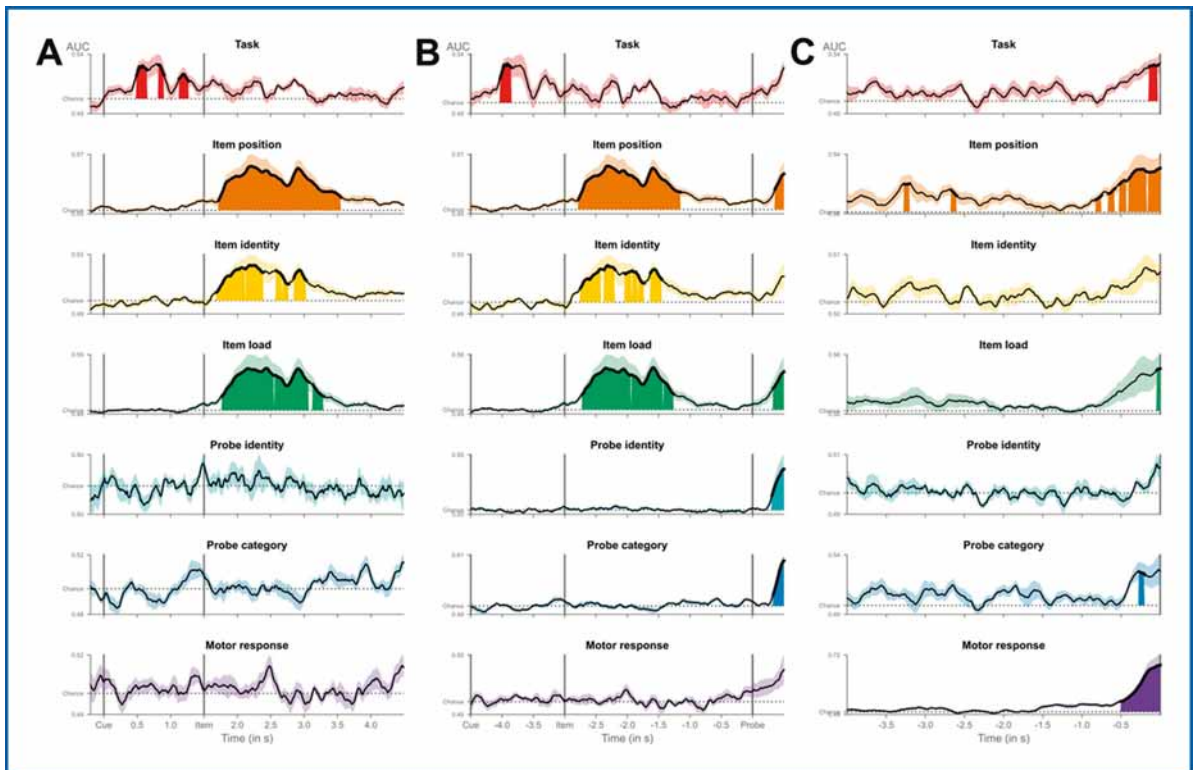
Il y avait trois principaux groupes temporels de décodage au-dessus du seuil du hasard. Peu de temps après la présentation du repère de tâche, la

règle de tâche était décodable entre 0,49 et 1,26 s, culminant à 0,87 s ( $p = 0,021$ ), puis décroissant lentement vers le seuil du hasard (**Figure 4A**).

Au moment où les éléments de mémoire ont été affichés à 1,5 s, cette représentation active de la tâche n'était plus détectable. Au lieu de cela, des représentations neuronales de trois caractéristiques liées aux objets ont émergé : la position de l'objet, l'identité de l'objet et la charge de la mémoire de travail (toutes les pics  $ps < 0,006$ ). Le décodage au-dessus du seuil du hasard pour les trois variables était très similaire, apparaissant en parallèle dans les  $\sim 250$  ms suivant le début de l'affichage de l'objet de mémoire, culminant entre  $\sim 1,8$  et 2,8 s, puis décroissant vers le seuil

du hasard pendant la deuxième période de délai à  $\sim 3,5$  s (**Figure 4A**).

De manière critique, à l'exception de l'identité de l'objet, tous les paramètres de stimulus et de tâche nécessaires à la réussite de la tâche ont été réactivés soit au moment de la présentation de la sonde (**Figure 4B**), soit au moment des décisions des patients (**Figure 4C**). À partir d'environ 250 ms après la sonde et d'environ 500 ms avant la réponse motrice du patient, la décodabilité du repère de tâche, la position de l'objet et la charge de la mémoire de travail ont rapidement atteint le pic (tous les pics  $ps < 0,029$ ). Des représentations de l'identité de la sonde, de la catégorie de la sonde et de la réponse motrice ont également



**Figure 4.** Cours de temps moyen de (A) stimulus verrouillé (c.-à-d. 0 s = apparition du repère), (B) sonde verrouillée (c.-à-d. 0 s = apparition de la sonde) et (C) réponse verrouillée (c.-à-d. 0 s = temps de réponse) décodage intra-sujet des principales variables d'intérêt dans l'activité haute bande. Les zones ombrées/lignes noires épaisses représentent les performances de décodage au-dessus du seuil du hasard, évaluées par un test de permutation unilatéral basé sur les cluster avec un niveau alpha de  $p < 0,05$ . Les lignes pointillées horizontales indiquent le seuil du hasard. Les marqueurs d'événement indiquent le début du repère de tâche (à 0 s), les objets de mémoire de travail (à 1,5 s) et le stimulus de la sonde (à 4,5 s). Notez que, à des fins d'illustration uniquement, les données ont été lissées avec une moyenne mobile de 10 échantillons (c.-à-d. 100 ms). De plus, un sous-ensemble d'essais légèrement plus petit a été inclus pour le panel (B) que dans les deux autres panels car, sur un petit nombre d'essais, les sujets ont répondu en moins de 500 ms après le début de la sonde. AUC = aire sous la courbe.

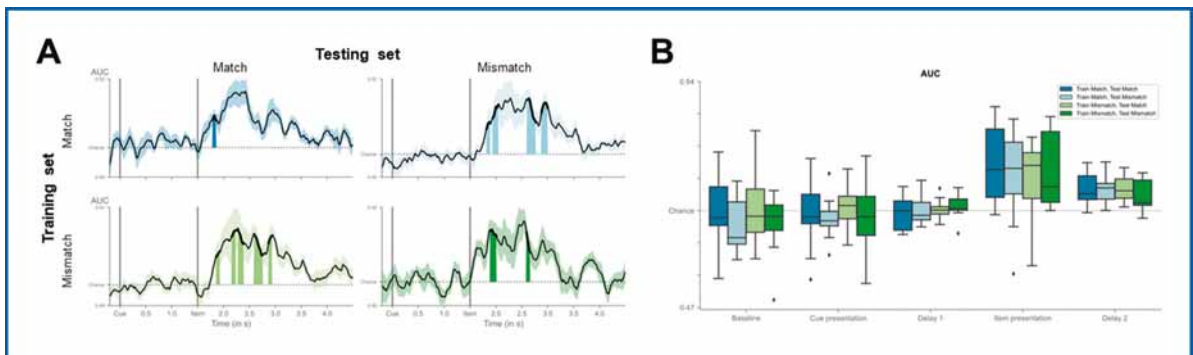
émergé après le début de la sonde et/ou de la réponse avec un pattern similaire de montée rapide vers le pic (tous les pics  $ps < 0,026$ ). Surtout, des résultats similaires ont été obtenus en incluant uniquement les électrodes du PFC. Ensemble, ces résultats démontrent que des représentations neuronales à large bande des variables pertinentes existaient au cours des trois étapes de traitement : codage de repère, codage d'objet et stockage partiel, et exécution de la réponse.

### Des modèles similaires d'activité neuronale à large bande distinguent les objets de la mémoire de travail dans les deux contextes de tâche

Après avoir montré un décodage robuste pour les objets individuels en mémoire de travail dans les deux conditions de tâche, nous sommes maintenant en mesure d'évaluer les hypothèses concurrentes. Si les objets en mémoire de travail sont codés différemment dans différents contextes de tâche (c.-à-d. le codage dépendant du contexte), alors un classificateur entraîné pour distinguer les objets individuels dans un contexte (par exemple, la sélection conforme) devrait échouer ou, à tout le moins, avoir des perfor-

mances bien pires, lorsqu'il est appliqué à l'autre contexte de tâche (par exemple, la sélection non-conforme). En revanche, si les objets en mémoire de travail sont codés indépendamment des contextes de tâche (c.-à-d. un codage indépendant du contexte), les performances de décodage devraient être similaires pour la classification intra-tâche et inter-tâches.

Comme on peut le voir sur la **Figure 5**, les résultats de cette analyse fournissent un appui solide en faveur du codage indépendant du contexte. Bien que globalement un peu plus bruyant que le modèle entraîné et testé sur toutes les conditions de repère (cf. **Figure 4A**) en raison du nombre inférieur d'essais, les quatre parcours temporels semblent remarquablement similaires à celui de la **Figure 4A** ainsi qu'entre eux (**Figure 5A**). Quel que soit le contexte de tâche sur lequel le classificateur avait été entraîné et testé, l'identité de l'objet pouvait être décodée à partir d'environ 1,79 s après le début du repère jusqu'à au plus  $\sim 2,99$  s (tous les pics  $ps < 0,016$ ). Plus important encore, il n'y avait aucun avantage pour le décodage intra-tâche par opposition au décodage des éléments inter-tâches (**Figure 5B**). Lors de la moyenne des performances de décodage sur cinq tranches de temps



**Figure 5.** Performances similaires du décodeur d'éléments intra-tâche et inter-tâches. **(A)** Cours de temps moyen de stimulus verrouillé (c.-à-d. 0 s = apparition de repère) décodage intra-sujet de l'identité de l'objet en fonction de la tâche d'entraînement (c.-à-d. en lignes) et de la tâche de test (c.-à-d. en colonnes) dans l'activité à haute bande. Les zones ombrées/lignes noires épaisses représentent les performances de décodage au-dessus du seuil du hasard telles qu'évaluées par un test de permutation unilatéral basé sur les cluster avec un niveau alpha de  $p < 0,05$ . Les lignes pointillées horizontales indiquent le seuil du hasard. Les marqueurs d'événement indiquent le début du repère de tâche (à 0 s), les objets de mémoire de travail (à 1,5 s) et le stimulus de la sonde (à 4,5 s). Notez que, à des fins d'illustration uniquement, les données ont été lissées avec une moyenne mobile de 10 échantillons (c.-à-d. 100 ms). **(B)** Mêmes données qu'en (A), mais moyennées sur 5 intervalles de temps : période de référence (- 0,2 - 0 s), présentation du repère (0 - 0,5 s), délai 1 (0,5 - 1,5 s), présentation de l'élément (1,5 s - 2,5 s) et délai 2 (2,5 - 4,5 s). Les rectangles colorés indiquent le premier (inférieur) et le troisième (supérieur) quartile des données, la médiane étant affichée sous forme de ligne noire. Les moustaches s'étendent jusqu'à 1,5 plages interquartiles, les points de données se situant en dehors de cette plage tracés séparément. AUC = aire sous la courbe.

pertinentes pour la tâche, l'identité de l'objet était décodable tout au long de la présentation de l'objet (test  $t$  à un échantillon : tous les  $ts(10) > 2,27$ , tous les  $ps < 0,023$ ) et la période de retard qui a suivi (test  $t$  à un échantillon : tous les  $ts(10) > 3,14$ , tous les  $ps < 0,005$ ) dans les quatre modèles. Cependant, les quatre modèles se sont également bien comportés dans tous les intervalles de temps (tous les  $Fs(3, 30) < 1,076$ , tous les  $ps > 0,370$ ), avec tous les facteurs de Bayes  $BF_{10} < 0,315$  (à l'exception de la première période de délai, où  $BF_{10} = 0,413$ ), indiquant un soutien substantiel en faveur de l'hypothèse nulle (c.-à-d. aucune différence dans les performances de décodage). Encore une fois, des résultats similaires sont apparus en incluant uniquement les électrodes du PFC.

Des modèles similaires d'activité neuronale à large bande distinguaient ainsi les représentations d'objets individuels dans les conditions conformes et non-conformes de repère, suggérant que les objets étaient codés et maintenus de manière indépendante du contexte.

## Discussion

Mes collaborateurs et moi avons combiné des enregistrements neuronaux principalement du PFC humain avec des techniques d'apprentissage automatique pour découvrir comment le cerveau humain encode et stocke les représentations des souvenirs pour guider un comportement flexible. En particulier, j'ai testé deux importantes hypothèses concurrentes : selon l'hypothèse indépendante du contexte, les représentations encodées et conservées dans la mémoire de travail reflètent les informations du passé, codant séparément le contexte de la tâche et les éléments de la mémoire de travail<sup>5,9,10</sup>. En revanche, selon l'hypothèse dépendante du contexte, les représentations de la mémoire de travail concernent essentiellement le futur, inté-

grant les informations passées au contexte actuel, de sorte que les mêmes souvenirs seront codés différemment selon le contexte<sup>11,12</sup>. Ici, j'ai présenté un élément de preuve important contre un compte rendu purement dépendant du contexte : alors que les représentations neuronales des objets individuels en mémoire de travail pouvaient être suivies de manière fiable dans les deux contextes de tâche, les mêmes modèles neuronaux les distinguaient dans l'un ou l'autre contexte, suggérant que les représentations d'objets ont été codés de manière indépendante du contexte.

Les résultats de cette étude sont importants pour plusieurs raisons : Premièrement, ils démontrent à quel point la combinaison de signaux

intracrâniens riches et de décodage multivarié peut être puissante. Malgré des ensembles de données assez petits, j'ai pu suivre de manière fiable les représentations neuronales de 10 objets en mémoire de travail uniques dans le temps dans le cerveau humain et dans le PFC humain. Ceci est difficile à réaliser uniquement avec

des enregistrements non-invasifs, car ceux-ci manquent soit de résolution temporelle pour capturer la dynamique du cerveau avec une précision de la milliseconde, soit de résolution spatiale et de la sensibilité pour décoder les signaux du PFC<sup>14,15,25-27</sup>. L'accès à ces enregistrements neuronaux directs et à ces techniques d'analyse sensibles ouvre donc la voie aux neuroscientifiques cognitifs pour poser (et répondre) à des questions de plus en plus sophistiquées sur le cerveau humain.

Deuxièmement, ils ajoutent un soutien solide à une littérature croissante démontrant que le déclenchement neuronal persistant n'est pas toujours nécessaire pour stocker des informations dans la mémoire de travail<sup>14,15,26,28</sup>. Alors que

**“Ici, j’ai présenté un élément de preuve important contre un compte rendu purement dépendant du contexte : alors que les représentations neuronales des objets individuels en mémoire de travail pouvaient être suivies de manière fiable dans les deux contextes de tâche, les mêmes modèles neuronaux les distinguaient dans l’un ou l’autre contexte, suggérant que les représentations d’objets ont été codés de manière indépendante du contexte.”**

les représentations d'objets individuels pouvaient être décodées pendant la présentation du stimulus et la période initiale du délai qui a suivi, le décodage au-dessus du seuil du hasard est revenu au seuil du hasard bien avant que les patients ne donnent leur réponse (**Figure 4**). À l'heure actuelle, il n'est pas clair si ce manque de décodage soutenu est un bogue ou une caractéristique : il pourrait résulter d'une sensibilité insuffisante de l'analyse, en termes de puissance statistique ou de signal cérébral étudié (par exemple, activité à large bande par rapport à l'activité oscillatoire)<sup>29</sup>. Cependant, il existe de plus en plus de soutien théorique, computationnel et empirique selon lequel, selon la tâche exacte à effectuer, les souvenirs peuvent être stockés dans des traces neurales actives ou silencieuses<sup>12,14,26,30</sup>. Par exemple, alors que le stockage d'objets dans la mémoire de travail peut ne pas nécessiter de déclenchement neuronal actif, la manipulation d'objets conservés dans la mémoire de travail le requiert<sup>15,31</sup>. Comprendre exactement comment ces différents mécanismes actifs et silencieux peuvent interagir pour soutenir le maintien de la mémoire de travail reste un défi important pour l'avenir.

Troisièmement, et surtout, ces résultats constituent l'un des premiers tests empiriques directs au niveau du cerveau du débat en cours sur la dépendance au contexte des représentations de la mémoire de travail. Les travaux antérieurs ont principalement fourni des preuves comportementales. Printzlau et ses collègues<sup>32</sup>, par exemple, ont récemment démontré que la connaissance préalable des tâches améliore les performances de la mémoire de travail, suggérant que le codage de la mémoire de travail peut dépendre de la tâche. En revanche, ici, en examinant les signaux neuronaux à large bande, je n'ai trouvé aucune preuve de reformatage dépendant des tâches des représentations de la mémoire de travail. Au lieu de cela, des modèles similaires d'activité cérébrale distinguaient les représentations d'éléments dans les deux contextes de tâche (**Figure 5**). Au niveau de l'activité cérébrale à large bande, cette étude fournit ainsi l'un des premiers éléments de preuve solides pour les représentations indépendantes des tâches dans la mémoire de travail.

Cependant, le plus grand casse-tête de la façon dont le cerveau humain prend en charge la prise

de décision flexible dans la mémoire de travail reste loin d'être résolu. Les représentations dépendantes des tâches pourraient peut-être ne pas survenir lors de l'encodage de la mémoire de travail ou de la maintenance initiale (comme examiné ici), mais pourraient toujours survenir au cours des étapes ultérieures d'une période de délai, plus proches de la sélection/du rappel de la réponse. De plus, l'activité cérébrale est un signal multidimensionnel, dont un seul aspect (c.-à-d. l'activité à large bande) a été considéré ici. Des représentations dépendantes de la tâche pourraient émerger dans l'activité oscillatoire ou pourraient même être exprimées comme des différences dans lesquelles/comment les zones cérébrales communiquent entre elles dans différents contextes de tâche. L'étude actuelle fournit l'échafaudage pour tous ces travaux futurs et a jeté les bases de notre voyage pour découvrir la base cérébrale de peut-être l'une des caractéristiques les plus distinctives du genre humain : la flexibilité cognitive.

## Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de plusieurs. Ma plus profonde gratitude va à la Fondation Fyssen – pour m'avoir permis de poursuivre mes recherches post-doctorales à l'Université d'Oxford –, et à mon conseiller Mark Stokes – pour avoir cru en moi et m'avoir guidé à travers d'une époque qui, je l'espère, restera à jamais la plus éprouvante et tumultueuse de ma carrière comme chercheuse. Un grand merci également à mes nouveaux amis et collègues de l'EP – à Dante, Eelke, Emilia, Frida, Ilenia, Michael, Michal, Nick, Paul et Sam –, à mes collaborateurs du Bethel Epilepsy Center à Bielefeld qui ont détruit l'acquisition des données, et aux patients qui ont si gracieusement offert de leur temps pour la science. Dernier point, mais non des moindres, mille milliards de mercis à mon mari, Henrik, et à mon fils nouveau-né, Ilia Sébastien – vous connaissez votre rôle.

## Bibliographie

- 1. Baddeley, A. Working memory. *Science* 255, 556–559 (1992).
- 2. Miller, E. K. & Cohen, J. D. An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 167–202 (2001).

- 3. Miller, E. K., Erickson, C. A. & Desimone, R. Neural Mechanisms of Visual Working Memory in Prefrontal Cortex of the Macaque. *J. Neurosci.* 16, 5154–5167 (1996).
- 4. Wallis, J. D., Anderson, K. C. & Miller, E. K. Single neurons in prefrontal cortex encode abstract rules. *Nature* 411, 953–956 (2001).
- 5. Fuster, J. M. & Alexander, G. E. Neuron activity related to short-term memory. *Science* 173, 652–654 (1971).
- 6. Sakamoto, K., Saito, N., Yoshida, S. & Mushiake, H. Dynamic Axis-Tuned Cells in the Monkey Lateral Prefrontal Cortex during a Path-Planning Task. *J. Neurosci.* 40, 203–219 (2020).
- 7. Stokes, M. G. *et al.* Dynamic Coding for Cognitive Control in Prefrontal Cortex. *Neuron* 78, 364–375 (2013).
- 8. Courtney, S. M., Ungerleider, L. G., Keil, K. & Haxby, J. V. Transient and sustained activity in a distributed neural system for human working memory. *Nature* 386, 608–611 (1997).
- 9. Courtney, S. M., Petit, L., Maisog, J. M., Ungerleider, L. G. & Haxby, J. V. An area specialized for spatial working memory in human frontal cortex. *Science* 279, 1347–1351 (1998).
- 10. Kamiński, J. *et al.* Persistently active neurons in human medial frontal and medial temporal lobe support working memory. *Nature Neuroscience* 20, 590–601 (2017).
- 11. Myers, N. E., Stokes, M. G. & Nobre, A. C. Prioritizing Information during Working Memory : Beyond Sustained Internal Attention. *Trends in Cognitive Sciences* 21, 449–461 (2017).
- 12. Stokes, M. G. 'Activity-silent' working memory in prefrontal cortex : a dynamic coding framework. *Trends Cogn. Sci. (Regul. Ed.)* 19, 394–405 (2015).
- 13. Lundqvist, M. *et al.* Gamma and Beta Bursts Underlie Working Memory. *Neuron* 90, 152–164 (2016).
- 14. Trübutschek, D. *et al.* A theory of working memory without consciousness or sustained activity. *eLife* 6, (2017).
- 15. Trübutschek, D., Marti, S., Ueberschär, H. & Dehaene, S. Probing the limits of activity-silent non-conscious working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 116, 14358–14367 (2019).
- 16. Duncan, J. An adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. *Nat Rev Neurosci* 2, 820–829 (2001).
- 17. Woolgar, A., Hampshire, A., Thompson, R. & Duncan, J. Adaptive Coding of Task-Relevant Information in Human Frontoparietal Cortex. *Journal of Neuroscience* 31, 14592–14599 (2011).
- 18. Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J. & Sander, J. W. Epilepsy in adults. *The Lancet* 393, 689–701 (2019).
- 19. Juvale, I. I. A. & Che Has, A. T. Possible interplay between the theories of pharmacoresistant epilepsy. *Eur J Neurosci* 53, 1998–2026 (2021).
- 20. Stolk, A. *et al.* Integrated analysis of anatomical and electrophysiological human intracranial data. *Nat Protoc* 13, 1699–1723 (2018).
- 21. Maris, E. & Oostenveld, R. Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *Journal of Neuroscience Methods* 164, 177–190 (2007).
- 22. Luck, S. J. & Vogel, E. K. The capacity of visual working memory for features and conjunctions. *Nature* 390, 279–281 (1997).
- 23. Luck, S. J. & Vogel, E. K. Visual working memory capacity: from psychophysics and neurobiology to individual differences. *Trends in Cognitive Sciences* 17, 391–400 (2013).
- 24. Elliott, R. & Dolan, R. J. Differential Neural Responses during Performance of Matching and Nonmatching to Sample Tasks at Two Delay Intervals. *J. Neurosci.* 19, 5066–5073 (1999).
- 25. Wolff, M. J., Ding, J., Myers, N. E. & Stokes, M. G. Revealing hidden states in visual working memory using electroencephalography. *Frontiers in Systems Neuroscience* 9, (2015).
- 26. Wolff, M. J., Jochim, J., Akyürek, E. G. & Stokes, M. G. Dynamic hidden states underlying working-memory-guided behavior. *Nature Neuroscience* 20, 864–871 (2017).
- 27. Wolff, M. J., Jochim, J., Akyürek, E. G., Buschman, T. J. & Stokes, M. G. Drifting codes within a stable coding scheme for working memory. *PLoS Biol* 18, e3000625 (2020).
- 28. Watanabe, K. & Funahashi, S. Neural mechanisms of dual-task interference and cogni-

tive capacity limitation in the prefrontal cortex. *Nature Neuroscience* 17, 601–611 (2014).

- 29. Barbosa, J., Soldevilla, D. L. & Compte, A. *Pinging reveals active, not silent, working memories*. <https://osf.io/qv6fu> (2021) doi:10.31234/osf.io/qv6fu.

- 30. Mongillo, G., Barak, O. & Tsodyks, M. Synaptic theory of working memory. *Science* 319, 1543–1546 (2008).

- 31. Masse, N. Y., Yang, G. R., Song, H. F., Wang, X.-J. & Freedman, D. J. Circuit mechanisms for the maintenance and manipulation of information in working memory. *Nat Neurosci* 22, 1159–1167 (2019).

- 32. Printzlaue, F., Myers, N. E., Muhle-Karbe, P. S., Manohar, S. G. & Stokes, M. G. *Prospective task knowledge improves working memory-guided behaviour*. <https://osf.io/qhku6> (2019) doi:10.31234/osf.io/qhku6.

**I**magine this scenario: You are cycling down a road and arrive at a T-junction. What will you do when the traffic light turns green? The outcome of this decision depends on the goals you hold in mind: If you want to go to the office, you will turn left; if you want to relax at Paris plage, you will turn right. The same visual stimulus (i.e., green traffic light) will trigger a different response (i.e., turn left or right) depending on your plans (i.e., work vs. relax).

How is it possible for you to change your behavior so flexibly? A special type of short-term memory, working memory, serves as the functional backbone for this type of cognitive flexibility<sup>1,2</sup>. Working memory stores sensory information<sup>3</sup> and abstract context, such as task rules<sup>4</sup>, and draws on a region at the front of the brain, the prefrontal cortex (PFC)<sup>5</sup>, characterized by the flexible tuning properties of its neurons<sup>6,7</sup>. Working memory is, as such, in an ideal position to provide and use the relevant pieces of information needed for flexible behavior.

What we have not yet understood is *how* this information is represented in working memory to facilitate flexibility. There are two competing accounts. Traditionally, working memory has been conceptualized as providing a snapshot of the past: Neurons tuned to specific properties of recently encountered information store that information (by sustaining their firing) until it is no longer needed<sup>5,8–10</sup>. According to this view, as

you navigate through Paris, you hold in mind a memory of your route the entire time. Importantly, irrespective of your final destination, up until the moment of the intersection, this memory is the result of the same representation in your brain (**hypothesis 1: context-independent coding**). Only from this point forward would these representations diverge (as they would feature different content).

By contrast, more recent prominent frameworks conceptualize working memory to be about the future<sup>11,12</sup>. Motivated by observations that memories can be held in working memory in the absence of sustained neural firing<sup>13–15</sup> and that neurons in PFC change their response profiles as a function of context<sup>16,17</sup>, these views consider working memories to serve as the initial condition that determines subsequent processing<sup>7,12</sup>. Much like setting up railroad switches to ensure that a train arrives at its intended destination, contextual representations held in working memory steer the processing of future inputs towards the desired behavior. For you cycling through Paris, this might mean that, as soon as you have stored your final destination in your memory, the ensuing representations of your mental map should differ even before the routes start to diverge at the T-junction. In other words, the same memory should be coded differently, depending on how it will be used (**hypothesis 2: context-dependent coding**).

Teasing apart these hypotheses is challenging as it requires tracking individual working memory representations with excellent temporal resolution in human PFC. Previous research has been limited by the available analysis tools (enabling only comparisons of condition averages) and brain imaging techniques, being too temporally sluggish or spatially coarse. Here, my collaborators and I combined recent advances in machine learning (i.e., multivariate pattern analysis, MVPA) with neural recordings from a unique population of patients treated for epilepsy to track the contents of working memory in different task contexts directly in the human brain.

## Materials and methods

### Participants

Most studies in cognitive neuroscience rely on healthy adult volunteers. This makes it easy to recruit subjects and generalize the results to the



general population, but there is one clear disadvantage: It is impossible to obtain anatomically precise direct recordings of brain activity, as no non-invasive brain imaging tools exist to accomplish this feat. Yet, to unravel how the human PFC codes working memory contents at the level of individual items, this is needed.

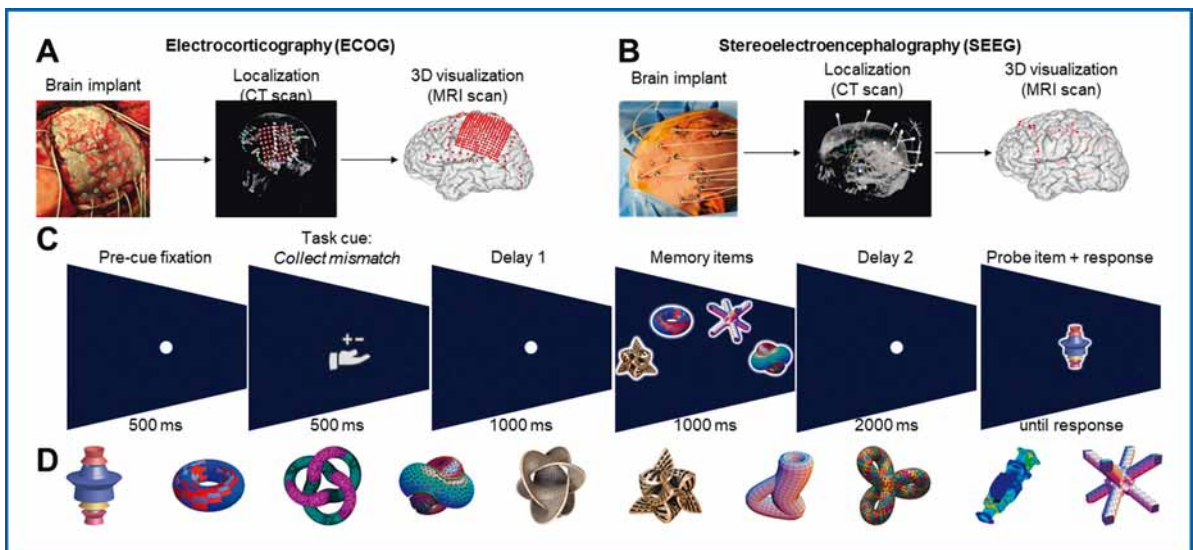
Through a collaboration with the Bethel Epilepsy Center in Bielefeld, I had access to a unique subject population: individuals with medically unmanageable epilepsy. A central nervous system disorder causing abnormal brain activity and seizures, epilepsy is typically managed with anti-seizure medication<sup>18</sup>. However, >30% of patients with epilepsy do not respond to these drugs<sup>19</sup> and undergo surgery to remove the affected part of their brain. To identify the anatomical origin of their seizures, prior to surgery, patients are temporarily implanted with electrode arrays to monitor the electrical activity of individual brain areas. These intracranial electrodes record neuronal activity from the cortical surface (**Figure 1A**) or from structures buried deep inside the brain (**Figure 1B**). Importantly, the decision to implant, electrode placement, and

duration of this invasive monitoring depend exclusively on the patient's clinical needs and is independent of any research objectives.

While patients stay in the hospital, they may also choose to take part in research studies. Although this does not affect the patients' clinical care, it helps them pass their time when confined to a bed and allows researchers to record otherwise impossible-to-obtain neural data directly from the human brain. During this fellowship, I was able to obtain neural recordings from 11 such patients. All provided informed consent, and the study had been granted ethical approval by all institutions involved.

### Cognitive task

The neural data was recorded while the patients performed a cognitive game-like task, designed to engage their working memory under flexible task demands (**Figure 1C**). Each trial began with a fixation cross displayed for 500 ms, followed by the presentation of one of two possible task cues (500 ms). Two plus-signs (++) instructed patients to collect a probe item matching the contents of their working memory (via



**Figure 1. Overview of methodology.** (A) Example of strips and a grid of intracranial electrodes implanted on the cortical brain surface of a patient with medically intractable epilepsy (left), the anatomical localization of said electrodes with the help of a computed tomography (CT) scan (middle), and the projection of the same electrodes onto a 3D model of the patient's brain based on a magnetic resonance imaging (MRI) scan. (B) Same as for (A), but for depth electrodes. (C) 11 patients performed a cued match-to-sample/non-match-to-sample working memory task. On each trial, participants had to remember either 1 (load 1), 2 (load 2), or 4 (load 4) memory items. Depending on the task cue, they then either had to signal matching probe stimuli (not shown) or mismatching probe stimuli (as shown here). (D) Pool of the ten items used as memory and probe stimuli in the present experiment.

a right-hand button press) and simultaneously reject any non-matching items (via a left-hand button press), while a plus and a minus-sign (+) required the opposite actions. After a 1s-long delay period, one (load 1), two (load 2), or four (load 4) memory items were displayed for 1 s. These items were chosen randomly from a set of 10 abstract images (**Figure 1D**), and were presented randomly in four possible locations arranged along an invisible circle centered on the screen (angles: 45, 75, 105, or 135°). Another 2s-long delay period preceded the presentation of the probe stimulus that either matched or did not match the memory item(s) shown on that trial. In accordance with the initial task cue, patients then pushed one of two joysticks on an X-Box controller. Patients were asked to respond as fast and accurately as possible and completed between one and three experimental sessions à 400 working memory trials each.

### Neural data recordings and analysis

The primary objective of this study was to determine whether neural representations held in working memory were independent (hypothesis 1) or dependent (hypothesis 2) on task context. As such, I primarily relied on sensitive machine learning tools to track neural representations of individual working memory items during encoding, maintenance, and retrieval in the different task contexts (i.e., collect match vs. collect mismatch).

#### Data acquisition

Direct brain activity was recorded from 611 electrodes ( $M \pm SD = 55.5 \pm 15.2$  per patient) implanted intracranially in the form of grids/strips on the cortical surface (**Figure 1A**) or in the form of depth electrodes (**Figure 1B**).

#### Data preprocessing

I followed the preprocessing pipeline laid out by Stolk and colleagues<sup>20</sup> to clean the neural signal from (non-)physiological sources of noise, and extract it only from the relevant time points of the continuously sampled time series. To this end, I first filtered the raw data for high-frequency and power-line noise, and cut this signal into three distinct epochs: (1) stimulus-locked epochs (0 s = cue onset; [-200 ms - 4.5 s/probe onset]); (2) probe-locked epochs (0 s = probe onset; [-4.5 s/cue onset - 0.5 s]); and (3) response-locked epochs (0 s = patients' button Press; [-4 s - 0 s]). I then

visually inspected the signal to remove trials and/or electrodes contaminated with epileptic activity or excessive electrical noise.

#### Machine learning analysis

Compared to univariate analysis techniques in electrophysiology (in which trial-average brain activity of different experimental conditions is compared separately for each electrode and time point), the power of multivariate analyses lies in their ability to detect condition-specific spatio-temporal patterns of brain activity at the single-trial level. This feature is crucial to track neural representations that evolve dynamically over time and/or are coded by distributed populations of neurons – as is the case here.

At its core, MVPA involves three steps: (1) training a model on a subset of neural data to learn how to separate patterns of brain activity from different experimental conditions; (2) applying this trained model to left-out, single-trial data to predict which of the learned experimental conditions best fits the observed pattern of brain activity on that trial; and (3) evaluating model performance by comparing these predictions to the ground truth (i.e., the actual experimental condition on that trial). Overall decoding performance can be summarized with the area under the curve (AUC), expressing the ability of the model to distinguish the different experimental conditions (range = 0 – 1; chance = 0.5).

In the case of the current study, I trained a series of multivariate models to predict seven task variables at each time point in the trial from single-patient, single-trial broadband (i.e., 0 – 30 Hz) brain activity: (1) task cue (i.e., match vs. mismatch); (2) item position (i.e., 45 vs. 75 vs. 105 vs. 135°); (3) item identity (i.e., item 1 vs. item 2 vs. ... item 10); (4) working memory load (i.e., 1 vs. 2 vs. 4); (5) probe item identity (i.e., item 1 vs. item 2 vs. ... item 10); (5) probe category (i.e., match vs. mismatch); and (7) the patient's decision (i.e., left vs. right button press). Each of these analyses was treated as a binary one-vs-rest classification problem, such that analyses involving more than two experimental conditions (e.g., item identity) were conducted by computing all pairwise predictions (e.g., item 1 vs. rest, item 2 vs. rest, etc.) and averaging the resulting pairwise AUC scores. The main test for the two competing hypotheses consisted in assessing whether a model trained to distinguish item iden-

tivity in one task context (e.g., task cue match) would generalize to the other task context (e.g., task cue mismatch). I therefore trained models on the task cue match trials and tested/evaluated them on the task cue mismatch trials (and vice versa).

### Statistics

I ran decoding analyses separately for each patient, including all trials with correct responses. Above-chance decoding performance was then assessed at the group-level at each time point of the trial, relying on one-sample *t*-tests against chance and correcting for multiple-comparisons with a cluster-based permutation approach<sup>21</sup>. Statistically significant results at an alpha-level of  $p < .05$  are shown as colored lines/areas under the decoding time courses. For the across-condition generalization, I employed a one-way analysis of variance (ANOVA) to compare condition-specific average decoding performance in five time windows: the baseline period (-0.2 – 0 s), cue presentation (0 – 0.5 s), the first delay period (0.5 – 1.5 s), item presentation (1.5 – 2.5 s), and the second delay period (2.5 – 4.5 s).

## Results

### Patients exhibit well-known pattern of behavioral effects

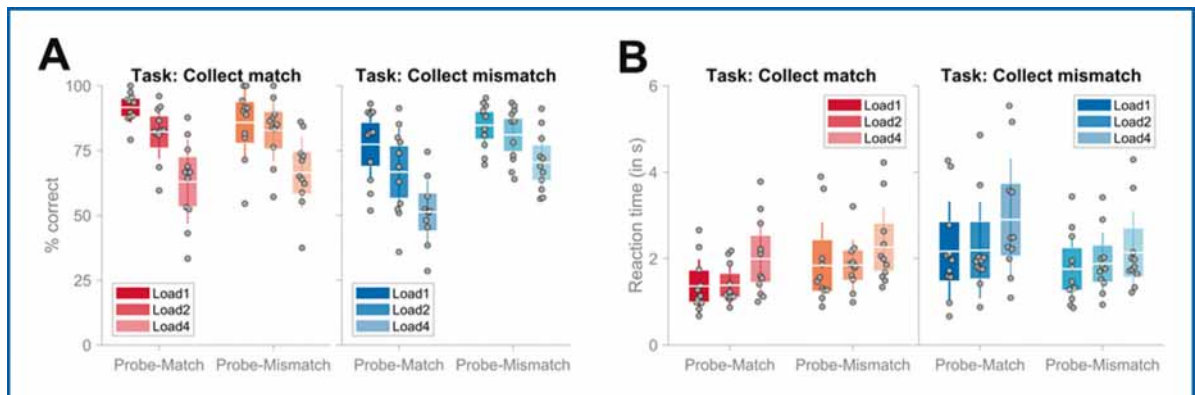
The group of patients included in this study suffer from a neurological disorder, which may

affect brain functioning. For any reported results to be applicable to the general population, it is important to establish whether behavior in the working memory task is comparable to that of adults without epilepsy. This was indeed the case.

On average, patients responded correctly on  $75.8 \pm 7.4\%$  ( $M \pm SD$ ) of trials, with all patients performing better than chance (i.e., range = [64.0 – 85.1%; all  $\chi^2s(1) > 34.9$ , all  $ps < 3.37 \times 10^{-9}$ ). This suggests that patients performed the task adequately and satisfactorily.

Patients also exhibited behavior expected for this type of task. On one hand, I observed a classic load effect<sup>22,23</sup>. The fewer items patients had to remember, the more accurate they were in doing so ( $F(2,20) = 59.67$ ,  $p < .001$ ; **Figure 2A**), responding correctly on  $84.8 \pm 9.1\%$  of load-1 trials, on  $78.6 \pm 8.8\%$  of load-2 trials, and on only  $63.3 \pm 7.2\%$  of load-4 trials. Similarly, on correct trials, patients were faster to respond for load 1 and 2 than for load 4 ( $F(2, 20) = 17.09$ ,  $p < .001$ ; **Figure 2B**), pressing the response buttons, on average, within  $1.75 \pm 0.81$  s and  $1.79 \pm 0.61$  s for load-1 and load-2 trials, respectively, and within  $2.24 \pm 0.90$  s for load-4 trials.

On the other hand, there was an effect of task<sup>24</sup>. Patients were correct on  $79.3 \pm 7.2\%$  of trials when they had to select matching probe items, but responded correctly on only  $72.5 \pm 8.8\%$  of trials when they had to select mismatch-

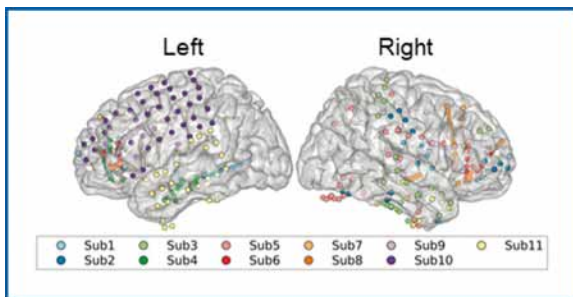


**Figure 2. Patients exhibit standard behavioral effects of working memory load and task. (A)** Patients' accuracy as a function of task (i.e., collect match vs. collect mismatch; separate plots), probe category (i.e., match vs. mismatch; x-axis), and load (i.e., 1 vs. 2 vs. 4 memory items; different color shades). Colored rectangles denote the 95% confidence interval around the mean shown as a white line. Gray circles represent mean accuracy of individual patients. A repeated-measures analysis of variance (ANOVA) revealed main effects of task ( $p = .007$ ) and load ( $p < .001$ ), as well as a task  $\times$  probe interaction ( $p = .002$ ). **(B)** Same as in (A), but for patients' mean reaction time on correct trials. Again, there were main effects of task ( $p = .005$ ) and load ( $p < .001$ ), as well as a task  $\times$  probe interaction ( $p = .002$ ).

ching probe items ( $F(1,10) = 11.60, p = .007$ ; **Figure 2A**). This effect of task was modulated by probe category (task x probe interaction:  $F(1, 10) = 17.51, p = .002$ ), with patients being least accurate when a mismatch cue was followed by a matching probe item. ( $M \pm SD = 65.7 \pm 12.6\%$ ). Again, patients' reaction-time data mirrored this pattern of results (**Figure 2B**). They were faster to respond on collect-match ( $M \pm SD = 1.73 \pm 0.64$  s) than on collect-mismatch trials ( $M \pm SD = 2.09 \pm 0.91$  s;  $F(1,10) = 12.53, p = .005$ ), and this effect of task cue was modulated by a significant task x probe category interaction ( $F(1,10) = 16.49, p = .002$ ). Reaction times were slowest on incongruent trials, with the probe item presented not matching the category cued to be selected. These findings suggest that, patients performed this task similarly as would have been expected in healthy controls.

### Stimulus-, task-, and decision-related variables can be decoded from single-trial neural broadband activity

I analyzed direct neurophysiological recordings from a total of 358 intracranial electrodes in 11 patients ( $M + SD = 32.5 \pm 10.5$  electrodes per subject; % exclusion:  $M + SD = 42.4\% \pm 13.5\%$  electrodes per subject), primarily covering bilateral frontal brain areas, but also including parietal, and temporal cortices (**Figure 3**).



**Figure 3. Electrode coverage in Montreal Neurological Institute (MNI) space.** All electrodes included in the current analyses are shown as a function of hemisphere (left = left hemisphere, right = right hemisphere) and patient (different colors).

In a first instance, I applied multivariate decoding techniques to single-trial broadband (i.e., 0–30 Hz) activity in each patient to decompose the sequence of processing stages allowing patients to transform a visual stimulus into a memory representation guiding flexible behavior.

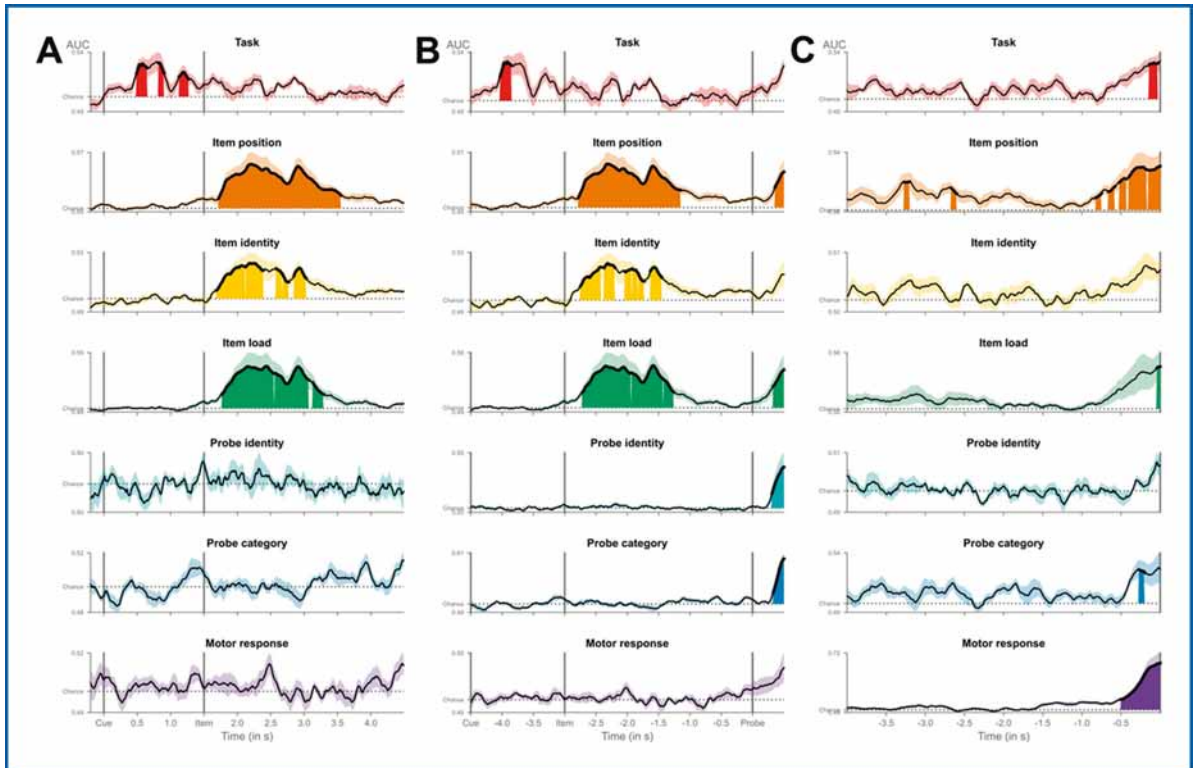
There were three main temporal clusters of above-chance decoding. Soon after the presentation of the task cue, task rule was decodable between 0.49 and 1.26 s, peaking at 0.87 s ( $p = .021$ ) and then slowly decaying towards chance (**Figure 4A**).

By the time the memory items were shown at 1.5 s, this active representation of task was no longer detectable. Instead, neural representations of three item-related features emerged: item position, item identity, and working memory load (all peak  $ps < .006$ ). Above-chance decoding for all three variables was highly similar, emerging in parallel within  $\sim 250$  ms of the onset of the memory item display, peaking between  $\sim 1.8$  and 2.8 s, and then decaying towards chance-level during the second delay period at  $\sim 3.5$  s (**Figure 4A**).

Critically, with the exception of item identity, all stimulus- and task parameters necessary for the successful completion of the task were re-activated either at the time of probe presentation (**Figure 4B**) or at the time of the patients' decisions (**Figure 4C**). Starting  $\sim 250$  ms post probe and  $\sim 500$  ms prior to the patient's motor response, decodability of task cue, item position, and working memory load quickly ramped up to peak (all peak  $ps < .029$ ). Representations of probe identity, probe category and motor response also emerged after probe- and/or response onset with a similar quick ramp-to-peak pattern (all peak  $ps < .026$ ). Crucially, similar results were obtained when only including PFC electrodes. Together, these results demonstrate that broadband neural representations of relevant variables existed during three processing stages: cue encoding, item encoding and partial storage, and response execution.

### Similar patterns of neural broadband activity distinguish working memory items in the two task contexts

Having shown robust decoding for individual working memory items across the two task conditions, we are now in a position to evaluate the competing hypotheses. If working memory items are coded differently in different task contexts (i.e., context-dependent coding), then a classifier trained to distinguish individual items in one context (e.g., cue-match) should fail or, at the very least, perform significantly worse, when applied

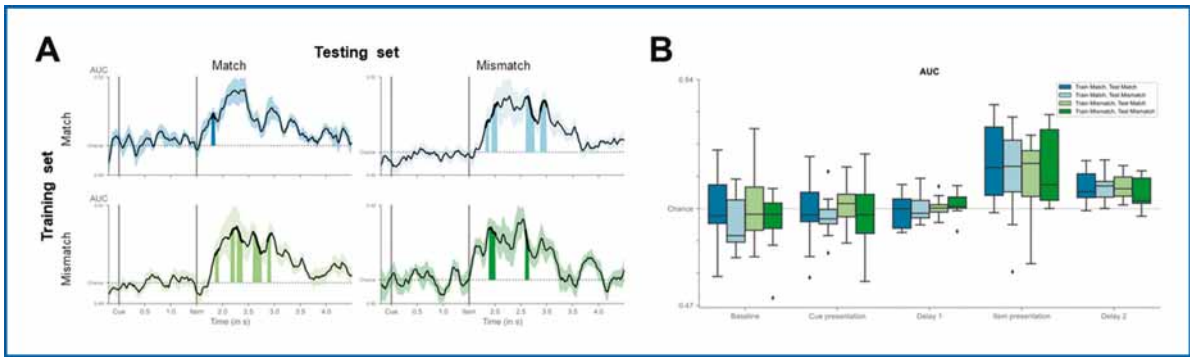


**Figure 4.** Average time courses of (A) stimulus-locked (i.e., 0 s = cue onset), (B) probe-locked (i.e., 0 s = probe onset), and (C) response-locked (i.e., 0 s = RT) within-subject decoding of main variables of interest in broadband activity. Shaded areas/thick black lines represent above-chance decoding performance as assessed by a one-tailed cluster-based permutation test with an alpha-level of  $p < .05$ . Horizontal dotted lines index chance level. Event markers denote the onset of the task cue (at 0 s), working memory items (at 1.5 s) and probe stimulus (at 4.5 s). Note that, for illustration purposes only, the data were smoothed with a moving average of 10 samples (i.e., 100 ms). Moreover, a slightly smaller subset of trials was included for panel (B) than in the other two panels as, on a small number of trials, subjects responded within less than 500 ms after probe onset. AUC = area under the curve.

to the other task context (e.g., cue-mismatch). By contrast, if working memory items are coded independently of task contexts (i.e., context-independent coding), then decoding performance should be similar for within-task and across-task classification.

As can be seen in **Figure 5**, the results of this analysis provide strong support in favor of context-independent coding. While overall a bit noisier than the model trained and tested on all cue conditions (cf. **Figure 4A**) due to the lower number of trials, all four time courses look remarkably similar to the one in **Figure 4A** as well as to each other (**Figure 5A**). Irrespective of which task context the classifier had been trained and tested on, item identity could be decoded from  $\sim 1.79$  s past cue onset until at most  $\sim 2.99$  s (all peak  $ps < .016$ ). Most importantly, there was no

benefit for within-task as opposed to across-task item decoding (**Figure 5B**). When averaging decoding performance across five task-relevant time bins, item identity was decodable throughout the entire item presentation (one-sample  $t$ -test again chance: all  $ts(10) > 2.27$ , all  $ps < .023$ ) and ensuing delay period (one-sample  $t$ -test again chance: all  $ts(10) > 3.14$ , all  $ps < .005$ ) in all four models. However, all four models also performed equally well in all time bins (all  $Fs(3, 30) < 1.076$ , all  $ps > .370$ ), with all Bayes' Factors  $BF_{10} < 0.315$  (with the exception of the first delay period, where  $BF_{10} = 0.413$ ), indicating substantial support in favor of the null hypothesis (i.e., no differences in decoding performance). Again, similar results emerged when only including PFC electrodes. Similar patterns of neural broadband activity thus distinguished individual



**Figure 5. Similar performance of within-task and across-task item decoder. (A)** Average time courses of stimulus-locked (i.e., 0 s = cue onset) within-subject decoding of item identity as a function of training task (i.e., rows) and testing task (i.e., columns) in broadband activity. Shaded areas/thick black lines represent above-chance decoding performance as assessed by a one-tailed cluster-based permutation test with an alpha-level of  $p < .05$ . Horizontal dotted lines index chance level. Event markers denote the onset of the task cue (at 0 s), working memory items (at 1.5 s) and probe stimulus (at 4.5 s). Note that, for illustration purposes only, the data were smoothed with a moving average of 10 samples (i.e., 100 ms). **(B)** Same data as in (A), but averaged over 5 time bins: baseline period (-0.2 - 0 s), cue presentation (0 - 0.5 s), delay 1 (0.5 - 1.5 s), item presentation (1.5 - 2.5 s), and delay 2 (2.5 - 4.5 s). Colored rectangles denote the first (bottom) and third (top) quartile of the data, with the median displayed as a black line. The whiskers extend to 1.5 interquartile ranges, with data points falling outside this range plotted separately. AUC = area under the curve.

item representations in the cue-match and cue-mismatch condition, suggesting that items were encoded and maintained in a context-independent fashion.

## Discussion

My collaborators and I combined neural recordings primarily from the human PFC with machine learning techniques to unravel how the human brain encodes and stores memory representations to guide flexible behavior. In particular, I tested two prominent, competing accounts: According to the context-independent hypothesis, representations encoded into

and held in working memory reflect information from the past, coding task context and working memory items separately<sup>5,9,10</sup>. By contrast, according to the context-dependent hypothesis, working memory representations are essentially about the future, integrating past information with current context, such that the same items will be

coded differently depending on context<sup>11,12</sup>. Here, I presented an important piece of evidence against a purely context-dependent account: While the neural representations of individual working memory items could be tracked reliably in both task contexts, the same neural patterns distinguished between them in either context, suggesting that item representations were coded in a context-independent fashion.

The results of this study are important for several reasons: First, they demonstrate just how powerful the combination of rich intracranial signals and multivariate decoding can be. Despite fairly small datasets, I was able to

reliably track the neural representations of 10 unique working memory items across time in the human brain and in human PFC. This is difficult to achieve solely with non-invasive recordings, as these lack either the temporal resolution to capture brain dynamics with millisecond precision or the spatial resolution and sensitivity

to decode signals from PFC<sup>14,15,25-27</sup>. Having access to such direct neural recordings and sensitive analysis techniques therefore paves the way for cognitive neuroscientists to ask (and answer) increasingly more sophisticated questions about the human brain.

Second, they add strong support to a growing literature demonstrating that persistent neural firing may not always be necessary to store information in working memory<sup>14,15,26,28</sup>. While representations of individual items could be decoded during the stimulus presentation and initial period of the ensuing delay, above-chance decoding returned to baseline long before patients gave their response (**Figure 4**). At the moment, it is unclear whether this lack of sustained decoding is a bug or a feature: It could result from insufficient sensitivity of the analysis, in terms of statistical power or brain signal investigated (e.g., broadband activity vs. oscillatory activity)<sup>29</sup>. However, there is increasing theoretical, computational, and empirical support that, depending on the exact task to be performed, memories may either be stored in active or silent neural traces<sup>12,14,26,30</sup>. For instance, while storing items in working memory may not require active neural firing, manipulating items held in working memory does<sup>15,31</sup>. Teasing apart exactly how these different active and silent mechanisms may interact to support working memory maintenance remains an important challenge for the future.

Third, and most importantly, these results constitute one of the first direct empirical tests at the brain level of the ongoing debate about the context dependency of working memory representations. Previous work has primarily provided behavioral evidence. Printzlau and colleagues<sup>32</sup>, for instance, recently demonstrated that task foreknowledge improves working memory performance, suggesting that working memory coding may be task-dependent. By contrast, here, examining neural broadband signals, I found no evidence for task-dependent reformatting of working memory representations. Instead, similar patterns of brain activity distinguished item

representations in both task contexts (**Figure 5**). At the level of broadband brain activity, this study thus provides one of the first strong pieces of evidence for task-independent representations in working memory.

However, the larger puzzle of how the human brain supports flexible decision-making in working memory remains far from being solved. Task-dependent representations might perhaps not arise during working memory encoding or initial maintenance (as examined here), but could still arise during later stages of a delay period, closer to response selection/recall. Moreover, brain activity is a multidimensional signal, of which only one aspect (i.e., broadband activity) was considered here. Task-dependent representations might emerge in oscillatory activity or could even be expressed as differences in which/how brain areas communicate with each other in different task contexts. The current study provides the scaffolding for all of this future work and has laid a foundation in our journey to uncover the brain basis of perhaps one of the most distinguishing characteristics of human kind: cognitive flexibility.

### Acknowledgments

This work would not have been possible without the help and support of many. My deepest gratitude goes to the *Fondation Fyssen* – for having enabled me to pursue my post-doctoral research at the University of Oxford –, and to my advisor Mark Stokes – for believing in me and guiding me through what hopefully will forever remain the most trying and tumultuous period of my research career. Many thanks also to my new-found friends and colleagues in EP – to Dante, Eelke, Emilia, Frida, Ilenia, Michael, Michal, Nick, Paul, and Sam –, to my collaborators at the Bethel Epilepsy Center in Bielefeld who smashed data collection, and to the patients who so graciously offered up their time for science. Last, but not least, a trillion thanks to my husband, Henrik, and newborn son, Ilia Sébastien – you know your role.

# La Domestication du loup au cours du Paléolithique – Apport de l’approche croisée de la Paléogénomique et la Morphométrie.

**Myriam BOUDADI-MALIGNE**

*Chargée de recherches au CNRS UMR 5199 PACEA « De la Préhistoire à l’Actuel : Cultures, Environnements, Anthropologie », Université de Bordeaux*

## Résumé

Les travaux menés dans le cadre du projet DOGMATIQ, en collaboration avec M. Pruvost et M.-F. Deguilloux et financé par la fondation Fyssen, nous ont permis d’appréhender le processus de domestication du loup en croisant morphométrie et paléogénomique. L’étude comparée des canidés fossiles des sites de Troubat, La Vache et l’Igue du Gral et de loups et chiens actuels a mis en évidence des modifications impactant le squelette post-crânien, dès les phases paléolithiques de la domestication de ce carnivore. Ces changements pourraient être mis en lien avec un changement dans la mobilité des canidés vivant avec les groupes de chasseurs-collecteurs paléolithiques. D’un point de vue génomique, l’obtention de deux génomes de loups présents sur le territoire au moment des premières expériences de domestication ouvre des perspectives prometteuses pour documenter la diversité des populations sauvages et quantifier leur participation au pool initial de domestication.

## Mots-clés

Domestication, ADN ancien, Paléogénomique, Morphométrie, Paléolithique, Tardiglaciaire, Paléobiodiversité, Chiens, Loups

# Wolf domestication during Palaeolithic – Cross approach using palaeogenomics and morphometry

## Summary

The research carried out in the DOGMATIQ project (coll. M. Pruvost and M.-F. Deguilloux), financed by the Fyssen Foundation, has allowed us to understand the process of wolf domestication by crossing morphometry and palaeogenomics. The comparative study of fossil canids from the sites of Troubat, La Vache and the Igue du Gral and of modern wolves and dogs has enabled us to highlight modifications impacting the post-cranial skeleton, from the Palaeolithic phases of the domestication of this carnivore. These changes could be linked to a change in the mobility of the canids living with the Paleolithic hunter-gatherer groups. From a genomic point of view, the obtention of two genomes of wolves present on the territory at the time of the first domestication experiments, opens up promising prospects for documenting the diversity of wild populations and quantifying their participation in the initial domestication pool.

## Keywords

Domestication, Ancient DNA, Paleogenomics, Morphometry, Paleolithic, Tardiglacial, Paleobiodiversity, Dogs, Wolves



## Introduction

La domestication du loup constitue une innovation majeure dans l'Histoire des sociétés humaines. Son ancienneté (Paléolithique supérieur) et son caractère innovant (première espèce domestiquée) suscitent au sein de la communauté scientifique internationale diverses études et théories. Les découvertes archéologiques réalisées ces quarante dernières années ainsi que les avancées technologiques ont radicalement bouleversé notre connaissance et notre façon d'appréhender le processus de domestication. Pourtant de nombreuses questions, principalement d'ordre chronologique et géographique persistent autour de cette première domestication.

Les travaux menés ces vingt dernières années en biométrie, morphométrie et paléogénétique, bien que divergents sur l'attribution spécifique de plusieurs canidés du Paléolithique supérieur, concourent à dresser une image plurimodale de l'émergence et de la diffusion de la domestication sur le continent eurasiatique (Pionnier-Capitan et al., 2011, Crockford et Kuzmin 2012, Germonpré et al. 2013, Boudadi-Maligne et Escarguel 2014 ; Morey 2014, Drake et al. 2015, Frantz et al. 2016, Morey et Jeger 2016, Perri 2016).

À ce jour, de nombreuses études génétiques ont porté sur une combinaison de races actuelles de chiens et de groupes actuels de loups gris (ancêtre sauvage du chien). Les données acquises, documentant la diversité génétique/génomique de ces groupes, ont permis de proposer un certain nombre de scénarios concernant l'origine géographique et chronologique de la domestication du loup (Loog et al. 2019). Ces données ont également permis d'étudier l'évolution des gènes soumis à la sélection par l'homme tels que les gènes impliqués dans la couleur du pelage (Ollivier et al. 2013) ou ceux permettant de synthétiser l'amylase essentielle à la digestion de l'amidon (von Holdt et al. 2010 ; Larson et al. 2012 ; Arendt et al.

2014 ; Ollivier et al. 2016). Cependant, la diversité génomique des races actuelles de chiens résulte de la succession chronologique de différents processus de sélection dont il est difficile de différencier l'impact au niveau génomique. Ainsi, la création des races au cours du 19<sup>e</sup> siècle a complètement remodelé le pool génétique des chiens domestiques et a entraîné une perte importante de diversité (Deguilloux et al. 2009 ; Frantz et al. 2016). Ces événements récents ont brouillé le signal génétique des premiers événements de sélection par les groupes paléolithiques. Ce constat implique que seule l'analyse paléogénomique de loups et de chiens proches chronologiquement des premiers événements de domestication, peut permettre de préciser les caractères canins sélectionnés par l'homme durant les premiers temps de cette nouvelle relation avec l'animal. À ce jour, malheureusement, les rares études paléogénomiques concernant des chiens post-paléolithiques (principalement néolithiques), nettement postérieurs aux premières expériences de domestication (Frantz et al. 2016 ; Botigué et al. 2017). Les quelques études paléogénétiques menées sur des chiens plus anciens, se sont jusqu'à présent, concentrées sur l'ADN mitochondrial non informatif en terme de différenciation entre chien et loup ou en terme de sélection (ces études

avaient comme principal objectif, de proposer une datation relative pour cette première domestication ; Germonpré et al. 2009 ; Druzhkova et al. 2013 ; Thalmann et al. 2013).

Nous souhaitons de fait dans le cadre de cette

**“Nous souhaitons de fait dans le cadre de cette recherche financée par la Fondation Fyssen, explorer la possibilité d'apporter de nouvelles connaissances concernant les « premiers chiens » en Europe occidentale via les prismes de la morphométrie et de la paléogénomique, en nous concentrant sur les données issues du registre paléolithique.”**

recherche financée par la Fondation Fyssen, explorer la possibilité d'apporter de nouvelles connaissances concernant les « premiers chiens » en Europe occidentale via les prismes de la morphométrie et de la paléogénomique, en nous concentrant sur les données issues du registre paléolithique. Pour renouveler l'étude de cette première domestication, nous avons fait le choix d'une approche croisée en collaboration avec M. Pruvost (CNRS, PACEA) et M.-F. Deguilloux (Uni-

versité de Bordeaux, PACEA) couplant paléogénomique et morphométrie, afin de tenter d'établir un lien entre parties codantes de l'ADN génomique et critères morphométriques utilisés pour différencier loups et chiens.

### Loups et chiens tardiglaciaires

Dans le cadre de cette étude, trois sites pléistocènes ont été ciblés : la grotte-abri du Moulin à Troubat (Hautes-Pyrénées ; Boudadi-Maligne *et al.* 2020), la grotte de La Vache (Ariège ; Pailhaugue 1995) et l'Igue du Gral (Lot ; Castel *et al.* 2008, 2010). Ces trois gisements présentent des caractéristiques leur conférant un intérêt manifeste dans le cadre de l'étude du processus de domestication.

La grotte abri du Moulin à Troubat (fouilles M. Barbaza) a livré près de 150 restes associés à une industrie Azilienne, attribués au chien (*Canis familiaris*), sur la base de critères morphométriques et directement daté par le carbone 14 (Boudadi-Maligne *et al.* 2020). Le dépôt intentionnel de deux individus et la bonne représentativité des différents éléments du squelette font de ce gisement un cadre idéal pour l'étude de la conformation des chiens paléolithiques, de leur origine et leur diversité phylétique.

La grotte de La Vache (salle Monique, fouilles R. Robert) a également livré une très belle série (NR = 408 ; Pailhaugue 1995) de restes osseux et dentaires attribués au genre *Canis*. L'étude spécifique de ces restes a récemment été initiée. Les 8 individus identifiés ont bénéficié d'une étude biométrique, archéozoologique et paléogénomique et ont fait l'objet de datations directes.

L'Igue du Gral (fouilles Castel - Coumont - Boudadi-Maligne) est un aven-piège permettant l'étude de la succession et variabilité des populations de vertébrés tout au long de la fin du Pléistocène. Près de 900 restes de ce carnivore ont été identifiés dans l'aven et correspondent à 11 individus. Ils sont associés à de nombreux restes de renne, bison, cheval et lièvre dans un ensemble bio-stratigraphique bien daté (Boudadi-Maligne & Castel à paraître).

Sur la base de ces trois contextes exceptionnels (Fig. 1) il est donc possible de documenter la diversité des loups et des chiens à la fin du Paléolithique et d'explorer la contribution des populations de canidés sauvages locales au pool de domestication.

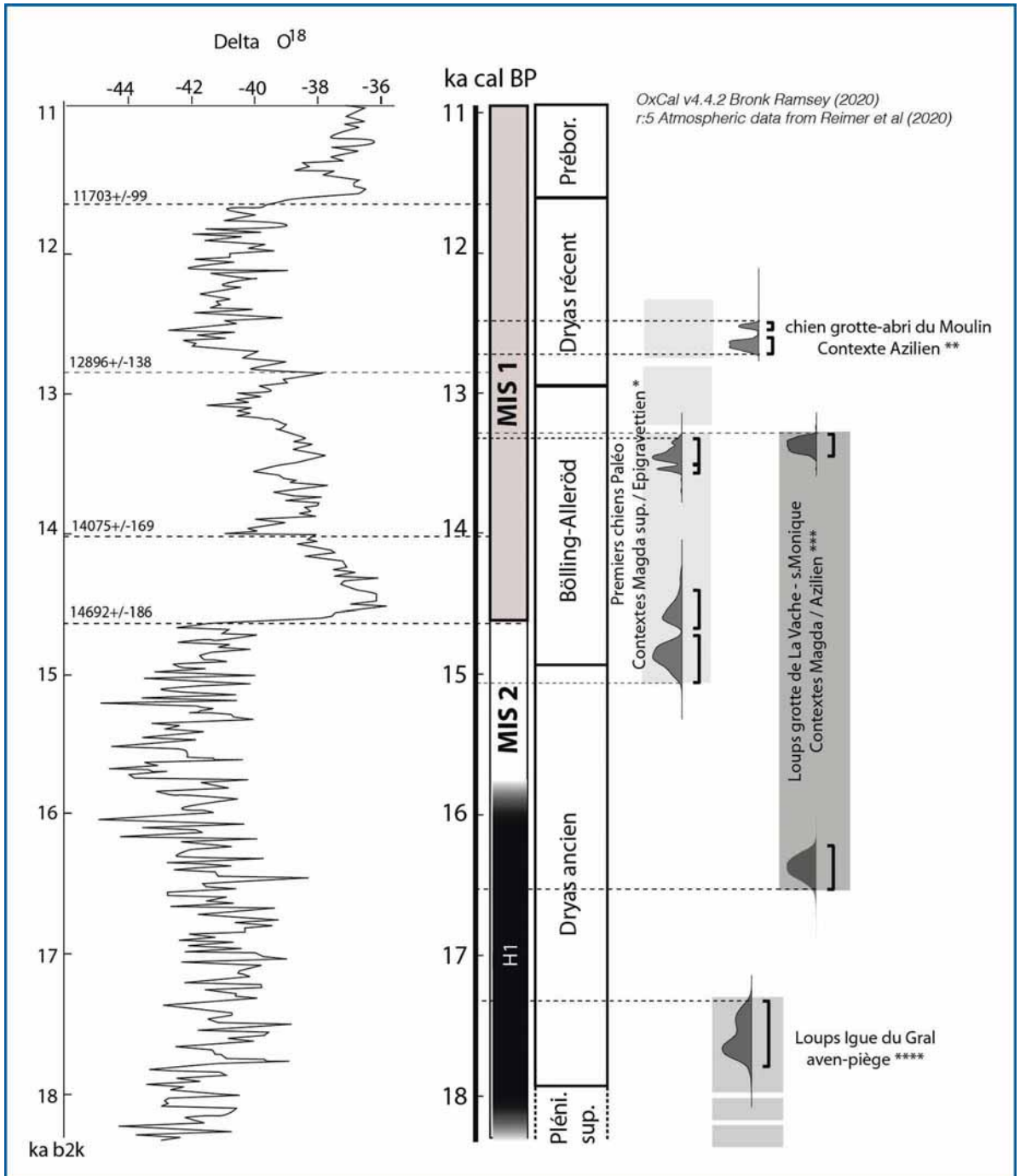
### Morphométrie et génomique

Force est de constater que la plupart des études menées sur les premières traces de domestication se basent sur le squelette crânien et les critères retenus pour différencier loup et chien ne sont établis que sur ces éléments.

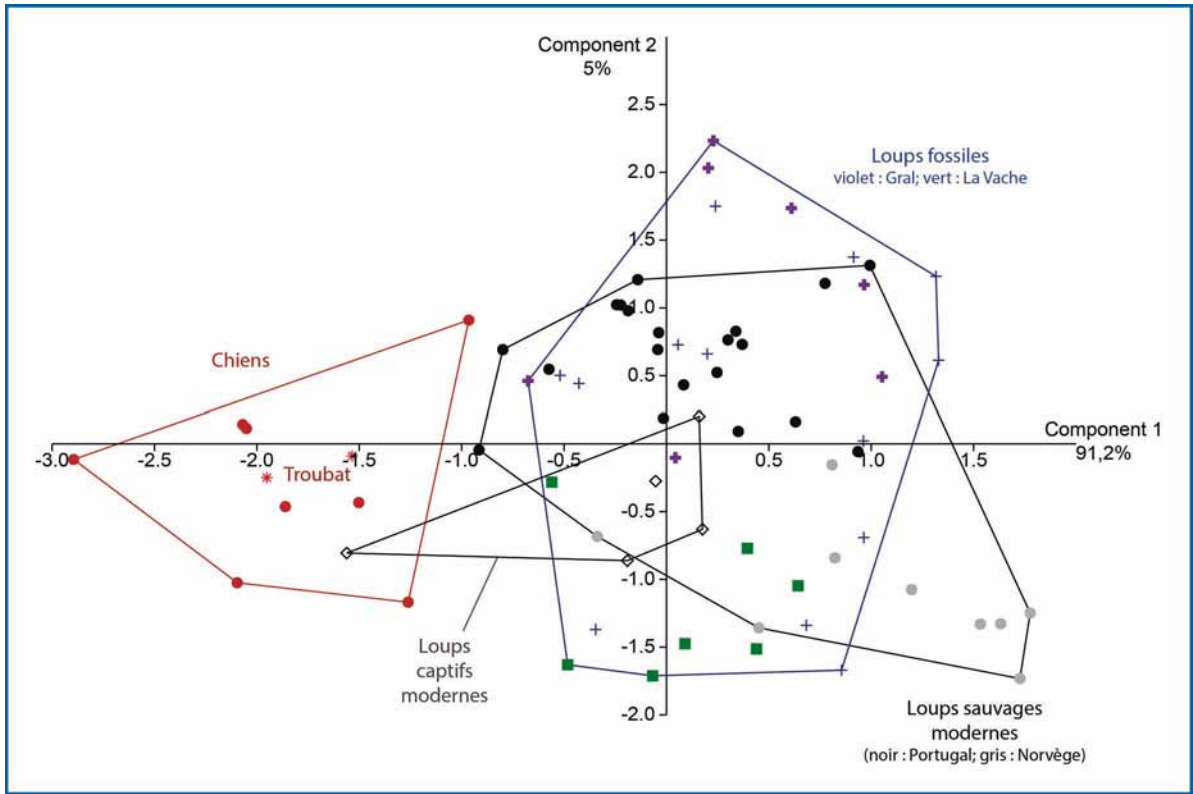
La diminution de la taille, la modification de la mobilité et / ou de la diète va cependant également impacter l'ensemble du squelette. La réalité du contexte fossilifère, à savoir quasi absence de crâne complet, éléments le plus souvent fragmentés... nous a poussé à développer une analyse comparative intégrant les éléments du squelette post-crânien les plus souvent représentés (extrémités des os longs, os courts...). À ce titre, le calcaneus, os compact relativement bien préservé dans son intégrité dans le registre fossile et élément dont le rôle est fondamental pour la locomotion, nous est apparu comme un élément de choix.

L'analyse des proportions de cet os du tarse met en évidence de nettes différences entre chiens et loups (Fig. 2), permettant de séparer très nettement les loups fossiles de l'Igue du Gral et de la Vache, des chiens fossiles de Troubat. Il faut cependant remarquer que s'il n'existe aucun recouvrement entre le groupe 'loups fossiles et sauvages actuels' et le groupe des chiens, les dimensions de cet os chez les loups captifs apparaissent plus variables puisque l'un d'entre eux s'inscrit dans la variabilité des chiens actuels (Fig. 2).

Les hémi-mandibules, éléments extrêmement informatifs pour la diagnose spécifique et bons candidats pour les prélèvements génomiques, nous renseignent également sur les relations Hommes-Canidés. Les analyses biométriques et morphologiques menées, montrent que les loups de La Vache s'insèrent dans l'espace de variation métrique et morphologique des loups de l'Igue du Gral. Alors que l'accumulation de loups dans l'aven de l'Igue du Gral apparaît « naturelle » notre étude des canidés de la grotte de La Vache, couplant morphométrie et archéozoologie, montre que cette accumulation de loups dans la grotte est en partie liée à l'Homme. La majorité des pièces, dont les hémi-mandibules, portent des traces d'origine anthropique (traces de chauffe, traces de découpe, impact de percussion, Fig. 3) attestant de l'utilisation de ce carnivore dans les sphères alimentaire et domestique des popula-



**Figure 1 :** Cadre radiométrique des sites de Troubat, La Vache et l'Igue du Gral établi sur la base des datations directes sur restes de canidés (\*Boudadi-Maligne et al. 2012 ; Baales 2006 ; Napierala & Uerpmann 2010 ; Boschini et al. 2020 ; \*\*Boudadi-Maligne et al. 2020 ; \*\*\*inédit - Fyssen DOGMATIQ ; \*\*\*\*Boudadi-Maligne 2010, Castel et Boudadi-Maligne in prep ; inédit - Fyssen DOGMATIQ).



**Figure 2** : Analyse en composante principale (ACP) à partir des mesures linéaires prises sur le calcaneus.

tions magdaléniennes et aziliennes ayant successivement occupé cette cavité.

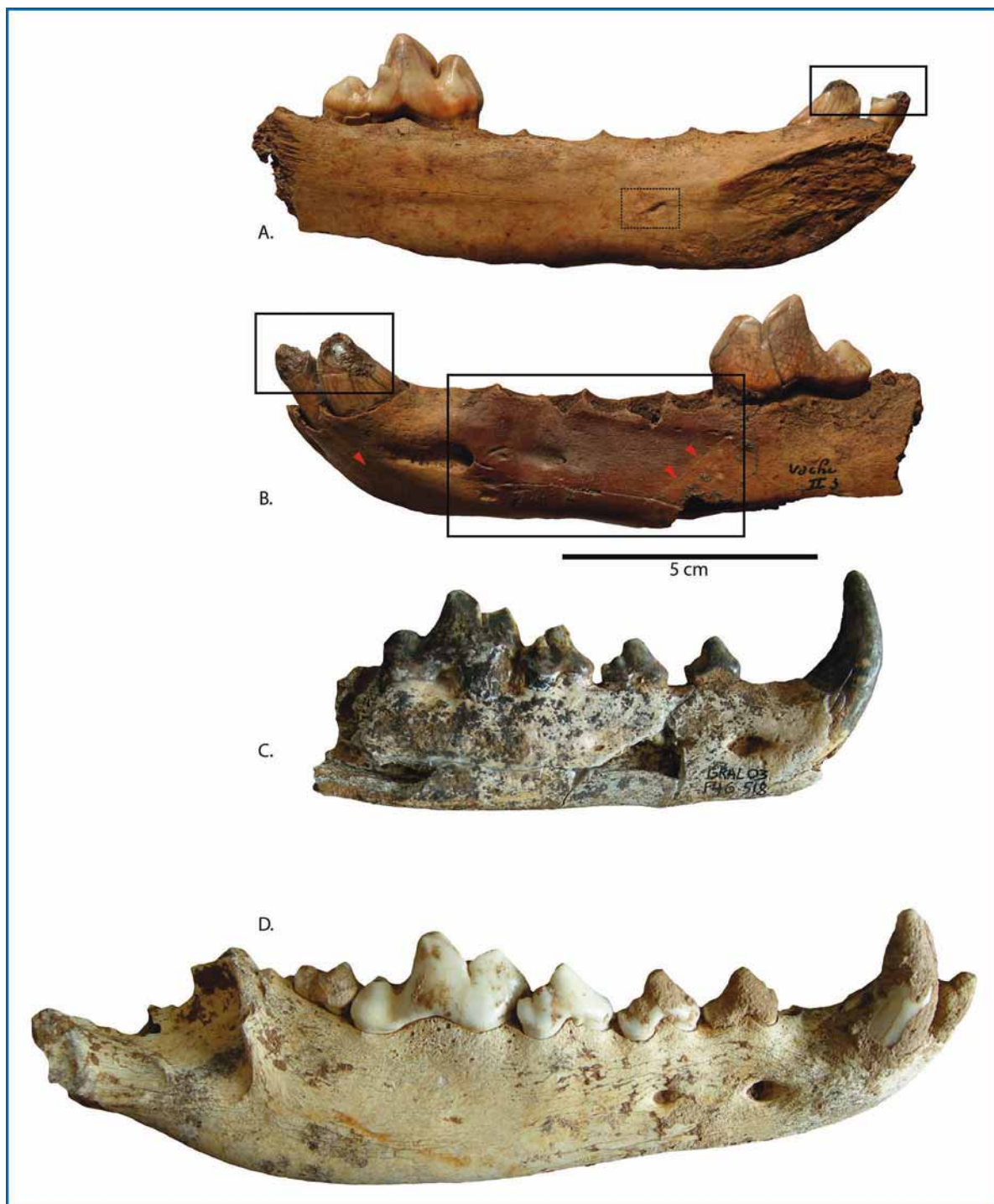
L'analyse paléogénomique menée en parallèle (Pruvost & Deguilloux coll.), a ciblé 24 vestiges de canidés anciens provenant de ces mêmes 3 contextes. Entre 235.304 et 2.179.574 séquences ont été obtenues pour le premier séquençage shotgun des bibliothèques d'ADN obtenues à partir des vestiges (Tabl. 1). L'analyse bioinformatique des séquences récupérées a permis de quantifier le pourcentage d'ADN de canidés au sein de chaque vestige (ADN endogène) ainsi que de tester leur authenticité via la recherche de dégradations spécifiques à l'ADN ancien (déaminations).

L'ADN s'est révélé très mal préservé dans les échantillons étudiés pour les sites de la grotte de Troubat et de La Vache avec des taux d'ADN endogène inférieurs à 1 %. La préservation de l'ADN ancien s'est révélée plus hétérogène sur le site de l'Igüe du Gral et 2 ossements (GRA518 (Fig. 3-C.) et GRA1161, en rose dans Tabl. 1) ont livré des taux d'ADN suffisamment

élevés (4,73 et 29,92 % respectivement) pour envisager l'obtention d'un génome complet pour GRA1161 et partiel pour GRA518 via un séquençage shotgun plus poussé.

Pour certains vestiges, la combinaison de très faibles taux d'ADN endogène, de faibles taux de déaminations typiques de l'ADN ancien et/ou de forts pourcentages en bases GC (signe que des séquences de type bactérien ont vraisemblablement été identifiées de façon erronée comme mappant sur le génome de chien) indique qu'aucun ADN exploitable n'a été récupéré (Tabl. 1). Pour les autres vestiges (exceptés GRA518 et GRA1161), malgré le faible taux d'ADN endogène, toutes les caractéristiques attestant de la présence de (très) faibles quantités d'ADN ancien authentique sont observées. Ces vestiges sont donc a priori éligibles pour des analyses utilisant des méthodes de capture permettant d'enrichir les bibliothèques d'ADN en régions génomiques d'intérêt.

Deux séquençages supplémentaires à haut-débit ont donc été réalisés pour obtenir des



**Figure 3** : Hémi-mandibules de loup (*Canis lupus*) de la Vache (A. et B.) et de l'Igüe du Gral (C. et D.). Les hémi-mandibules de la Vache présentent des traces de chauffe sur I3 et canine et sur le corps de la mandibule (encart noir, B.), enfoncement (cadre pointillé noir, A) et traces de découpe (flèches rouges). Les hémi-mandibules droites du Gral (C. et D.) sont elles dépourvues de traces d'origine anthropique.

Code Laboratoire	Site	Nombre de reads obtenus	nombre de reads mergés	nombre de reads mappés sur le génome de chien	nombre de reads mappés sur le génome de chien après retrait des duplicats	% d'ADN endogène de chien	% d'ADN endogène de chien après filtre de qualité	Cluster Factor	% déamination 1ère base en 3'	% déamination 2nd base en 3'	% déamination 1ère base en 5'	% déamination 2nd base en 5'	Longueur moyenne des reads	% en bases GC
A814_GRA475	Igue du Gral	895 756	307 082	4 733	82	1.061	0.019	1.049	0.0	0.0526	0.0	0.0	44.37	62.64
A815_GRA769	Igue du Gral	818 786	323 928	876	190	0.226	0.050	1.021	0.1471	0.0278	0.2414	0.0	39.29	42.58
A816_GRA349	Igue du Gral	1 624 170	623 958	7 204	4 447	0.971	0.615	1.026	0.1575	0.0212	0.1793	0.0258	39.62	38.68
A817_GRA347	Igue du Gral	2 167 418	808 233	2 186	80	0.208	0.008	1.013	0.0645	0.037	0.0	0.0588	36.94	71.91
A818_GRA218	Igue du Gral	2 179 574	853 124	3 953	1 354	0.387	0.135	1.021	0.1875	0.0139	0.2018	0.005	41.08	42
A819_GRA1256	Igue du Gral	1 428 584	555 421	2 061	451	0.333	0.076	1.044	0.1122	0.0208	0.08	0.036	38.55	49.03
A820_GRA840	Igue du Gral	1 337 870	311 780	2 194	596	0.352	0.098	1.023	0.1495	0.019	0.1982	0.033	41.74	44.63
A821_GRA494	Igue du Gral	1 407 230	526 756	1 680	318	0.252	0.048	1.013	0.1216	0.0192	0.1406	0.0364	45.69	45.51
A822_GRA1426	Igue du Gral	1 401 066	519 736	7 366	5 234	1.094	0.774	1.023	0.1313	0.0178	0.1296	0.0225	48.41	41.46
A823_GRA1161	Igue du Gral	1 836 906	700 887	300 825	250 826	34.980	<b>29.922</b>	1.026	0.1654	0.0254	0.1667	0.0249	44.73	41.49
A824_GRA518	Igue du Gral	1 024 362	402 114	27 707	22 808	5.605	<b>4.725</b>	1.024	0.1459	0.0191	0.1481	0.0169	50.91	40.59
A825_GRA17	Igue du Gral	1 729 206	677 006	1941	240	0.250	<b>0.032</b>	1.029	<b>0.0513</b>	0.0	<b>0.0444</b>	0.0	<b>41.06</b>	47.95
A826_GRA234	Igue du Gral	891 628	310 226	3 409	920	0.737	0.204	1.026	0.1592	0.0563	0.1951	0.0429	44.31	43.18
A827_TROUphk	Grotte-abri Moulin Troubat	1 236 256	<b>456495</b>	1527	<b>169</b>	0.285	<b>0.032</b>	1.018	<b>0.0577</b>	0.0256	<b>0.0278</b>	0.0	<b>43.16</b>	55.48
A828_TROUmeta	Grotte-abri Moulin Troubat	1 541 900	585 047	1 664	114	0.243	0.017	1.026	0.1176	0.025	0.0741	0.037	42.52	59.86
A904_IV0	La Vache	1 603 226	611 690	2 992	968	0.445	0.147	1.022	0.0918	0.0235	0.0735	0.011	43.3	47.04
A905_IV1	La Vache	1 525 188	623 447	3 374	1 369	0.502	0.208	1.023	0.0924	0.0157	0.1143	0.0257	42.18	45.17
A906_IV2	La Vache	389 890	148 019	2 533	213	1.264	0.107	1.009	0.2308	0.0	0.125	0.0278	42.42	43.02
A907_IV4	La Vache	1 293 382	486 568	1 901	465	0.356	0.089	1.024	0.0769	0.07	0.1429	0.0341	41.16	48.11
A908_IV5	La Vache	1 540 906	601 843	6 976	4 667	0.944	0.650	1.029	0.062	0.0217	0.0906	0.0148	55.31	44.02
A909_IV28	La Vache	1 441 486	571 976	2 442	933	0.344	0.135	1.027	0.142	0.0115	0.1488	0.0194	44.35	45.22
A910_IV70	La Vache	1 544 716	556 804	6 367	3 365	0.816	0.442	1.025	0.1261	0.0263	0.1235	0.0196	45.8	44.78
A911_IV190	La Vache	283 804	91 524	830	431	0.713	0.379	1.023	0.1351	0.0333	0.1688	0.0154	45.81	41.18
A912_IV259	La Vache	1 413 114	562 764	4 447	2 529	0.677	0.395	1.027	0.1206	0.025	0.1504	0.0209	45.57	43.94

**Tableau 1** : Résultats du séquençage shotgun des échantillons analysés (M. Pruvost & MF. Deguilloux)

génomés nucléaires couverts à plus de 1,5x pour l'échantillon GRA1161 et 0,1x pour GRA518, ainsi que des génomes mitochondriaux complets pour les 2 individus (avec une couverture respective de 55x et 7x). Les données de ce séquençage ont d'ores et déjà permis de déterminer le sexe de ces individus en comparant le nombre de séquences du chromosome X (en rouge **Fig. 3**) et celui des autres autosomes proportionnellement à leur taille (répartition de cette proportion pour chaque individu représentée par une boîte à moustache, **Fig. 4**). Les 2 échantillons ont pu être déterminés comme se rapportant à des femelles.

Le sexe des individus constitue une information cruciale, notamment lors de l'étude de la diversité génétique des populations. Les résultats ici obtenus font écho aux données morphométriques acquises par ailleurs. En effet, ces données permettent de confirmer le lien entre les petites proportions de la mandibule GRA518 et son attribution proposée à une femelle.

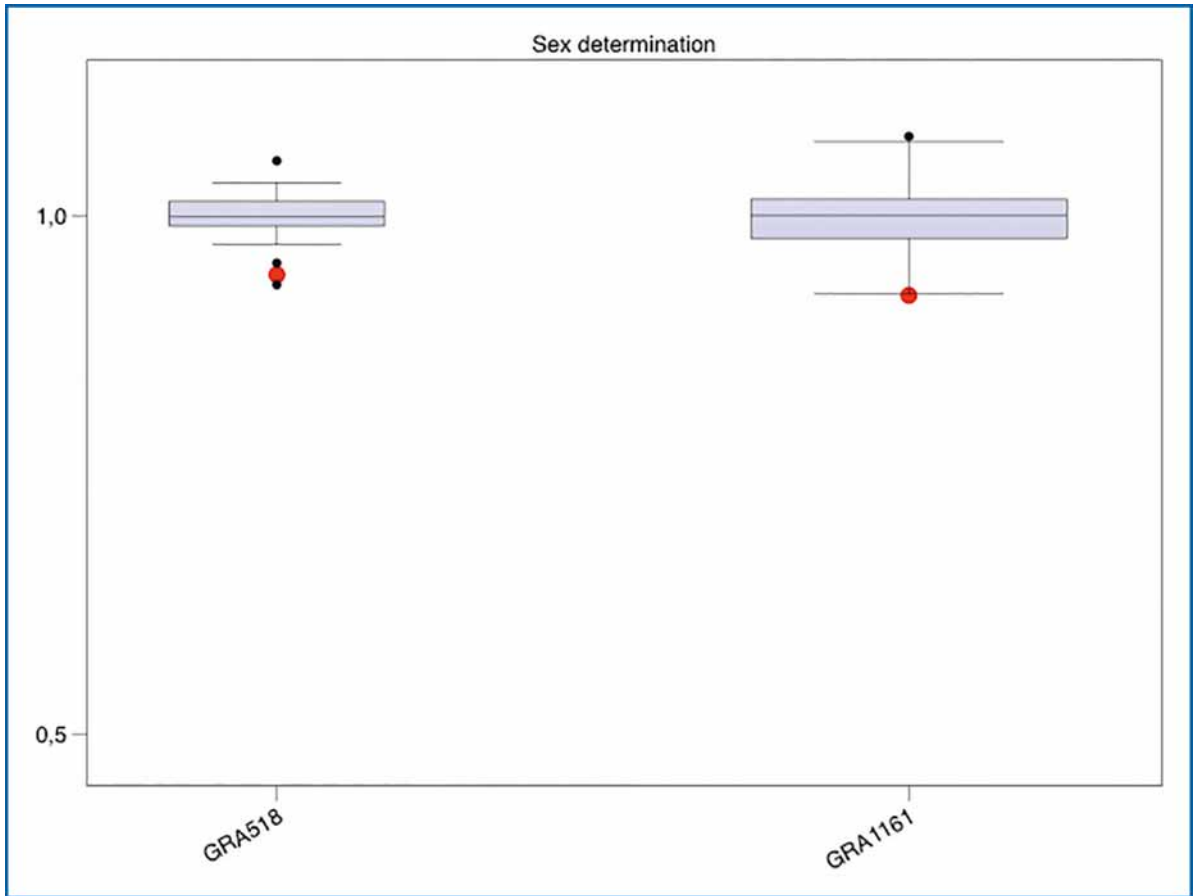
### Conclusions & Perspectives

Les travaux entrepris dans le projet DOGMATIQU constituent une étape prometteuse pour l'étude du processus de domestication.

Des génomes ont été obtenus pour deux loups datés entre 17,5 et 19,5 ka cal BP, provenant du

site de l'Igue du Gral (Lot). Ces données procurent une documentation inédite de la diversité génomique des populations locales de loups du Tardiglaciaire d'Europe de l'Ouest et vont permettre de tester leur contribution au pool initial de domestication dans cette région clé. Les analyses bioinformatiques visant à comparer les deux génomes anciens obtenus pour l'Igue du Gral aux génomes anciens de canidés publiés, ainsi qu'aux génomes de chiens et de loups modernes présents dans les banques de données, sont en cours. Des marqueurs génétiques caractéristiques de la diversité des canidés actuels seront recherchés dans ces génomes afin de tester leurs proximités génétiques avec les espèces actuelles et les loups anciens.

Par ailleurs, une méthode de capture est en cours de développement sur canidés. Cette méthode ouvre la perspective d'analyser les échantillons anciens qui présentent de faibles taux d'ADN endogène. Cette méthode permettra d'enrichir les bibliothèques d'ADN en génome mitochondrial et / ou en régions du génome nucléaires spécifiques et informatives en terme de caractérisation de chiens *vs.* loups anciens et d'évolution des caractères phénotypiques sélectionnés par l'homme au cours de la domestication du loup.



**Figure 4 :** Comparaison du nombre de séquences du chromosome X (en rouge) et de celui des autres autosomes en fonction à leur taille pour les individus GRA518 et GRA1161. M. Pruvost & M.-F. Deguilloux

Le croisement des données archéologiques, morphométriques et génomiques compilées sur des restes de canidés inédits permettra rapidement (i) de documenter de façon inédite la corrélation entre variation génomique et morphologiques de populations de loups du Tardiglaciaire en Europe de l'Ouest, (ii) de tester l'implication de ces populations au processus de domestication et (iii) de vérifier si les critères génomiques permettant la différenciation entre chiens et loups sont bien corrélés aux critères morphométriques.

### Remerciements

Ce travail est le fruit d'une recherche collaborative et n'aurait pas pu être mené sans l'investissement constant de mes deux collègues paléogénéticiennes, Mélanie Pruvost et Marie-France Deguilloux. Je tiens donc à les remercier chaleureusement.

Nous tenons avant tout également, à remercier la Fondation Fyssen pour nous avoir accordé cette subvention de recherche qui nous a permis d'initier un travail dont les perspectives sont nombreuses et passionnantes. Nous remercions l'UMR PACEA, le personnel administratif sans qui ce travail n'aurait pas été possible et notamment Audrey Laborde, Nathalie Kellay et Catherine Morel-Chevillet. Nous tenons également à remercier le Museum d'Oslo (Norvège) et particulièrement Lars Erik Johannessen, ainsi que le CCE Ariège et le SRA Occitanie pour avoir rendu possible les différentes analyses. Un grand merci aux collègues qui dans le cadre de cette recherche, ont apporté leur concours indispensable et leurs conseils : Jean-Baptiste Mallye, Ronan Ledevin, Xavier Muth, Sandrine Costamagno, Ludovic Orlando, Jean-Christophe Castel, Olivier Bignon-Lau, Harmony De Belvalet et Marie-Hélène Pemonge.

## Bibliographie

- Baales, M. (2006). Environnement et archéologie durant le Paléolithique final dans la région du Rhin moyen (Rhénanie, Allemagne) : conclusions des 15 dernières années de recherches. *L'anthropologie*, 110(3), 418-444.
- Botigué, L. R., Song, S., Scheu, A., Gopalan, S., Pendleton, A. L., Oetjens, M., Taravella, A. M., Seregély, T., Zeeb-Lanz, A., Arbogast, A.-M., Bobo, D., Daly K., Unterländer, M., Burger, J., Kidd, J. M., Veeramah K. R. (2017). Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. *Nature communications*, 8, 16082.
- Boschin, F., Bernardini, F., Pilli, E., Vai, S., Zanoli, C., Tagliacozzo, A., Fico, R., Fedi, M., Corny, J., Dreossi, D., Lari, M., Modi, A., Vergata, C., Tuniz, C., Moroni, A., Boscato, P., Caramelli, D., & Ronchitelli, A. (2020). The first evidence for Late Pleistocene dogs in Italy. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.
- Boudadi-Maligne M. 2010 – Les *Canis* pléistocènes du Sud de la France : approche biosystématique, évolutive et biochronologique, Université Bordeaux 1, Thèse de Doctorat, 451 p. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00908031>
- Boudadi-Maligne M., Mallye J.-B., Langlais M., Barshay-Szmidt C. 2012 – Des restes de chiens magdaléniens à l’abri du Morin (Gironde, France). Implications socio-économiques d’une innovation zootechnique, *Paléo*, 23, p. 39-53.
- Boudadi-Maligne M., Escarguel G. 2014 – A biometric re-evaluation of recent claims for Early Upper Palaeolithic wolf domestication in Eurasia, *Journal of Archaeological Science*, 45, p. 80-89.
- Boudadi-Maligne, M., Mallye, J.-B., Ferrié, J.-G., Costamagno, S., Barshay-Szmidt, C., Deguilloux, M.-F., Pemonge, M.-H. & Barbaza, M. (2020). The earliest double dog deposit in the Palaeolithic record: The case of the Azilian level of Grotte-abri du Moulin (Troubat, France). *International Journal of Osteoarchaeology*, 30(3), 382-394.
- Crockford S.J., Kuzmin Y.V. 2012 – Comments on Germonpré et al., *Journal of Archaeological Science* 36, 2009 “Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes”, and Germonpré, Lázkičková-Galetová and Sablin, *Journal of Archaeological Science* 39, 2012 “Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Predmostí site, the Czech Republic”, *Journal of Archaeological Science*, 39(8), p. 2797-2801.
- Deguilloux, M.-F., Moquel, J., Pemonge, M.-H., Colombeau, G., 2009. Ancient DNA supports lineage replacement in European dog gene pool: insight into Neolithic southeast France. *Journal of Archaeological Science* 36, 513-519.
- Drake, A.G., Coquerelle, M., Colombeau, G. (2015). 3D morphometric analysis of fossil canid skulls contradicts the suggested domestication of dogs during the late Paleolithic. *Science Reports*, 5.
- Druzhkova, A. S., Thalmann, O., Trifonov, V. A., Leonard, J. A., Vorobieva, N. V., Ovodov, N. D., Graphodatsky, A. S., Wayne, R. K. 2013. Ancient DNA analysis affirms the canid from Altai as a primitive dog. *PLoS One*, 8(3), e57754.
- Frantz, L. A. F., Miullin, V. E., Pionnier-Capitan, M., Lebrasseur, O., Ollivier, M., Perri, A., Linderholm, A., Mattiangeli, V., Teasdale, M. D., Dimopoulos, E. A., Tresset, A., Duffraisie, M., McCormick, F., Bartosiewicz, L., Gál, E., Nyerges, É. A., Sablin, M. V., Bréhard, S., Mashkour, M., Balasescu, A., Gillet, B., Hughes, S., Chassaing, O., Hitte, C., Vigne, J.-D., Dobney, K., Hänni, C., Bradley, D. G. & Larson, G. (2016). Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. *Science*, 352, 6290, p. 1228-1231.
- Germonpré, M., Sablin, M. V., Stevens, R. E., Hedges, R. E. M., Hofreiter, M., Stiller M., Després V. R. (2009). Fossil dogs and wolves from Paleolithic sites in Belgium, The Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes, *Journal of Archaeological Science* 36, 473-490.
- Germonpré M., Sablin M.V., Després V., Hofreiter M., Lázničková-Galetová M., Stevens R.E., Stiller M. 2013 – Palaeolithic dogs and the early domestication of the wolf: a reply to the comments of Crockford and Kuzmin (2012). *Journal of Archaeological Science* 40 (1), p. 786-792.
- Loog, L., Thalmann, O., Sinding, M. H. S., Schuenemann, V. J., Perri, A., Germonpré, M., Bocherens, H., Witt, K. E., Samaniego Castruita, J. A., Velasco, M. S., Lundström, I. K. C., Wales, N., Sonet, G., Frantz, L., Schroeder, H., Budd, J., Jimenez, E.-L., Fedorov, S., Gasparyan, B., Kan-



del, A. W., Lázničková-Galetová, M., Napierala, H., Uerpamann, H.-P., Nikolskiy, P. A., Pavlova, E. Y., Pitulko, V. V., Herzig, K.-H., Malhi, R. S., Willerslev, E., Hansen, A. J., Dobney, K., Gilbert, M. T. P., Krause, J., Larson, G., Eriksson, A. & Manica, A. (2020). Ancient DNA suggests modern wolves trace their origin to a Late Pleistocene expansion from Beringia. *Molecular ecology*, 29(9), 1596-1610.

- Morey, D. F. (2014). In search of Paleolithic dogs: a quest with mixed results. *Journal of Archaeological Science*, 52, 300-307.

- Morey, D. F., & Jeger, R. (2016). From wolf to dog: Late Pleistocene ecological dynamics, altered trophic strategies, and shifting human perceptions. *Historical Biology*, 1-9.

- Napierala, H., & Uerpamann, H. P. (2012). A 'new' palaeolithic dog from central Europe. *International Journal of Osteoarchaeology*, 22(2), 127-137.

- Ollivier, M., Tresset, A., Hitte, C., Petit, C., Hughes, S., Gillet, B., Dufraisse, M., Pionnier-Capitan, M., Lagoutte, L., Arbogast, R.-M., Blsescu, A., Boroneant, A., Marshour, M., Vigne, J.-D. & Hänni, C. (2013). Evidence of coat color variation sheds new light on ancient canids. *PLoS one*, 8(10), e75110.

- Perri, A. (2016). A wolf in dog's clothing: Initial dog domestication and Pleistocene wolf variation. *Journal of Archaeological Science*, 68, p. 1-4.

- Pionnier-Capitan, M., Bémilli, C., Bodu, P., Célérier, G., Ferrié, J.-G., Fosse P., Garcia, M. & Vigne, J.-D. (2011). New evidence for Upper Palaeolithic small domestic dogs in South-Western Europe. *Journal of Archaeological Science*, 38 (9), p. 2123-2140.

- Thalmann, O., Shapiro, B., Cui, P., Schueneemann, V.J., Sawyer, S.K., Greenfield, D.L., Germonpré, M.B., Sablin, M.V., López-Giráldez, F., Domingo-Roura, X., Napierala, H., Uerpamann, H.P., Loponte, D.M., Acosta, A.A., Giemsch, L., Schmitz, R.W., Worthington, B., Buikstra, J.E., Druzhkova, A., Graphodatsky, A.S., Ovodov, N.D., Wahlberg, N., Freedman, A.H., Schweizer, R.M., Koepfli, K.-P., Leonard, J.A., Meyer, M., Krause, J., Pääbo, S., Green, R.E. & Wayne, R.K. (2013). Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs. *Science*, 342(6160), 871-874.

## Introduction

The wolf domestication is a major innovation in the history of human societies. Its ancientness (Upper Paleolithic) and its innovative aspect (first domesticated species) have given rise to various studies and theories within the international scientific community. The archaeological discoveries made over the last forty years, as well as technological advances, have radically changed our knowledge and understanding of the domestication process. However, many questions, mainly of a chronological and geographical nature, still remain about this first domestication.

The work carried out over the last twenty years in biometry, morphometrics and palaeogenetics, although divergent on the specific attribution of several Upper Palaeolithic canids, contributes to drawing a multi-modal picture of the emergence and diffusion of domestication on the Eurasian continent (Pionnier-Capitan et al, 2011, Crockford and Kuzmin 2012, Germonpré et al. 2013, Boudadi-Maligne and Escarguel 2014; Morey 2014, Drake et al. 2015, Frantz et al. 2016, Morey and Jeger 2016, Perri 2016).

To date, many genetic studies have focused on a combination of modern dog breeds and modern grey wolf groups (the wild ancestor of the dog). The data acquired, documenting the genetic/genomic diversity of these groups, have allowed a number of scenarios to be proposed regarding the geographical and chronological origin of wolf domestication (Loog et al. 2019). These data have also made it possible to study the evolution of genes subject to human selection, such as those involved in coat colour (Ollivier et al. 2013) or those allowing the synthesis of the amylase essential for starch digestion (vonHoldt et al. 2010; Larson et al. 2012; Arendt et al. 2014; Ollivier et al. 2016). However, the genomic diversity of modern dog breeds results from the chronological succession of different selection processes whose impact on the genomic level is difficult to differentiate. Thus, the creation of breeds during the 19th century completely reshaped the gene pool of domestic dogs and led to a significant loss of diversity (Deguilloux et al. 2009; Frantz et al. 2016). These recent events have blurred the genetic signal of the first selection events by Palaeolithic human groups. This observation implies

that only the palaeogenomic analysis of wolves and dogs chronologically close to the first events of domestication can allow us to specify the traits selected in canids by humans during the first stages of this new relationship with the animal. To date, unfortunately, the rare palaeogenomic studies relate to post-Paleolithic (mainly Neolithic) dogs, clearly posterior to the first domestication experiences (Frantz et al. 2016; Botigué et al. 2017). The few paleogenetic studies conducted on more ancient dogs have so far focused on mitochondrial DNA that is not informative in terms of differentiation between dogs and wolves or in terms of selection (the main objective of these studies was to propose a relative date for this first domestication; Germonpré et al. 2009; Druzhkova et al. 2013; Thalmann et al. 2013).

We consequently wanted, in this research framework financed by the Fyssen Foundation, to explore the possibility of providing new knowledge concerning the “first dogs” in Western Europe focussing on data from the Palaeolithic record. In order to renew the study of this first domestication, we have chosen a combined approach in collaboration with M. Pruvost (CNRS, PACEA) and M.-F. Deguilloux (University of Bordeaux, PACEA), using palaeogenomics and morphometry, in order to try to establish a link between the coding parts of DNA and the morphometric criteria used to differentiate wolves and dogs.

### Late Glacial wolves and dogs

Three Pleistocene sites were targeted in this study: the cave-shelter of le Moulin at Troubat (Hautes-Pyrénées; Boudadi-Maligne et al. 2020), La Vache cave (Ariège; Pailhaugue 1995) and the pitfall of the Igue du Gral (Lot; Castel et al. 2008, 2010). These three sites have features that make them of obvious interest in the study of the domestication process.

The Moulin cave shelter (excavations M. Barbaza) yielded nearly 150 remains attributed to the dog (*Canis familiaris*) associated with an Azilian industry (Boudadi-Maligne et al. 2020). The

intentional deposit of two individuals and the good representativeness of the different elements of the skeleton make this deposit an ideal setting for the study of the conformation of Palaeolithic dogs, their origin and their phyletic diversity.

La Vache cave (Salle Monique, excavations R. Robert) has also yielded an important collection (NR = 408; Pailhaugue 1995) of bone and dental remains attributed to the genus *Canis*. The specific study of these remains has recently been initiated. The 8 individuals identified have benefited from a biometric, archaeozoological and palaeogenomic study and have been directly dated.

The pitfall of the Igue du Gral (Castel – Coumont – Boudadi-Maligne excavations) allows the study of the succession and variability of vertebrate populations throughout the late Pleistocene. Nearly 900 remains of wolves (*Canis lupus*) have been identified in the trap and correspond to 11 individuals. They are associated with numerous remains of reindeer, bison, horse and hare in a well-dated bio-stratigraphic sequence (Boudadi-Maligne & Castel to be published).

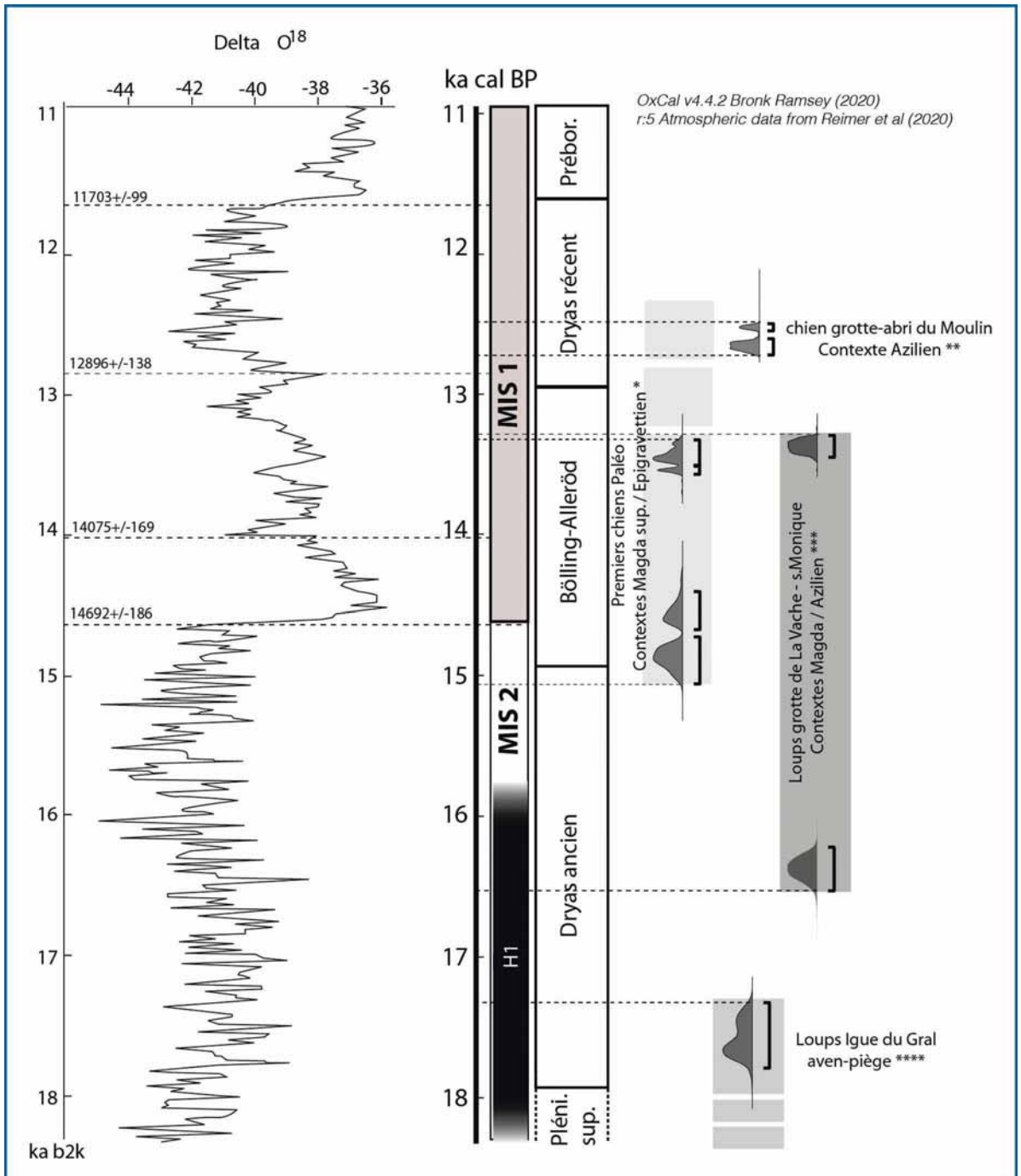
On the basis of these three exceptional contexts (Fig. 1) it is therefore possible to document the diversity of wolves and dogs at the end of the Palaeolithic and to explore the contribution of local wild canid populations to the domestication pool.

### Morphometry and genomics

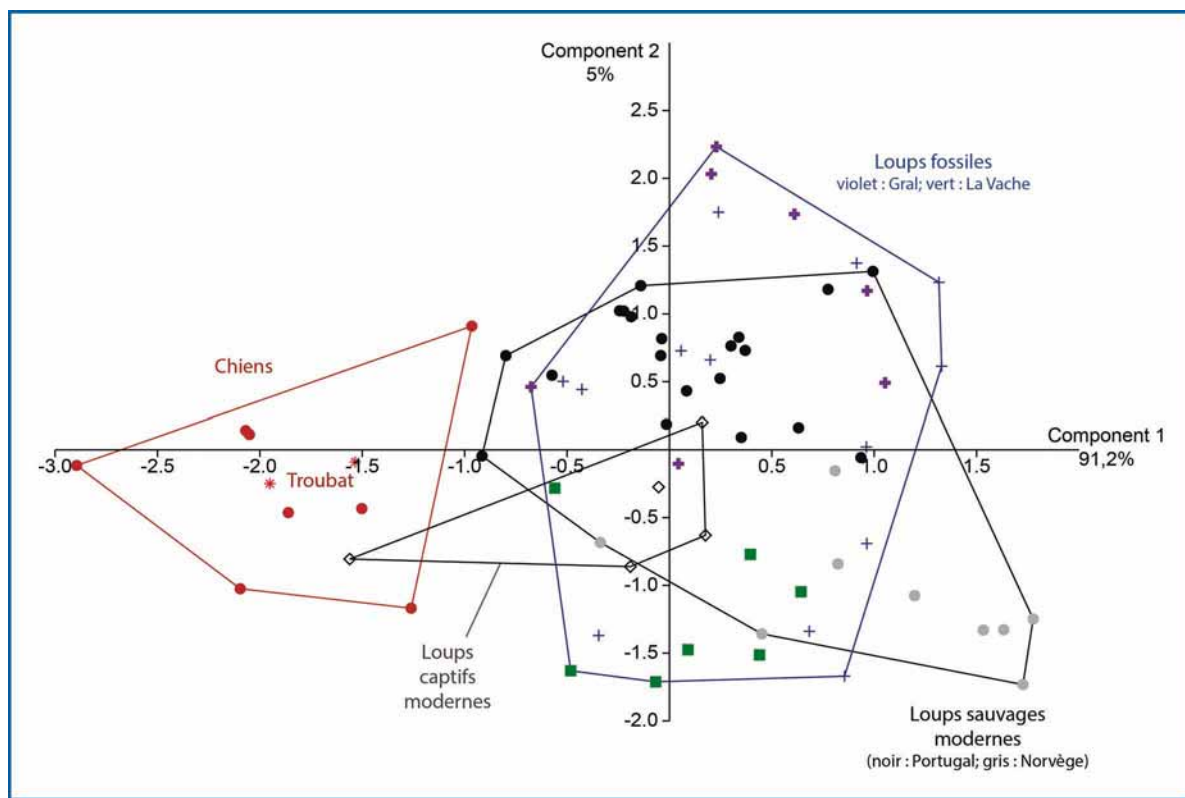
It is clear that most of the studies carried out on the first traces of domestication are based on the cranial skeleton, and the criteria used to differentiate wolves and dogs are established solely on these elements.

However, the reduction in size, the change in mobility and/or diet also had an impact on the whole skeleton. The reality of the fossil context, *i.e.* the near absence of a complete skull, elements that are most often fragmented, etc., has led us to

**“We consequently wanted, in this research framework financed by the Fyssen Foundation, to explore the possibility of providing new knowledge concerning the “first dogs” in Western Europe focussing on data from the Palaeolithic record.”**



**Figure 1:** Radiometric framework of Troubat, La Vache and Igue du Gral sites based on direct dating on canid remains (\*Boudadi-Maligne et al. 2012; Baales 2006; Napierala & Uerpmann 2010; Boschini et al. 2020; \*\*Boudadi-Maligne et al. 2020; \*\*\*unpublished - Fyssen DOGMATIQU; \*\*\*\*Boudadi-Maligne 2010, Castel and Boudadi-Maligne in prep; unpublished - Fyssen DOGMATIQU).



**Figure 2:** Principal component analysis (PCA) using linear measurements taken on calcaneus. Modern dogs are represented by red dots, modern wild wolves by black dots (for those from Portugal) and grey dots (wolves from Norway), fossil wolves are shown in blue, purple (Igue du Gral) and green (La Vache).

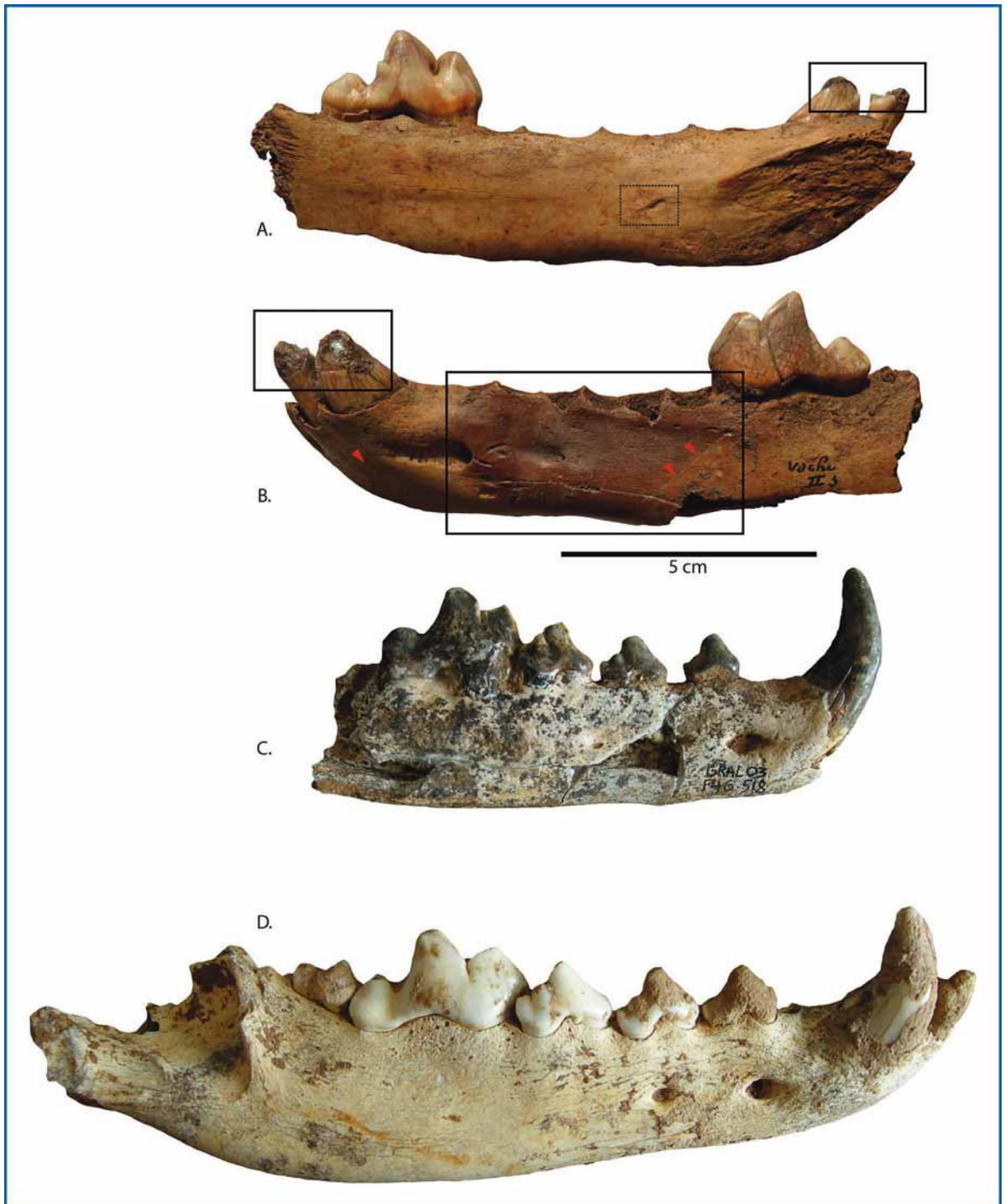
develop a comparative analysis integrating the elements of the post-cranial skeleton that are most often represented (ends of long bones, short bones, etc.). In this respect, the calcaneus, a compact bone relatively well preserved in its integrity in the fossil record and an element whose role is fundamental for locomotion, appeared to us as an appropriate element.

The analysis of the proportions of this tarsal bone highlights clear differences between dogs and wolves (Fig. 2), making it possible to separate very distinctly the fossil wolves from Igue du Gral and La Vache from the fossil dogs of Troubat. It should be noted, however, that while there is no overlap between the 'fossil and modern wild wolves' group and the dog group, the dimensions of this bone in the captive wolves appear more variable, as one of them falls within the variability of modern dogs (Fig. 2).

The hemi-mandibles, which are extremely informative for specific diagnosis and good candidates for genomic sampling, also provide infor-

mation on the relationship between humans and canids. The biometric and morphological analyses carried out, show that the wolves from La Vache fit into the metrical and morphological variability of the wolves from the Igue du Gral. While the accumulation of wolves in the Igue du Gral cavity appears to be "natural", our study of the canids from La Vache cave, combining morphometry and archaeozoology, shows that this accumulation of wolves in the cave is partly linked to humans. The main part of pieces, including the hemi-mandibles, bear anthropic traces (burned parts, cutmarks, percussion impact, Fig. 3) attesting to the use of this carnivore in the food and domestic spheres of the Magdalenian and Azilian populations that successively occupied this cave.

Paleogenomic analysis conducted in parallel (Pruvost & Deguilloux coll.), targeted 24 ancient canid remains from these same 3 contexts. Between 235,304 and 2,179,574 sequences were obtained for the first shotgun sequencing of DNA



**Figure 3:** Wolf (*Canis lupus*) hemi-mandibles from the La Vache (A. and B.) and the Igue du Gral (C. and D.). The hemi-mandibles from La Vache show burn marks on I3 and canine and on the body of the mandible (black inset, B.), pit (black dotted frame, A) and cutmarks (red arrows). The right hemi-mandibles of the Gral (C. and D.) are devoid of anthropogenic traces.

Code Laboratoire	Site	Nombre de reads obtenus	nombre de reads mergés	nombre de reads mappés sur le génome de chien	nombre de reads mappés sur le génome de chien après retrait des duplicats	% d'ADN endogène de chien	% d'ADN endogène de chien après filtre de qualité	Cluster Factor	% déamination 1ère base en 3'	% déamination 2nd base en 3'	% déamination 1ère base en 5'	% déamination 2nd base en 5'	Longueur moyenne des reads	% en bases GC
A814_GRA475	Igue du Gral	895 756	307 082	4 733	82	1.061	0.019	1.049	0.0	0.0526	0.0	0.0	44.37	62.64
A815_GRA769	Igue du Gral	818 786	323 928	876	190	0.226	0.050	1.021	0.1471	0.0278	0.2414	0.0	39.29	42.58
A816_GRA349	Igue du Gral	1 624 170	623 958	7 204	4 447	0.971	0.615	1.026	0.1575	0.0212	0.1793	0.0258	39.62	38.68
A817_GRA347	Igue du Gral	2 167 418	808 233	2 186	80	0.208	0.008	1.013	0.0645	0.037	0.0	0.0588	36.94	71.91
A818_GRA218	Igue du Gral	2 179 574	853 124	3 953	1 354	0.387	0.135	1.021	0.1875	0.0139	0.2018	0.005	41.08	42
A819_GRA1256	Igue du Gral	1 428 584	555 421	2 061	451	0.333	0.076	1.044	0.1122	0.0208	0.08	0.036	38.55	49.03
A820_GRA840	Igue du Gral	1 337 870	311 780	2 194	596	0.352	0.098	1.023	0.1495	0.019	0.1982	0.033	41.74	44.63
A821_GRA494	Igue du Gral	1 407 230	526 756	1 680	318	0.252	0.048	1.013	0.1216	0.0192	0.1406	0.0364	45.69	45.51
A822_GRA1426	Igue du Gral	1 401 066	519 736	7 366	5 234	1.094	0.774	1.023	0.1313	0.0178	0.1296	0.0225	48.41	41.46
A823_GRA1161	Igue du Gral	1 836 906	700 887	300 825	250 826	34.980	<b>29.922</b>	1.026	0.1654	0.0254	0.1667	0.0249	44.73	41.49
A824_GRA518	Igue du Gral	1 024 362	402 114	27 707	22 808	5.605	<b>4.725</b>	1.024	0.1459	0.0191	0.1481	0.0169	50.91	40.59
A825_GRA17	Igue du Gral	1 729 206	<b>677006</b>	1941	<b>240</b>	0.250	<b>0.032</b>	1.029	<b>0.0513</b>	0.0	<b>0.0444</b>	0.0	<b>41.06</b>	47.95
A826_GRA234	Igue du Gral	891 628	310 226	3 409	920	0.737	0.204	1.026	0.1592	0.0563	0.1951	0.0429	44.31	43.18
A827_TROUphk	Grotte-abri Moulin Troubat	1 236 256	<b>456495</b>	1527	<b>169</b>	0.285	<b>0.032</b>	1.018	<b>0.0577</b>	0.0256	<b>0.0278</b>	0.0	<b>43.16</b>	55.48
A828_TROUmeta	Grotte-abri Moulin Troubat	1 541 900	585 047	1 664	114	0.243	0.017	1.026	0.1176	0.025	0.0741	0.037	42.52	59.86
A904_IV0	La Vache	1 603 226	611 690	2 992	968	0.445	0.147	1.022	0.0918	0.0235	0.0735	0.011	43.3	47.04
A905_IV1	La Vache	1 525 188	623 447	3 374	1 369	0.502	0.208	1.023	0.0924	0.0157	0.1143	0.0257	42.18	45.17
A906_IV2	La Vache	389 890	148 019	2 533	213	1.264	0.107	1.009	0.2308	0.0	0.125	0.0278	42.42	43.02
A907_IV4	La Vache	1 295 382	486 568	1 901	465	0.356	0.089	1.024	0.0769	0.07	0.1429	0.0341	41.16	48.11
A908_IV5	La Vache	1 540 906	601 843	6 976	4 667	0.944	0.650	1.029	0.062	0.0217	0.0906	0.0148	55.31	44.02
A909_IV28	La Vache	1 441 486	571 976	2 442	933	0.344	0.135	1.027	0.142	0.0115	0.1488	0.0194	44.35	45.22
A910_IV70	La Vache	1 544 716	556 804	6 367	3 365	0.816	0.442	1.025	0.1261	0.0263	0.1235	0.0196	45.8	44.78
A911_IV190	La Vache	283 304	91 524	830	431	0.713	0.379	1.023	0.1351	0.0333	0.1688	0.0154	45.81	41.18
A912_IV259	La Vache	1 413 114	562 764	4 447	2 529	0.677	0.395	1.027	0.1206	0.025	0.1504	0.0209	45.57	43.94

**Table 1:** Results of shotgun sequencing (M. Pruvost & MF. Deguilloux).

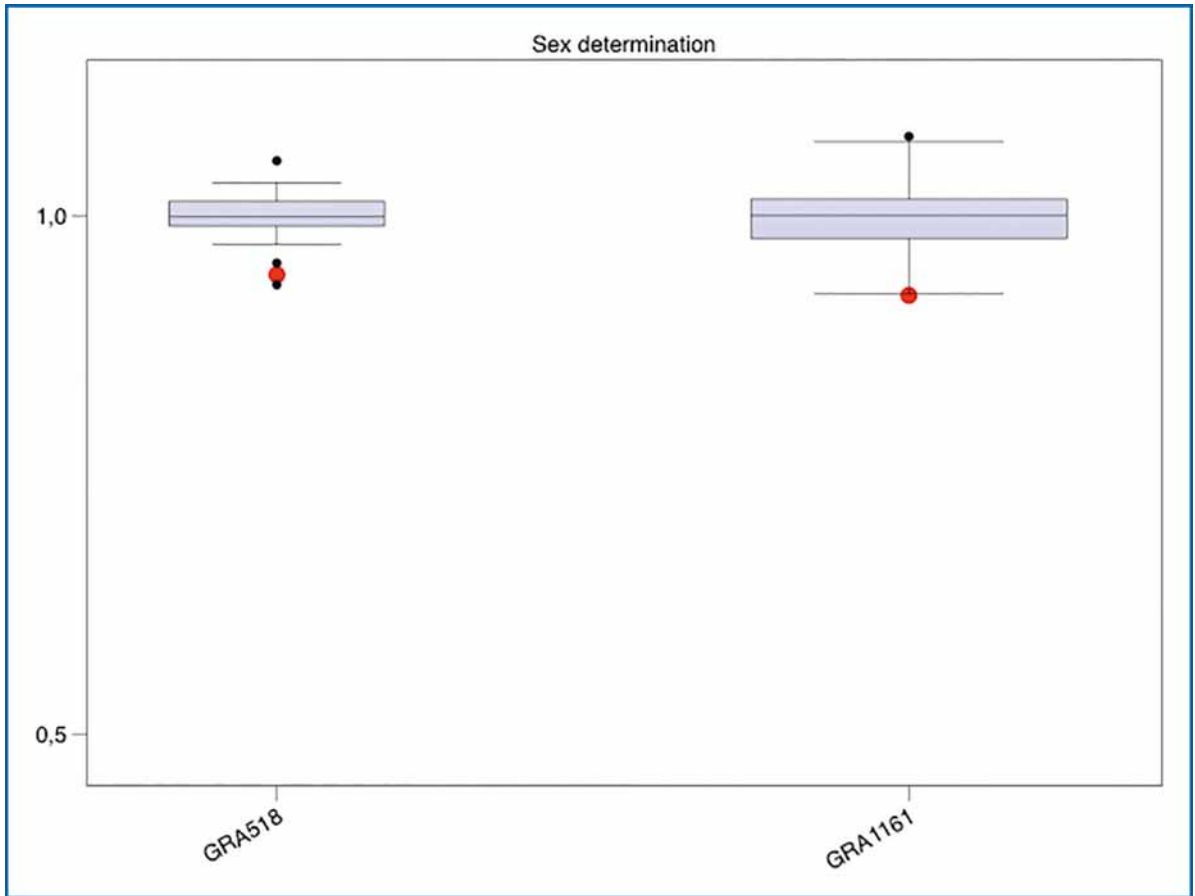
libraries obtained from the remains (**Table 1**). Bioinformatics analysis of the recovered sequences allowed the percentage of canid DNA within each remains (endogenous DNA) to be quantified and their authenticity to be tested via the search for degradations specific to ancient DNA (deaminations).

DNA was shown to be very poorly preserved in the samples studied for the Troubat and La Vache cave sites with endogenous DNA levels below 1%. Preservation of ancient DNA was more heterogeneous at the Igue du Gral site and two bones (GRA518 (**Fig. 3-C.**) and GRA1161, shown in pink in Table 1) yielded sufficiently high levels of DNA (4.73% and 29.92% respectively) to consider obtaining a complete genome for GRA1161 and a partial genome for GRA518 via further shotgun sequencing.

For some remains, the combination of very low levels of endogenous DNA, low levels of deaminations typical of ancient DNA and/or high GC base percentages (indicating that bacterial-like sequences were likely misidentified as mappers on the dog genome) indicates that no exploitable DNA was recovered (**Table 1**). For the other remains (except GRA518 and GRA1161), despite the low level of endogenous DNA, all the charac-

teristics that indicate the presence of (very) small amounts of authentic ancient DNA are observed. These remains are therefore a priori eligible for analysis using capture methods to enrich the DNA libraries for genomic regions of interest. Two additional high-throughput sequencing runs were therefore carried out to obtain nuclear genomes with more than 1.5x coverage for the GRA1161 sample and 0.1x for GRA518, as well as complete mitochondrial genomes for both individuals (with 55x and 7x coverage respectively). The data from this sequencing have already made it possible to determine the sex of these individuals by comparing the number of sequences on the X chromosome (in red, **Fig. 3**) and the number of sequences on the other autosomes in proportion to their size (distribution of this proportion for each individual represented by a moustache box, Fig. 4). Both samples could be determined as female.

The sex of individuals is crucial information, especially when studying the genetic diversity of populations. The results obtained are consistent with the morphometric data acquired earlier. Indeed, these data confirm the link between the small proportions of mandible GRA518 and its attribution to a female.



**Figure 4:** Comparison of the number of X-chromosome sequences (in red) and the number of other autosomes according to their size for individuals GRA518 and GRA1161. M. Pruvost & M.-F. Deguilloux.

## Conclusions & Perspectives

The work undertaken in the DOGMATIQ project constitutes a promising step in the study of the domestication process.

Genomes were obtained for two wolves dated between 17.5 and 19.5 ka cal BP, from the Igue du Gral site (Lot). These data provide original information on the genomic diversity of local Last Glacial wolf populations in Western Europe and will allow us to test their contribution to the initial domestication pool in this key region. Bioinformatic analyses to compare the two ancient genomes obtained for the Igue du Gral with published ancient canid genomes, as well as with modern dog and wolf genomes in databases, are in progress. Genetic markers characteristic of the diversity of modern canids will be screened in these genomes in order to test their genetic

proximities to modern species and ancient wolves.

In addition, a capture method is being developed for canids. This method opens up the prospect of analysing ancient samples with low levels of endogenous DNA. This method will allow the enrichment of DNA libraries with mitochondrial genome and/or specific and informative nuclear genome regions in terms of characterisation of dogs vs. ancient wolves and the evolution of phenotypic traits selected by human during wolf domestication.

The combination of archaeological, morphometric and genomic data compiled on the remains of unpublished canids will make it possible to (i) document in an original way the correlation between genomic and morphological variation in Last Glacial wolf populations in Wes-

tern Europe, (ii) test the involvement of these populations in the domestication process and (iii) check whether the genomic criteria allowing differentiation between dogs and wolves are correlated with morphometric criteria.

### Acknowledgements

This work is the fruit of collaborative research and could not have been carried out without the constant investment of my two paleogeneticist colleagues, Mélanie Pruvost and Marie-France Deguilloux. I would therefore like to warmly thank them. Above all, we would also like to thank the Fyssen Foundation for having granted us this research grant, which has enabled us to initiate a

project with many exciting prospects. We would like to thank the UMR PACEA, the administrative staff without whom this work would not have been possible and in particular Audrey Laborde, Nathalie Kellay and Catherine Morel-Chevillet. We would also like to thank the Museum of Oslo (Norway) and in particular Lars Erik Johannesen, as well as the CCE Ariège and the SRA Occitanie for having made the various analyses possible. Many thanks to the colleagues who, in the framework of this research, provided their essential assistance and advice: Jean-Baptiste Mallye, Ronan Ledevin, Xavier Muth, Sandrine Costamagno, Ludovic Orlando, Jean-Christophe Castel, Olivier Bignon-Lau, Harmony De Belvalet and Marie-Hélène Pemonge.



## **Ichnologie en milieu souterrain. Les empreintes comme marqueur des comportements humains en grotte.**

**Lysianna LEDOUX**

*Post doctorante, Institut International des recherches préhistoriques, Université de Cantabrie, Espagne.*

### **Résumé**

La stabilité des grottes en fait des conservatoires naturels idéaux permettant la pérennité de certains vestiges beaucoup plus vulnérables dans d'autres contextes. Ainsi, ce projet s'intéresse particulièrement aux empreintes humaines retrouvées en grotte. Plus spécifiquement, l'objet de cet article concerne le Réseau Whal, galerie préhistorique de la grotte de Fontanet découvert en 1972 et dont nous avons repris l'étude depuis 2018. La première moitié de ce réseau est, en effet, caractérisée par une concentration importante d'empreintes exceptionnellement bien conservées. Ces empreintes correspondent majoritairement à des empreintes de pieds variées mais aussi de mains, doigts, talons et indéterminées. À travers l'étude morphométrique, dynamique et taphonomique des empreintes, l'objectif final est de répondre à plusieurs questions relatives à la fréquentation du réseau telles que le nombre d'individus, leurs caractéristiques biologiques, leurs activités et comportements au sein de la cavité, etc.

### **Mots clés**

Grotte, Ichnologie, Empreintes, 3D, Traces d'activité

## **Ichnology in subterranean environment. Tracks as a marker of human behaviour in caves.**

### **Abstract**

The stability of caves makes those ideal natural conservatories for the preservation of certain remains that are much more vulnerable in other contexts. This project is particularly focused on human footprints found in caves. More precisely, the subject of this article concerns the Réseau Whal, a prehistoric gallery in Fontanet cave discovered in 1972 and whose study we have been revisiting since 2018. The first half of this network is characterized by an important concentration of exceptionally well-preserved prints. These prints are mostly footprints but also handprints, fingerprints, heelprints and indeterminate prints. Through the morphometric, dynamic and taphonomic study of the prints, the aim of this research is to answer several questions related to the occupation of the network, such as the number of individuals, their biological characteristics, their activities and behaviours within the cavity, etc.

### **Keywords**

Cave, Ichnology, Prints, 3D, Traces of activity

## Introduction

**D**e par leur stabilité, les grottes constituent d'excellents conservatoires naturels assurant la pérennité de certains vestiges beaucoup plus vulnérables dans d'autres contextes. L'art pariétal est probablement le vestige le plus représentatif car le plus connu et le plus étudié. À côté de cet art, il existe cependant un panel de traces variées qui participent à la compréhension de la fréquentation humaine ou celle d'autres espèces d'une cavité. Ces traces qui peuvent être des traces de matières colorantes, des traces de frottements ou d'essuyage sur la paroi, des artefacts lithiques ou osseux, des mouchages de torche, des bris de concrétion, etc. sont des témoignages importants des différents types de comportements ou d'activités ayant pris place dans le milieu souterrain. Ces différents vestiges, dont la prise en compte globale a été principalement initiée par François Rouzaud à travers la paléopéléologie (l'étude globale de l'ensemble des traces laissées par les êtres vivants dans le monde souterrain) dans les années 1970 (Rouzaud, 1978) font désormais l'objet d'études systématiques bien qu'inégales selon la catégorie de trace. (Arias et al., 2011 ; Bégouën et al., 2009 ; Geneste, 2005 ; Jaubert et al., 2017 ; Ledoux et al., 2017 ; Medina-Alcaide et al., 2018 ; Pastoors and Weniger, 2011). Les empreintes, notre principal objet d'étude, font partie intégrante de ces vestiges et, dans des conditions adaptées, représentent une part non négligeable des vestiges identifiés en grotte. Ces dernières résultent souvent de déplacements ou de stationnements dans la cavité voire, parfois, d'actes volontaires leur donnant une dimension symbolique. Leur intérêt se constate aussi bien dans la reconstitution des comportements humains que dans celle des différents événements géomorphologiques rencontrés en grotte.

L'étude des empreintes (ou ichtnologie) en grotte s'est développée entre les années 1970 et 2000 sous l'impulsion, dans un premier temps, de Léon Pales puis de son successeur Michel Alain Garcia. Actuellement très largement étudiées en contexte de plein air, elles le sont beaucoup moins en grotte. En revanche, ces dernières années plusieurs grottes telles que Pech Merle (Lot, France) (Pastoors et al., 2017), La Bósura (Toirano, Italie) (Citton et al., 2017 ; Romano et al.,

2019), Ojo Guareña (Castille-et-León, Espagne) (Ortega et al., 2021), l'Aldène (Hérault, France) (Galant et al., 2021), Chauvet (Ardèche, France) (Garcia, 2005), La Garma (Cantabrie, Espagne), Cussac (Dordogne, France) (Ledoux, 2019 ; Ledoux et al., 2021), Bruniquel (Lot-et-Garonne, France) ou encore le réseau Wahl de la grotte de Fontanet (Ariège, France) font l'objet d'études ichtnologiques favorisées notamment par le développement des techniques non invasives comme la modélisation 3D.

Pour cet article, nous avons choisi de nous focaliser sur le réseau Wahl de la grotte de Fontanet dont la diversité et la conservation exceptionnelle de ses empreintes en font un des exemples les plus représentatifs de l'apport des empreintes dans la compréhension de l'appréhension du monde souterrain par les populations du Paléolithique. Quel était le profil des individus qui ont fréquenté le réseau ? Combien étaient-ils ? Quelles étaient leurs activités ? Quelle fonction occupait le Réseau ? L'étude morphométrique et dynamique réalisée ces quatre dernières années nous permet aujourd'hui de proposer des éléments de réponses à ces questions que nous présentons ci-dessous.

## Présentation de la grotte

La grotte de Fontanet est située en rive droite de l'Ariège, sur la commune d'Ornolac-Ussat-les-Bains (environ 6 km en amont de Tarascon-sur-Ariège) et s'ouvre dans le massif du Quié de Sinsat, à 588 m d'altitude. Son réseau souterrain, qui s'étend sur environ 3 km, comporte plusieurs galeries distribuées sur différents étages. Découverte en 1972 par Luc Wahl, sa galerie ornée, le « réseau Wahl » est aussi le seul témoin du passage des Hommes à la Préhistoire dans la cavité (Clottes et al., 1984). L'entrée actuelle de ce réseau d'une longueur de 263 m s'élève à 8 m au-dessus du réseau inférieur et est située à l'opposé de l'entrée Paléolithique scellée par un éboulis (Figure 1). Chronologiquement, l'occupation du réseau se situerait durant le Magdalénien récent (Clottes and Simonnet, 1972). Les premières études du réseau ont lieu très rapidement après sa découverte dans les années 1970 sous la direction de Léon Pales puis Jean Clottes et s'intéressent à trois principales catégories de vestiges : l'art pariétal (Vialou, 1986) les vestiges relatifs aux activités domestiques (foyers, vestiges fauniques et lithiques, etc.) et les empreintes. La galerie fut,

en outre, décrite d'un point de vue paléospéléologique par François Rouzaud en 1978 (Rouzaud, 1978). Peu de ces travaux sont, en revanche aujourd'hui publiés et bien que quelques études ponctuelles aient été réalisées par la suite (Le Guillou et al., 2017 ; Pastoors et al., 2015), les incursions dans la cavité postérieures à ces travaux ont toujours été exceptionnelles. Depuis 2018, nous avons repris l'étude du réseau du point de vue des empreintes. Les recherches actuelles se focalisent sur le secteur entre la galerie Méroc et le Puits, dans lequel se trouve la plus haute concentration d'empreintes de la cavité (Ledoux, 2019).

## Méthodologie

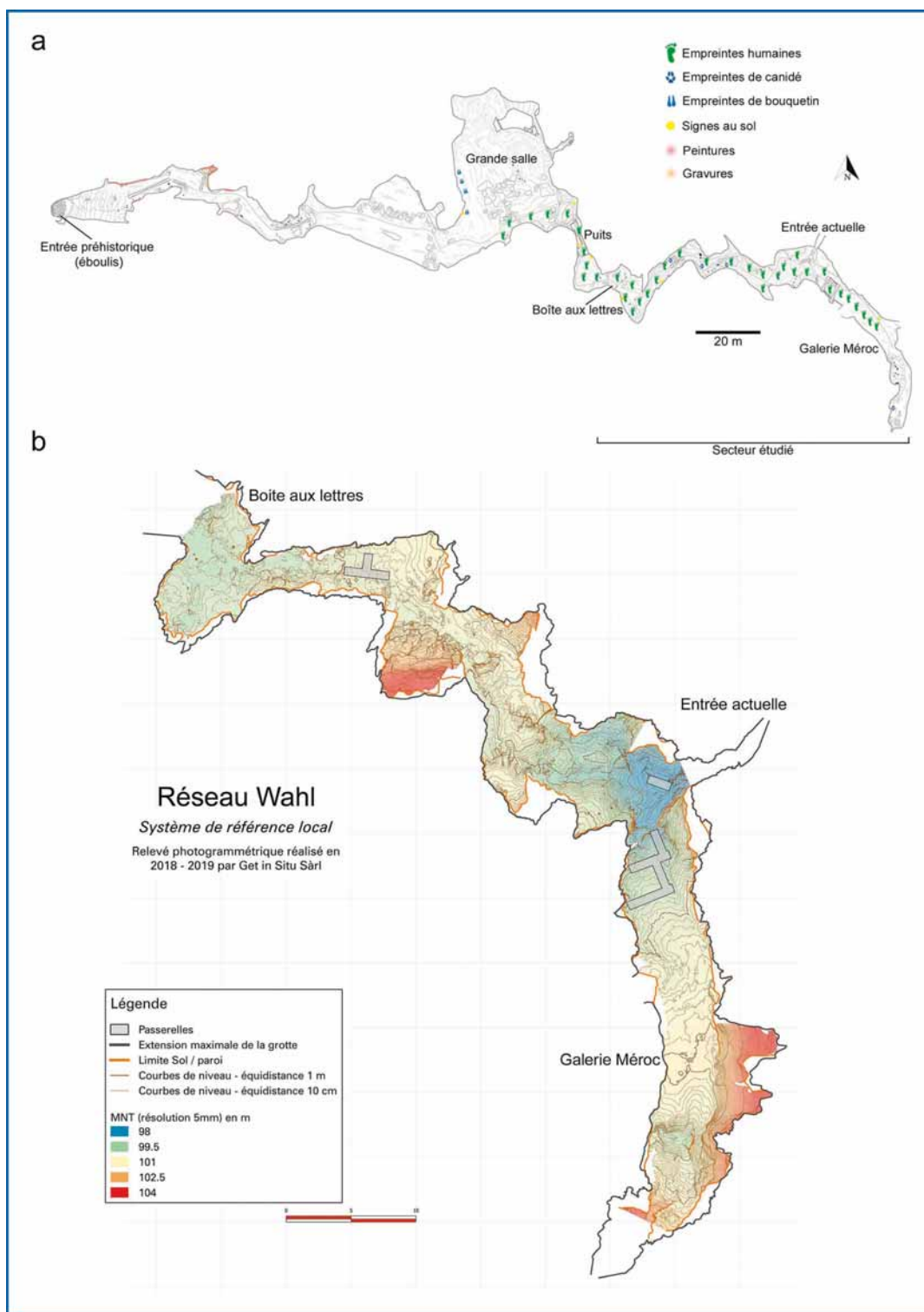
### In situ

Vestiges très vulnérables de par leur nature, les empreintes étant indissociables de leur contexte de formation et de conservation, la méthodologie de relevé et les outils d'étude adoptés doivent donc être les moins invasifs possibles. Notre méthodologie est fortement imprégnée de celle de la paléospéléologie et consiste en une prospection des secteurs accessibles depuis le cheminement actuel et un inventaire des empreintes repérées. Chaque empreinte inventoriée est ensuite numérotée, décrite et mesurée *in situ* si elle est directement accessible. En l'absence de modèle précis et complet existant dans la littérature, nous avons établi une série de mesures linéaires autour de l'empreinte, inspirées de différents travaux (Bennett and Morse, 2014) et tentant de représenter au mieux la morphologie du pied (Ledoux, 2019). Au total, et quand cela était possible, 7 mesures ont été prises sur l'empreinte de pied nu. La même logique a été suivie pour les empreintes de mains avec la prise de 3 mesures. Lorsque tous les éléments d'une empreinte ne sont pas présents ou lorsqu'il s'agit d'empreintes indéterminées, les mesures prises sont généralement la longueur et la largeur. Les empreintes sont ensuite photographiées et enregistrées en 3D par photogrammétrie (étape réalisée par la société Get In Situ). Nous disposons actuellement du modèle 3D complet du secteur étudié et d'un enregistrement à haute résolution des zones à empreintes. L'utilisation de la 3D nous permet donc d'obtenir une vision globale des empreintes de la cavité ainsi que leur géoréférencement au sein de celle-ci et favorisant le travail *ex situ*. Des prélèvements ont aussi été réalisés afin de caractériser le sédiment de formation des empreintes.

### Ex situ

Après l'enregistrement sur le terrain, l'étude de notre échantillon d'empreintes est réalisée à partir des modèles 3D. Le logiciel libre CloudCompare (version 2.8.1) permet notamment de créer des cartes de profondeurs et d'isolignes qui rendent compte de la topographie des empreintes. Certaines empreintes non accessibles sur le terrain peuvent également être mesurées par cette technique. Les différents modèles 3D des plages sont analysés sous différents éclairages afin de confirmer ou d'infirmer certaines interprétations effectuées sur le terrain. En effet, grâce à ce moyen, nous avons parfois découvert des empreintes que nous n'avions pas observées sur le terrain. Nous avons également pu en réinterpréter d'autres. Les empreintes sont en outre relevées sur les modèles et mises en relation lorsque cela est possible. Le nombre important d'empreintes et leur superposition rend difficile la mise en évidence de pistes et la discrimination des différents auteur/es des empreintes.

Afin de préciser nos observations, nous avons donc réalisé une analyse de morphométrie géométrique 3D sur les empreintes les mieux préservées pour tenter de discriminer certains morphotypes. Cette analyse reposant sur la position spatiale de points-repères homologues, il a donc fallu déterminer les points que nous utiliserions à partir de notre échantillon en amont de l'analyse. Dans la mesure où, pour l'instant, seules 5 empreintes sont complètes (c'est-à-dire présentant toute la plante et l'ensemble des orteils individualisables), nous nous sommes focalisés sur les empreintes présentant au moins la partie distale de la plante et les orteils. Dix empreintes ont ainsi été sélectionnées. Sur chacune de ces empreintes, 14 points repères anatomiques ont été posés à partir du logiciel IDAV Landmark (v3.0, Wiley et al., 2005). De la même manière, 108 pseudo-points de courbes ont également été posés et 47 pseudo-points de surface ont été projetés à partir d'un modèle de base sur chaque empreinte. Ces points ont ensuite été glissés à l'aide du package *Morpho* fourni par le logiciel R pour être tous considérés comme homologues (voir Gunz & Mitteroecker 2013 pour une description détaillée du processus). Une analyse Procruste qui consiste en la translation, la mise à l'échelle et la rotation de toutes les empreintes a



**Figure 1** : Topographie du Réseau Wahl. a : topographie du réseau entier d'après Rouzaud 1978, b : topographie du secteur étudié réalisée par Get In Situ.

ensuite été réalisée, puis une Analyse en Composante Principale (ACP) a été calculée sur les coordonnées des points à l'aide du package « *ape* ». Afin de visualiser la variation de forme le long des axes de l'ACP, la forme moyenne théorique de l'échantillon a été calculée à l'aide d'une déformation TPS (Thin Plate Spline). Cette forme théorique a ensuite permis de calculer les formes théoriques associées aux valeurs minimales et maximales des 2 premiers axes de l'ACP.

Enfin, nous avons réalisé des essais de stature sur les empreintes complètes à partir de différentes méthodes proposées par la littérature et basées sur la longueur du pied (Dingwall et al., 2013 ; Topinard, 1876 ; Webb et al., 2006).

## Résultats

### Inventaire des empreintes

Le réseau Wahl est exceptionnel de par sa conservation remarquable mais aussi par la multitude d'empreintes variées qu'il renferme. Au cours de ces 4 dernières années, plus de 300 empreintes ont été inventoriées dans la partie du réseau étudiée. Il s'agit principalement d'empreintes humaines, mais on note également la présence de quelques empreintes de canidé et de bouquetin. Les empreintes les mieux préservées et les plus nombreuses sont situées au niveau de la galerie Méroc et ont été réalisées dans un sédiment argilo-limoneux particulièrement propice à l'impression de détails. La formation et la conservation des empreintes est plus contrastée entre la galerie Méroc et la Boite aux Lettres, avec de nombreuses zones plus ou moins indurées par des formations de calcite. La majorité des empreintes sont des empreintes de pied ou des portions de pied, mais la présence plus inhabituelle d'empreintes de mains complètes ou incomplètes y est aussi attestée. Des empreintes parfois indéterminées issues d'autres sections de corps sont également présentes. Certaines empreintes dont nous n'avons pas encore pu déterminer l'origine ont été regroupées sous le terme de « glissades ». Celles-ci se retrouvent dans tous les secteurs à empreintes. De forme générale rectangulaire, elles se caractérisent par des sillons parallèles de morphologie et de dimension identiques. Ces derniers évoquant fortement des impressions de poils, nous envisageons l'hypothèse d'empreintes de vêtements ou d'objets en peau. La prospection a aussi permis de mettre en évidence des réseaux de fissures dans les secteurs où le sédiment n'était

pas propice à la formation d'empreintes. Ces formations inédites résultent du craquement de la calcite dans des zones où cette dernière était trop fine pour résister à la pression exercée lors du passage d'un individu. Enfin, notons qu'à côté de ces traces involontaires résultant des déplacements humains au sein de la cavité, il existe une gamme d'empreintes volontaires telles que plusieurs signes réalisés par appuis de doigts à même le sol, des traces de prélèvement de sédiment, ou encore des boulettes.

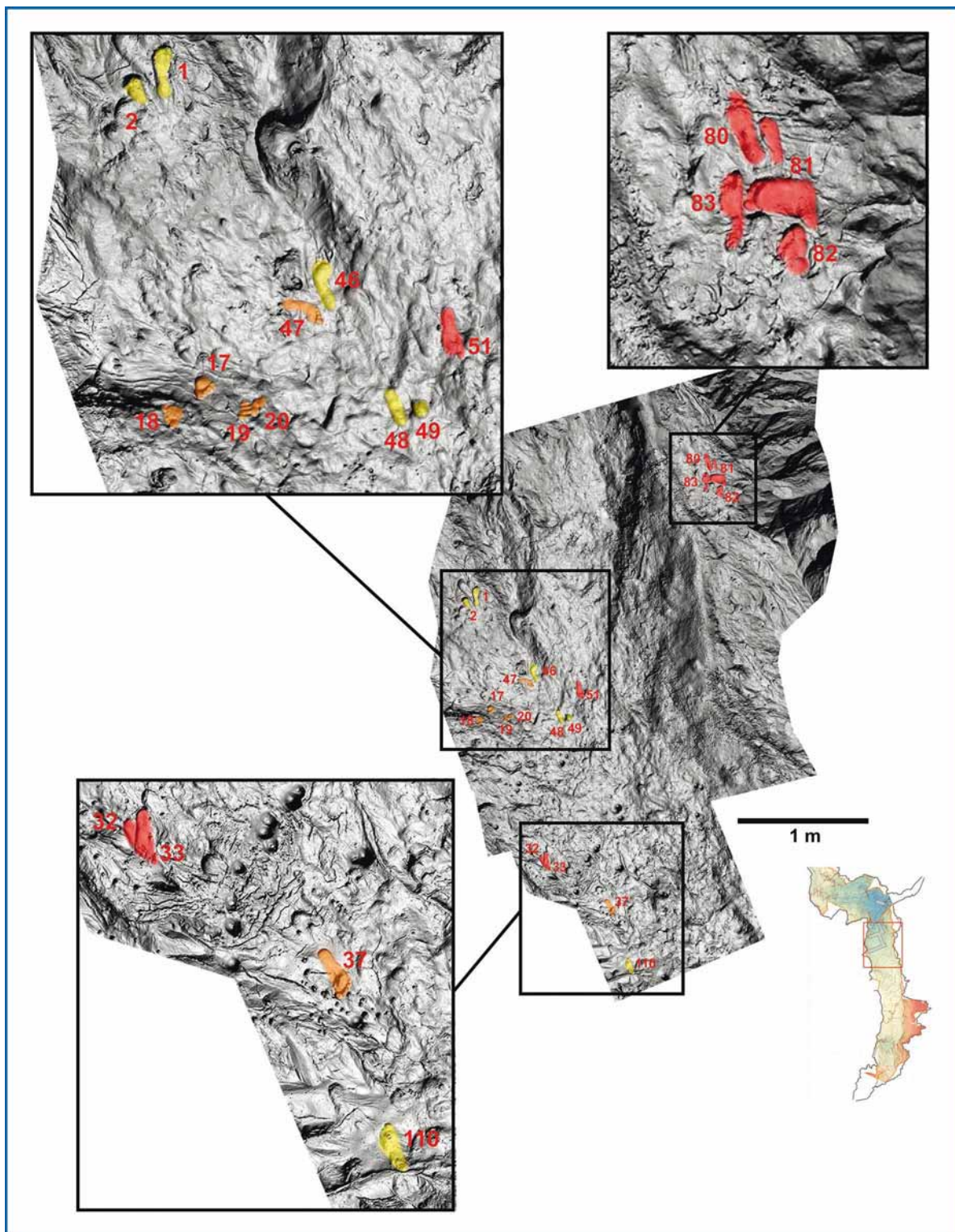
### Nombre d'individus

#### Observation visuelle

Le moyen le plus efficace pour identifier le nombre d'individus présents dans une grotte à partir des empreintes est la présence de pistes bien définies et/ou d'empreintes aux caractéristiques biométriques et morphologiques bien différentes. Malgré la quantité remarquable d'empreintes dans le réseau Wahl et le rendu exceptionnel de certaines d'entre elles, il nous est actuellement difficile de les rattacher à des individus spécifiques. Certaines empreintes ont néanmoins pu être associées et reliées à un même individu mais le suivi de la progression de chaque individu dans la cavité est impossible. En effet, la première partie de la Galerie Méroc, qui est pourtant la plus riche en empreintes est aussi celle qui présente le plus de superpositions. En résulte des empreintes souvent incomplètes, déformées par la dynamique du mouvement et qui sont donc difficiles à mettre en relation.

De par leur agencement, certaines empreintes ont néanmoins pu être associées et attribuées à un même individu (**Figure 2**) :

- Les empreintes Fon-17, Fon-18 et Fon-19 qui correspondent successivement à deux empreintes de partie distale de pied et une empreinte de dos de main semblent découler d'une même position accroupie ce qui est cohérent avec la hauteur sous plafond à cet endroit (1 m ou moins).
- Les empreintes Fon-48 et Fon-49, côte à côte et de gabarit similaire, semblent témoigner d'un stationnement debout.
- Les empreintes Fon-80, Fon-81, Fon-82 et Fon-83 semblent également appartenir à un même individu, avec Fon-80 et Fon-83 qui se suivent (pied droit et pied gauche, piste ?) et Fon-81 et Fon-82 qui se suivent (pied gauche et pied droit très dynamiques, mouvement de retour).



**Figure 2 :** Essai d'association d'empreintes sur la plage principale de la galerie Méroc. Orange : morphotype 1 ; rouge : morphotype 2 ; jaune : empreintes non rattachées à un morphotype.

- Les empreintes partielles Fon-137 et Fon-138 accolées qui correspondent à un pied droit à un pied gauche.
- Les empreintes Fon-165 et Fon-182 qui correspondent à deux pieds droits (probablement le même pied).

Outre ces associations, nous avons observé certaines caractéristiques notamment au niveau des orteils qui semblent indiquer au moins deux morphotypes distincts :

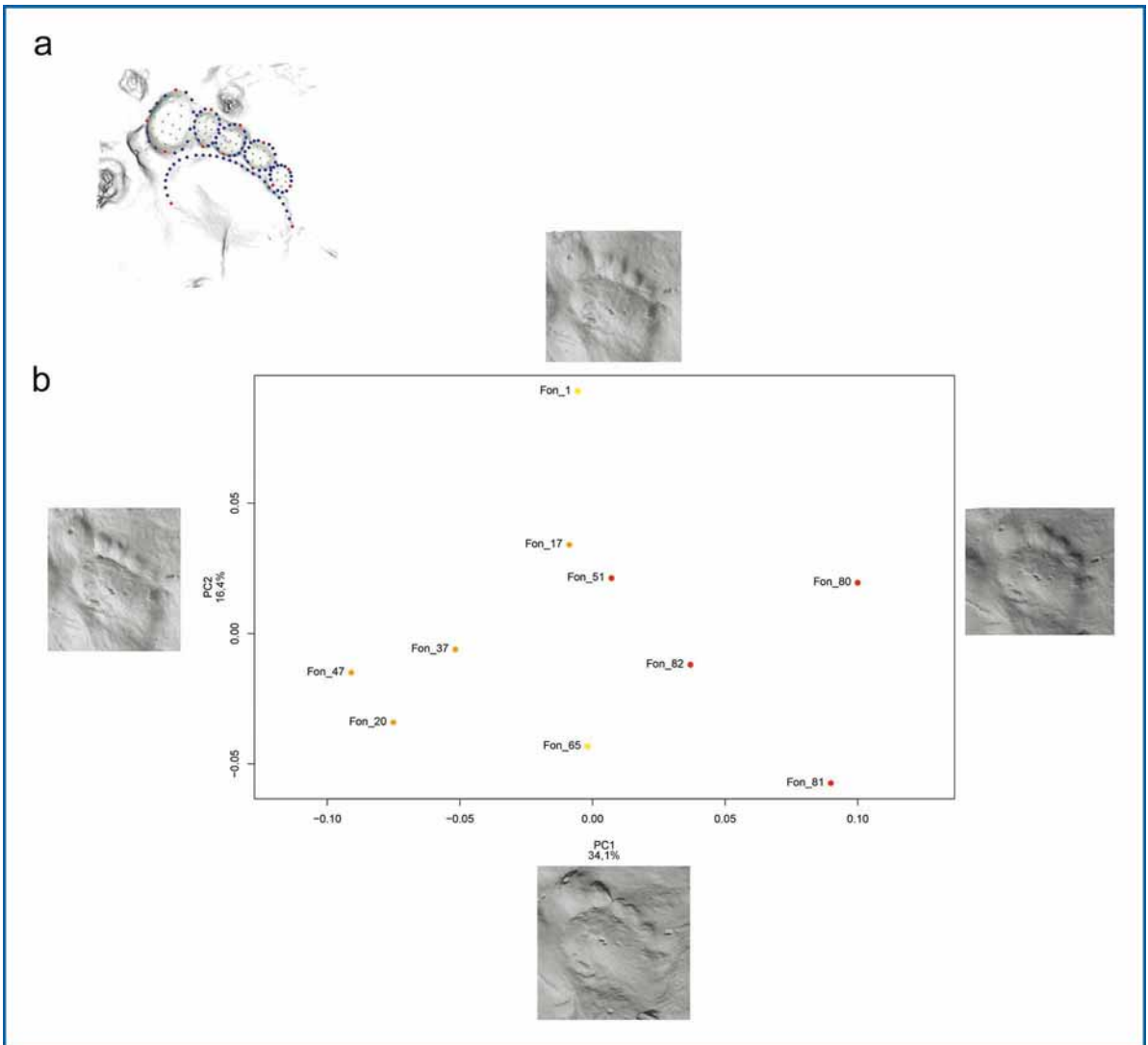
- Le premier se caractérise par un hallux un peu allongé et un petit orteil souvent superficiel, il

correspondrait aux empreintes Fon-17, Fon-20, Fon-37 et Fon-47 (en orange sur la figure 2).

- Le second par une partie distale relativement arrondie avec un deuxième orteil placé un peu plus haut que les orteils suivants et correspondant aux empreintes Fon-33, Fon-51, Fon-80, Fon-81 et Fon-82 (en rouge sur la figure 2).

#### Morphométrie géométrique

Le résultat de l'ACP (**Figure 3**) montre que l'axe 1 (34,1 % de la variance) est porté par une opposition entre les empreintes rouges et



**Figure 3** : a : Localisation des différents points repères : en rouge les points repères anatomiques, en bleu les points repère de courbe et en vert les points repère de surface, b : ACP réalisée sur les données morphométriques des empreintes, avec visualisation des formes théoriques associées aux valeurs minimales et maximales de chaque axe. Les deux premiers axes expliquent 50,5 % de la variance.

oranges. Les empreintes Fon-80, Fon-81 et Fon-82 sont regroupées entre elles et un peu séparées du reste dans la partie positive de l'axe 1 comme les empreintes Fon-20, Fon-36 et Fon-47 dans la partie négative de l'axe 1. Les empreintes Fon-17 et Fon-51 sont les deux qui semblent les plus proches malgré leur position restant respectivement en partie négative et positive. Sur l'axe 2 (16,4 % de la variance), il n'y a plus de séparation entre empreintes rouges et oranges mais une séparation entre Fon-1 dans la partie positive et Fon-65 dans la partie négative (empreintes jaunes n'appartenant pas aux deux morphotypes précédemment décrits). En revanche, à la différence de Fon-1, Fon-65 rentre dans la variabilité des autres empreintes. Cela peut s'expliquer par le fait que Fon-1 montre une légère déformation.

Les résultats de l'analyse de morphométrie géométrique sont cohérents avec nos observations visuelles et semblent montrer les mêmes caractéristiques morphologiques observées visuellement.

La mise en relation des observations morphologiques visuelles, de l'analyse de morphométrie géométrique, couplé à l'agencement des empreintes notamment au niveau de la plage principale de la galerie Méroc, a permis de mettre en évidence l'existence d'au moins deux individus. Le maximum est cependant pour l'instant

plus difficile à établir. Les empreintes inventoriées ne semblent néanmoins pas indiquer la présence de nombreuses personnes dans le fond de la cavité. La plage principale de la galerie Méroc est la seule zone sur laquelle on constate des superpositions d'empreintes qui pourraient tout à fait résulter de la présence et/ou du passage de deux ou trois individus dans ce secteur. Les autres secteurs à empreintes ne font pas état de superpositions ou de pistes parallèles ce qui penche aussi en faveur d'un nombre peu élevé de personnes dans ce secteur. Cette interprétation doit cependant être nuancée du fait du manque de toute l'information ichnologique relative au cheminement le plus logique et aisé dans cette partie (la plupart du temps, possibilité de cheminer en marche normal et debout), à savoir celui que nous empruntons également aujourd'hui et qui a inévitablement disparu à la suite de la découverte du réseau.

#### Les auteur.es

Les essais de statures réalisés sur les empreintes complètes de notre échantillon correspondent pour la plupart à de petits gabarits qui pourraient correspondre à ceux d'enfants, en particulier en ce qui concerne les statures estimées entre environ 130 cm et 150 cm. Les autres, minoritaires, se situent autour de 160 cm (Tableau 1).

**Tableau 1 : Stature déterminées sur les empreintes de pied complètes (cm).**

N°	Longueur empreintes	(Topinard, 1876)	(Dingwall et al., 2013)	(Webb et al., 2006)
Fon-1	21,3	142	153,7	140,3 ± 10,5
Fon-2	20,4	136	150,3	134,3 ± 10,1
Fon-33	19,2	128	145,9	126,4 ± 9,5
Fon-37	21,2	141,3	153,3	139,6 ± 10,4
Fon-40	19,9	132,7	148,5	131 ± 9,9
Fon-41	22,6	150,7	158,5	148,8 ± 11,2
Fon-46	22,8	152	159,3	150,1 ± 11,3
Fon-48	17,1	114	138,1	112,6 ± 8,5
Fon-51	23,5	156,7	161,9	154,7 ± 11,6
Fon-52	21,3	142	153,7	140,2 ± 10,5
Fon-55	19	126,7	145,1	125,1 ± 9,4
Fon-63	23,8	158,7	163	156,7 ± 11,8



N°	Longueur empreintes	(Topinard, 1876)	(Dingwall et al., 2013)	(Webb et al., 2006)
Fon-64	24,5	163,3	165,6	161,3 ± 12,1
Fon-65	29,5	196,7	184,2	194,2 ± 14,6
Fon-80	21	140	152,59	138,2 ± 10,4
Fon-83	21,5	143,3	154,45	141,6 ± 10,6
Fon-110	19,8	132	148,126	130,4 ± 9,8

### Activités/comportements

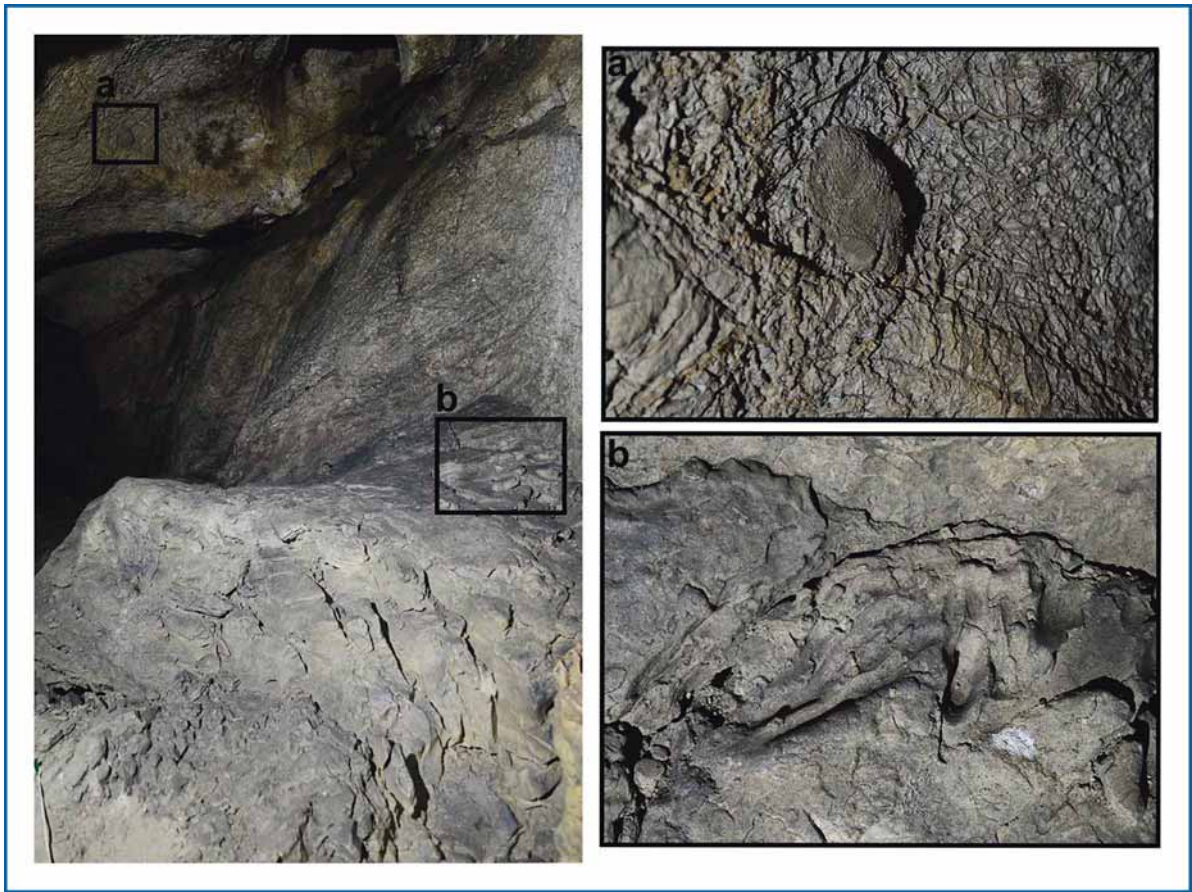
L'ensemble des vestiges présents dans le réseau Wahl témoigne d'une exploration globale de ce dernier par les magdalénien.es. Leur installation à proximité du porche d'entrée ne les a pas empêchés de s'enfoncer plus loin dans le réseau jusqu'au bout de ce dernier. Le secteur entre l'entrée paléolithique et le Puits, marqué par de nombreux vestiges archéologiques et de l'art en paroi témoignant de leur occupation, laisse place après le Puits, et jusqu'à la fin de la galerie Méroc à un secteur aux vestiges matériels très peu abondants et à une fréquentation humaine marquée par la présence d'empreintes et traces à même le sol. Ces traces montrent une fréquentation exhaustive du réseau même dans les zones parfois difficiles d'accès, à la topographie risquée voire dangereuses comme le Puits. Les empreintes reflètent un dynamisme important rendu par leur variété, leurs orientations diverses, leurs superpositions (notamment au niveau de la plage principale de la galerie Méroc) et leurs localisations.

Ces empreintes résultant de multiples positions et modes de locomotions témoignent à la fois de déplacement au sein du réseau et de stationnements dont la durée nous échappe. Ces derniers sont en effet mis en évidence par les superpositions sur la plage principale de la galerie Méroc ou dans des zones restreintes, mais aussi par les nombreuses empreintes témoignant de positions basses (empreintes de mains, de partie distale de pied, de possibles genoux ou coudes) ou les signes au sol réalisés par appuis de doigts. Bien que nous ne connaissions pas la durée des stationnements dans cette partie de la cavité, cela est cohérent

**“Ces empreintes résultant de multiples positions et modes de locomotions témoignent à la fois de déplacement au sein du réseau et de stationnements dont la durée nous échappe.”**

avec le stationnement dans la zone d'occupation de l'entrée, d'autant plus que la progression dans le réseau jusqu'au fond est relativement aisée (excepté peut-être au niveau du Puits) et rapide. Les empreintes de mains et pieds associées peuvent, en effet, toutes être le résultat de positions accroupies (positions d'observation ?), non pas pour cheminer mais pour stationner. Elles se trouvent soit proches de la paroi et sous de basses hauteurs sous plafond, soit dans des zones étroites et basses. L'un des exemples les plus significatifs de stationnement est probablement un petit talus situé dans la galerie Méroc et issu d'un ancien remplissage argilo-limoneux d'environ 1,50 m sur 90 cm. Bien qu'entre le haut du talus et le plafond il n'y ai pas plus d'un mètre, une multitude de traces ont été observées sur sa surface. Cet espace réduit présente, en effet, plusieurs traces de doigts résultant de prélèvement de sédiment dont le but semble avoir été la réalisation de boulettes que nous retrouvons à la fois sur le talus et sur le plafond au-dessus de ce dernier. À quelques mètres

des boulettes écrasées au sol sont également observées ainsi que dans d'autres secteurs du réseau. Plus surprenant, plusieurs empreintes de pied sont également attestées sur cette surface sur laquelle il est impossible de tenir debout pour une personne de plus d'un mètre. L'étroitesse de la surface n'autorise pas non plus *a priori* le stationnement de deux personnes en même temps à moins qu'il s'agisse de petits gabarits. Ces témoignages sont en outre cohérents avec la présence de jeunes individus dans la grotte. D'ailleurs, les empreintes dont il est question ici sont toutes de petites dimensions. La présence d'en-



**Figure 4** : Vue générale du talus à boulettes. a : boulette collée au plafond, b : traces de doigts, extraction de sédiment.

fants dans le milieu souterrain est déjà attestée dans plusieurs grottes et cela pour toutes les périodes (Bégouën et al., 2009 ; Galant et al., 2021 ; Garcia, 2005 ; Garcia et al., 1990 ; Pastoors et al., 2017 ; Romano et al., 2019). Bien que leur rôle dans le milieu souterrain n'ait pas été défini, ils semblent aussi bien avoir eu des activités et comportements ordinaires qu'avoir participé à des activités relevant du symbolique, la frontière entre les deux étant parfois difficile à établir. Dans le réseau Wahl, les stationnements semblent résulter d'activités possiblement ludiques et pour certaines impliquant de l'argile, la manipulation d'argile étant aussi une activité référencée en grotte (Bégouën et al., 2009 ; Garcia and Duda, 1983 ; Romano et al., 2019).

### Conclusion

Les conditions de conservation remarquables du Réseau Wahl en font un témoignage ichnolo-

gique rare pour le paléolithique. Les vestiges archéologiques étant très peu nombreux dans la moitié la plus profonde du réseau, les empreintes et leur conservation exceptionnelle sont un élément précieux afin d'appréhender la fréquentation humaine de la grotte. Après ces 4 années de travail dans la grotte nous pouvons aujourd'hui ébaucher le profil des individus qui il y a 15000 ans ont foulé le sol du Réseau Wahl mais aussi en apprendre plus sur la fonction de ce site resté quasiment intact. Ainsi, les différentes manifestations humaines rencontrées dans la cavité semblent relever aussi bien de la sphère domestique que de la sphère symbolique. Elles sont le fait, entre autres, de jeunes individus qui ont exploré l'entièreté du réseau mais y ont aussi stationné. Plus largement, ses similarités avec des grottes telles que celles de La Garma ou de La Bâsura à la chronologie proche, nous permettent de mettre en évidence des modèles de comporte-

ments humains au sein du milieu souterrain. Hormis la poursuite de l'étude ichnologique, la prochaine étape est de dater cette partie du réseau afin de préciser le contexte chronologique des empreintes et plus généralement de l'ensemble du réseau.

### Remerciements

Je remercie la Fondation Fyssen qui m'a permis de poursuivre mes recherches en ichnologie et la marraine de ce projet Marie Soressi. Merci également à l'université de Cantabrie et l'IIIPC pour son accueil et à Pablo Arias d'avoir bien voulu m'accompagner durant ces deux années. Merci à toutes et tous les collaboratrices et collaborateurs des divers projets dans lesquels mon travail s'intègre. Cet article portant essentiellement sur le réseau Wahl de Fontanet, je tiens à remercier la DRAC Occitanie d'avoir autorisé les opérations dans la grotte et la Fondation Eugène Fleischmann pour son soutien. Je remercie également particulièrement Luc Wahl, son inventeur, sans qui ce travail n'aurait été possible et l'équipe qui a accepté de mener cette étude avec moi : Marion Corbé, Xavier Muth, Céline Puig, Nathalie Fourment et Céline Pallier. Même si cet article est signé de mon seul nom, il s'agit des résultats d'un travail collectif donc merci à toutes et tous.

### Bibliographie

- Arias, P., Laval, E., Menu, M., Sainz, C.G., Ontañón, R., 2011. Les colorants dans l'art pariétal et mobilier paléolithique de La Garma (Cantabrie, Espagne). *L'Anthropologie, Art préhistorique* 115, 425–445. <https://doi.org/10.1016/j.anthro.2011.05.005>
- Bégouën, R., Fritz, C., Tosello, G., Clottes, J., Pastoors, A., Faist, F., 2009. Le Sanctuaire secret des bisons. Il y a 14000 ans, dans la caverne du Tuc d'Audoubert, Editons d'art Somogy. ed.
- Bennett, M.R., Morse, S.A., 2014. *Human Footprints: Fossilised Locomotion?* Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08572-2>
- Citton, P., Romano, M., Salvador, I., Avanzini, M., 2017. Reviewing the upper Pleistocene human footprints from the 'Sala dei Misteri' in the Grotta della Bàsura (Toirano, northern Italy) cave: An integrated morphometric and morpho-classificatory approach. *Quaternary Science Reviews* 169, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2017.05.016>
- Clottes, J., Rouzaud, F., Wahl, L., 1984. Grotte de Fontanet., in: *L'art Des Cavernes. Atlas Des Grottes Ornées Paléolithiques Françaises*. Paris, pp. 433–437.
- Clottes, J., Simonnet, R., 1972. Le réseau René Clastres de la caverne de Niaux (Ariège). *Bulletin de la Société préhistorique française. Études et travaux* 293–323.
- Dingwall, H.L., Hatala, K.G., Wunderlich, R.E., Richmond, B.G., 2013. Hominin stature, body mass, and walking speed estimates based on 1.5 million-year-old fossil footprints at Ileret, Kenya. *Journal of Human Evolution* 64, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2013.02.004>
- Galant, P., Ambert, P., Colomer, A., 2021. Prehistoric Speleological Exploration in the Cave of Aldène in Cesseras (Hérault, France): Human Footprint Paths and Lighting Management, in: Pastoors, A., Lenssen-Erz, T. (Eds.), *Reading Prehistoric Human Tracks: Methods & Material*. Springer International Publishing, Cham, pp. 277–293. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6_15)
- Garcia, M.-A., 2005. Ichnologie générale de la grotte Chauvet. *Bulletin de la Société préhistorique française* 102, 103–108. <https://doi.org/10.3406/bspf.2005.13341>
- Garcia, M.-A., Duday, H., 1983. Grotte de Foissac (Aveyron) A propos d'une découverte récente ou de l'ichnologie comme mode d'approche des structures préhistoriques en grotte. *Bulletin de la Société préhistorique française* 80, 184–187. <https://doi.org/10.3406/bspf.1983.5441>
- Garcia, M.-A., Duday, H., Courtaud, P., 1990. Les empreintes du Réseau Clastres. *Préhistoire Ariégeoise* 45, 167–174.
- Geneste, J.-M., 2005. Recherches pluridisciplinaires dans la grotte Chauvet, in : *Société Préhistorique Française. Presented at the journées SPF, Lyon, 11-12 octobre 2003*.
- Jaubert, J., Genty, D., Valladas, H., Camus, H., Courtaud, P., Ferrier, C., Feruglio, V., Fourment, N., Konik, S., Villotte, S., Bourdier, C., Costamagno, S., Delluc, M., Goutas, N., Katnecker, É., Klaric, L., Langlais, M., Ledoux, L., Maksud, F., O'Farrell, M., Mallye, J.-B., Pierre, M., Pons-Branchu, E., Régner, É., Théry-Parisot, I., 2017. The chronology of human and animal presence in the decorated and sepulchral cave of Cussac

(France). *Quaternary International* 432, 5–24. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.01.052>

- Le Guillou, Y., Lecomte-Ferriz, N., Wahl, L., 2017. Un signe pariétal paléolithique inédit dans la grotte de Fontanet (Ariège-France). *Bulletin Préhistoire du Sud-Ouest* 159–166.

- Ledoux, L., 2019. L'ichnologie préhistorique et les traces d'activités au sein des cavités ornées. Les grottes de Fontanet (Ariège) et de Cussac (Dordogne). Université de Bordeaux.

- Ledoux, L., Berillon, G., Fourment, N., Jaubert, J., 2021. Reproduce to Understand: Experimental Approach Based on Footprints in Cussac Cave (Southwestern France), in: Pastoors, A., Lenssen-Erz, T. (Eds.), *Reading Prehistoric Human Tracks: Methods & Material*. Springer International Publishing, Cham, pp. 67–89. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6_4)

- Ledoux, L., Fourment, N., Maksud, F., Deluc, M., Costamagno, S., Goutas, N., Klaric, L., Laroulandie, V., Salomon, H., Jaubert, J., 2017. Traces of human and animal activity (TrAcs) in Cussac Cave (Le Buisson-de-Cadouin, Dordogne, France): Preliminary results and perspectives. *Quaternary International*. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.06.002>

- Medina-Alcaide, M.Á., Garate-Maidagan, D., Ruiz-Redondo, A., Sanchidrián-Torti, J.L., 2018. Beyond art: The internal archaeological context in Paleolithic decorated caves. *Journal of Anthropological Archaeology* 49, 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.jaa.2017.12.005>

- Ortega, A.I., Ruiz, F., Martín, M.A., Benito-Calvo, A., Vidal, M., Bermejo, L., Karampaglidis, T., 2021. Prehistoric Human Tracks in Ojo Guareña Cave System (Burgos, Spain): The Sala and Galerías de las Huellas, in: Pastoors, A., Lenssen-Erz, T. (Eds.), *Reading Prehistoric Human Tracks: Methods & Material*. Springer International Publishing, Cham, pp. 317–342. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60406-6_17)

- Pastoors, A., Lenssen-Erz, T., Breuckmann, B., Ciquae, T., Kxunta, U., Rieke-Zapp, D., Thao, T., 2017. Experience based reading of Pleistocene human footprints in Pech-Merle. *Quaternary International* 430, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2016.02.056>

- Pastoors, A., Lenssen-Erz, T., Ciquae, T., Kxunta, U., Thao, T., Bégouën, R., Bieseke, M., Clottes, J., 2015. Tracking in Caves: Experience

Based Reading of Pleistocene Human Footprints in French Caves. *Cambridge Archaeological Journal* 25, 551–564. <https://doi.org/10.1017/S0959774315000050>

- Pastoors, A., Weniger, G.-C., 2011. Cave Art in Context: Methods for the Analysis of the Spatial Organization of Cave Sites. *Journal of Archaeological Research* 19, 377–400.

- Romano, M., Clifton, P., Salvador, I., Arobba, D., Rellini, I., Firpo, M., Negrino, F., Zunino, M., Starnini, E., Avanzini, M., 2019. A multidisciplinary approach to a unique Palaeolithic human ichnological record from Italy (Bàsura Cave). *bioRxiv* 529404. <https://doi.org/10.1101/529404>

- Rouzaud, F., 1978. La Paléospéléologie: l'homme et le milieu souterrain pyrénéen au Paléolithique supérieur. École des hautes études en sciences sociales, Toulouse, France.

- Topinard, P., 1876. *L'Anthropologie*. C. Benwald, Paris, France.

- Vialou, D., 1986. *L'Art des grottes en Ariège magdalénienne*, Supplément à « Gallia préhistorique ». Ed. du Centre national de la recherche scientifique, Paris.

- Webb, S., Cupper, M.L., Robins, R., 2006. Pleistocene human footprints from the Willandra Lakes, southeastern Australia. *Journal of Human Evolution* 50, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2005.10.002>

## Introduction

**D**ue to their stability, caves are excellent natural conservatories ensuring the preservation of certain remains that are much more vulnerable in other contexts. Cave art is probably the most representative because it is the best known and most studied. In addition to this art, however, there is a wide range of traces that contribute to the understanding of human or other species' occupation of a cave. These traces, which may be traces of colouring materials, traces of rubbing or wiping on the wall, lithic or bone artefacts, torch marks, broken concretions, etc., are important evidence of the different types of behaviour or activities that took place in the subterranean environment. These different remains, whose global consideration was mainly initiated by François Rouzaud through

palaeospeleology (the global study of all traces left by living beings in the subterranean environment) in the 1970s (Rouzaud, 1978), are now the subject of systematic studies, which vary according to the category of trace (Arias et al., 2011; Bégouën et al., 2009; Geneste, 2005; Jaubert et al., 2017; Ledoux et al., 2017; Medina-Alcaide et al., 2018; Pastoors and Weniger, 2011). The prints, our main object of study, are an integral part of these remains and, under suitable conditions, represent a significant proportion of the remains identified in caves. They often are the result of movements or stays in the cave, or even, sometimes, of voluntary acts giving them a symbolic dimension. Their relevance can be seen both in the reconstruction of human behaviour and in the reconstruction of the various geomorphological events encountered in the cave.

The study of prints (or ichnology) in caves developed between the 1970s and 2000 under the influence of Léon Pales and his successor Michel Alain Garcia. Currently, they are widely studied in open-air contexts, but much more rarely in caves. However, in recent years several caves such as Pech Merle (Lot, France) (Pastoors et al., 2017), La Bâsura (Toirano, Italy) (Citton et al., 2017; Romano et al., 2019), Ojo Guareña (Castille-et-León, Spain) (Ortega et al., 2021), l'Aldène (Hérault, France) (Galant et al., 2021), Chauvet (Ardèche, France) (Garcia, 2005), La Garma (Cantabrie, Spain), Cussac (Dordogne, France) (Ledoux, 2019; Ledoux et al., 2021), Bruniquel (Lot-et-Garonne, France) as well as the Réseau Wahl of Fontanet cave (Ariège, France) have been the subject of ichnological studies favoured in particular by the development of non-invasive techniques such as 3D modelling.

For this article, we have chosen to focus on the Réseau Wahl in the Fontanet cave, as the diversity and exceptional conservation of its prints make it one of the most representative examples of the contribution of prints to the understanding of Palaeolithic populations' perception of the subterranean environment. What was the profile of the individuals who frequented the network? How many were there? What were their activities? What was the function of the network? The morphometric and dynamic study carried out over the last four years has allowed us to propose some answers to these questions, which we present below.

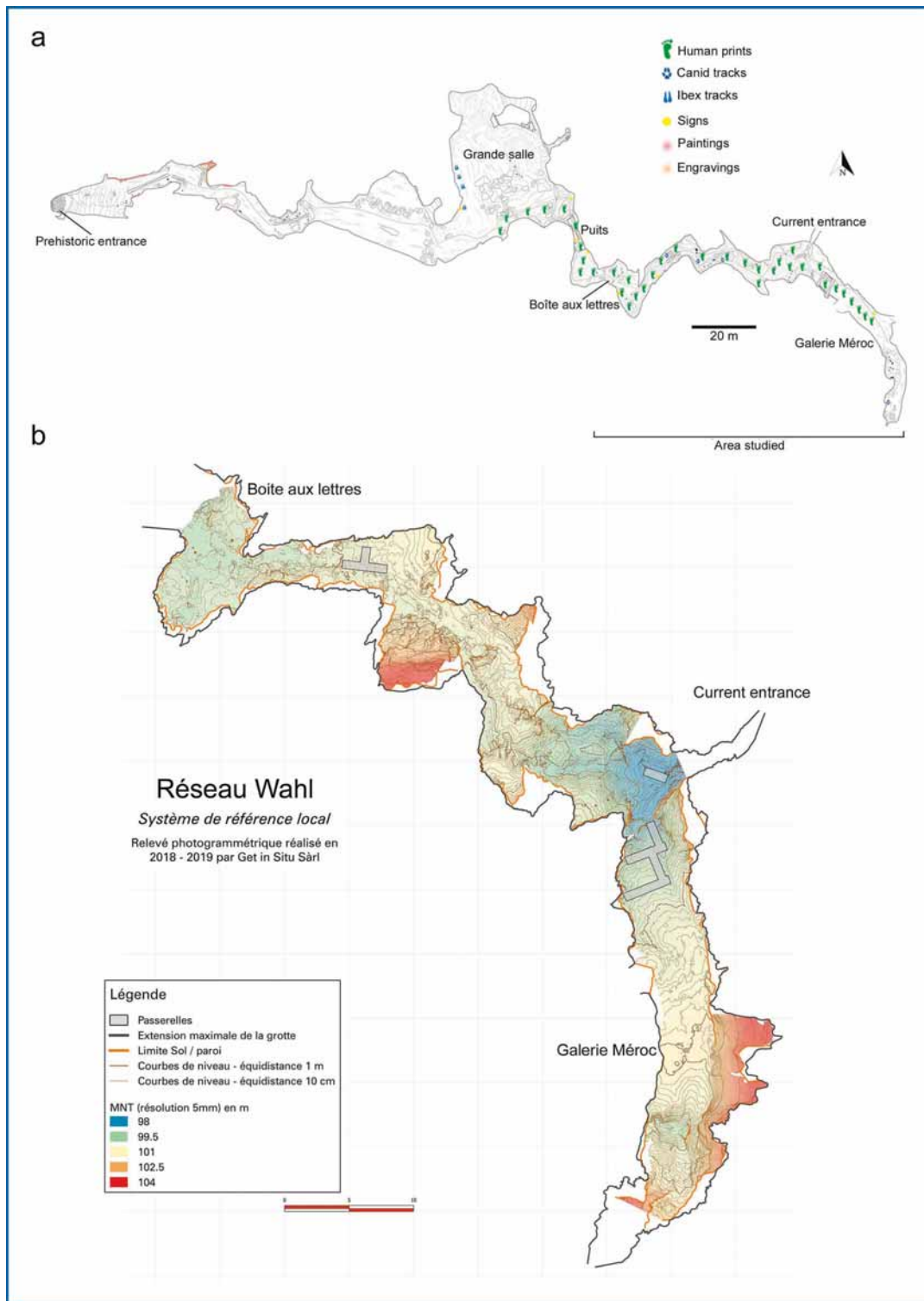
## Presentation of the cave

Fontanet cave is located on the right bank of the Ariège, in the commune of Ornat-Ussat-les-Bains (about 6 km upstream from Tarascon-sur-Ariège) and opens in the Quié de Sinsat massif, at 588 m above sea level. Its subterranean network, which extends over approximately 3 km, comprises several galleries distributed on various levels. Discovered in 1972 by Luc Wahl, its ornate gallery, the "Réseau Wahl" is also the only witness of the passage of prehistoric humans in the cave (Clottes et al., 1984). The present entrance to this 263 m long network rises 8 m above the lower network and is located opposite the Paleolithic entrance sealed by a scree (**Figure 1**). Chronologically, the network was occupied during the Upper Magdalenian (Clottes and Simonnet, 1972). The first studies of the network took place very quickly after its discovery in the 1970s under the direction of Léon Pales and then Jean Clottes, and focused on three main categories of remains: art (Vialou, 1986), remains relating to domestic activities (hearths, faunal and lithic remains, etc.) and prints. The gallery was also described from a paleospeleological point of view by Francois Rouzaud in 1978 (Rouzaud, 1978). Few of these works are published today and although a few occasional studies have been carried out since then (Le Guillou et al., 2017; Pastoors et al., 2015), incursions into the cavity subsequent to these works have always been exceptional. Since 2018, we have resumed the study of the network from the point of view of prints. The current research focuses on the sector between the "Galerie Méroc" and the "Puits", where the highest concentration of prints in the cave is found (Ledoux, 2019).

## Method

### In situ

The nature of the prints makes them very vulnerable and they are inseparable from the context in which they were formed and preserved. The methodology and study tools adopted must therefore be as non-invasive as possible. Our methodology is based on paleospeleology and consists of a survey of the sectors accessible from the current path and an inventory of the footprints found. Each inventoried print is then numbered, described and measured in situ if directly accessible. In the absence of an accurate and complete model in the literature, we esta-



**Figure 1:** Topography of the RéseauWahl. a: Topography of the entire network according to Rouzaud 1978, b: Topography of the study area made by Get In Situ.

blished a series of linear measurements around the print, inspired by different works (Bennett and Morse, 2014) and trying to represent the morphology of the foot as well as possible (Ledoux, 2019). In total, and where possible, seven measurements were taken on the footprint. The same procedure was followed for the handprints, with three measurements being taken. When not all the elements of a print are present or in the case of indeterminate prints, the measurements taken are usually length and width. The prints are then photographed and recorded in 3D by photogrammetry (carried out by the company Get In Situ). We now have a complete 3D model of the study area and a high-resolution record of the footprint areas. The use of 3D allows us to obtain a global vision of the cavity's prints as well as their geo-referencing within the cavity, thus facilitating *ex situ* work. Samples were also taken to characterise the sediment from which the footprints were formed.

### **Ex situ**

After field recording, our sample of footprints is studied using the 3D models. The free software CloudCompare (version 2.8.1) allows, among other things, the creation of depth maps and isolines that reflect the topography of the footprints. Some footprints that are not accessible in the field can also be measured by this technique. The different 3D models of the areas are analysed under different lights in order to confirm or refute certain interpretations made in the field. Thanks to this method, we have sometimes discovered prints that we had not observed on site. We were also able to reinterpret other prints. In addition, prints are taken from the models and matched where possible. The large number of prints and their superimposition makes it difficult to identify tracks and to discriminate between the different authors of the prints.

In order to clarify our observations, we therefore carried out a 3D geometric morphometric analysis on the best-preserved prints to try to discriminate certain morphotypes. This analysis is based on the spatial position of homologous landmarks, so it was necessary to determine which landmarks we would use from our sample before the analysis. As only five prints are currently complete (i.e. showing the whole plant and all the individualizable toes), we focused on the prints showing at least the distal part of the plant

and the toes. Ten prints were selected. On each of these prints, 14 anatomical landmarks were placed using IDAV Landmark software (v3.0, Wiley et al., 2005). Similarly, 108 pseudo-curve points were also placed and 47 pseudo-surface points were projected from a base model onto each footprint. These points were then dragged using the Morpho package provided by the R software to be all considered as homologous (see Gunz & Mitteroecker 2013 for a detailed description of the process). A Procrustean analysis consisting of translation, scaling and rotation of all the footprints was then performed, followed by a Principal Component Analysis (PCA) on the point coordinates using the 'ape' package. In order to visualise the shape variation along the PCA axes, the theoretical average shape of the sample was calculated using a TPS (Thin Plate Spline) deformation. This theoretical shape was then used to calculate the theoretical shapes associated with the minimum and maximum values of the first two axes of the PCA. Finally, we performed stature tests on the full footprints using different methods proposed in the literature based on foot length (Dingwall et al., 2013; Topinard, 1876; Webb et al., 2006).

## **Results**

### **Inventory of the prints**

The Réseau Wahl is exceptional not only because of its remarkable conservation, but also because of the multitude of varied prints it contains. Over the last four years, more than 300 prints have been inventoried in the surveyed part of the network. These are mainly human prints, but there are also some canid and ibex tracks. The best preserved and most numerous prints are located in the Gallerie Meroc and were made in a clay-silt sediment particularly favourable to the impression of detail. The formation and preservation of the prints is more contrasted between the Gallerie Meroc and the Boite aux lettres, with many areas more or less indurated by calcite formations. The majority of the prints are footprints or parts of feet, but the more unusual presence of complete or incomplete handprints is also attested. Sometimes indeterminate prints from other body sections are also present. Some prints whose origin we have not yet been able to determine have been grouped under the term 'glissades' ('slips'). These are found in all the imprinted areas. Generally rec-

tangular in shape, they are characterised by parallel lines of identical morphology and size. As the latter are strongly evocative of hair impressions, we consider the hypothesis of clothing or skin impressions. The survey also revealed fissure networks in areas where the sediment was not favourable for the formation of prints. These unusual formations result from the cracking of calcite in areas where the calcite was too thin to resist the pressure exerted by the passage of an individual. Finally, it should be noted that alongside these involuntary traces resulting from human movements within the cavity, there is a range of voluntary imprints such as several signs made by pressing fingers to the ground, traces of sediment removal, or even pellets.

### Number of individuals

#### Visual observation

The most effective way to identify the number of individuals present in a cave from prints is the presence of well-defined trackways and/or prints with different biometric and morphological characteristics. Despite the remarkable quantity of prints in the Réseau Wahl and the exceptional quality of some of them, it is currently difficult to link them to specific individuals. Some prints could nevertheless be associated and linked to the same individual, but it is impossible to track the path of each individual in the cavity. The first part of the Galerie Méroc, which is the richest in prints, is also the one with the most superimpositions. This results in prints that are often incomplete, distorted by the dynamics of movement and therefore difficult to relate.

Because of their arrangement, some prints could nevertheless be associated and attributed to the same individual (**Figure 2**):

- Prints Fon-17, Fon-18 and Fon-19, which correspond successively to two distal footprints and a back of hand print, seem to result from the same crouching position, which is consistent with the height of the ceiling at this location (1m or less).
- Footprints Fon-48 and Fon-49, side by side and of similar size, seem to indicate standing.
- Footprints Fon-80, Fon-81, Fon-82 and Fon-83 also appear to belong to the same individual, with Fon-80 and Fon-83 following each other (right and left foot, trackway?) and Fon-81 and Fon-82 following each other (very dynamic left and right foot, return movement).

- The partial footprints Fon-137 and Fon-138, which correspond to a right foot and a left foot.
- Footprints Fon-165 and Fon-182 which correspond to two right feet (probably the same foot).

In addition to these associations, we observed certain features, particularly in the toes, which seem to indicate at least two distinct morphotypes:

- The first is characterised by a slightly elongated hallux and a small, often superficial toe, and corresponds to footprints Fon-17, Fon-20, Fon-37 and Fon-47 (in orange in **figure 2**).
- The second by a relatively rounded distal part with a second toe placed slightly higher than the following toes and corresponding to footprints Fon-33, Fon-51, Fon-80, Fon-81 and Fon-82 (in red on **figure 2**).

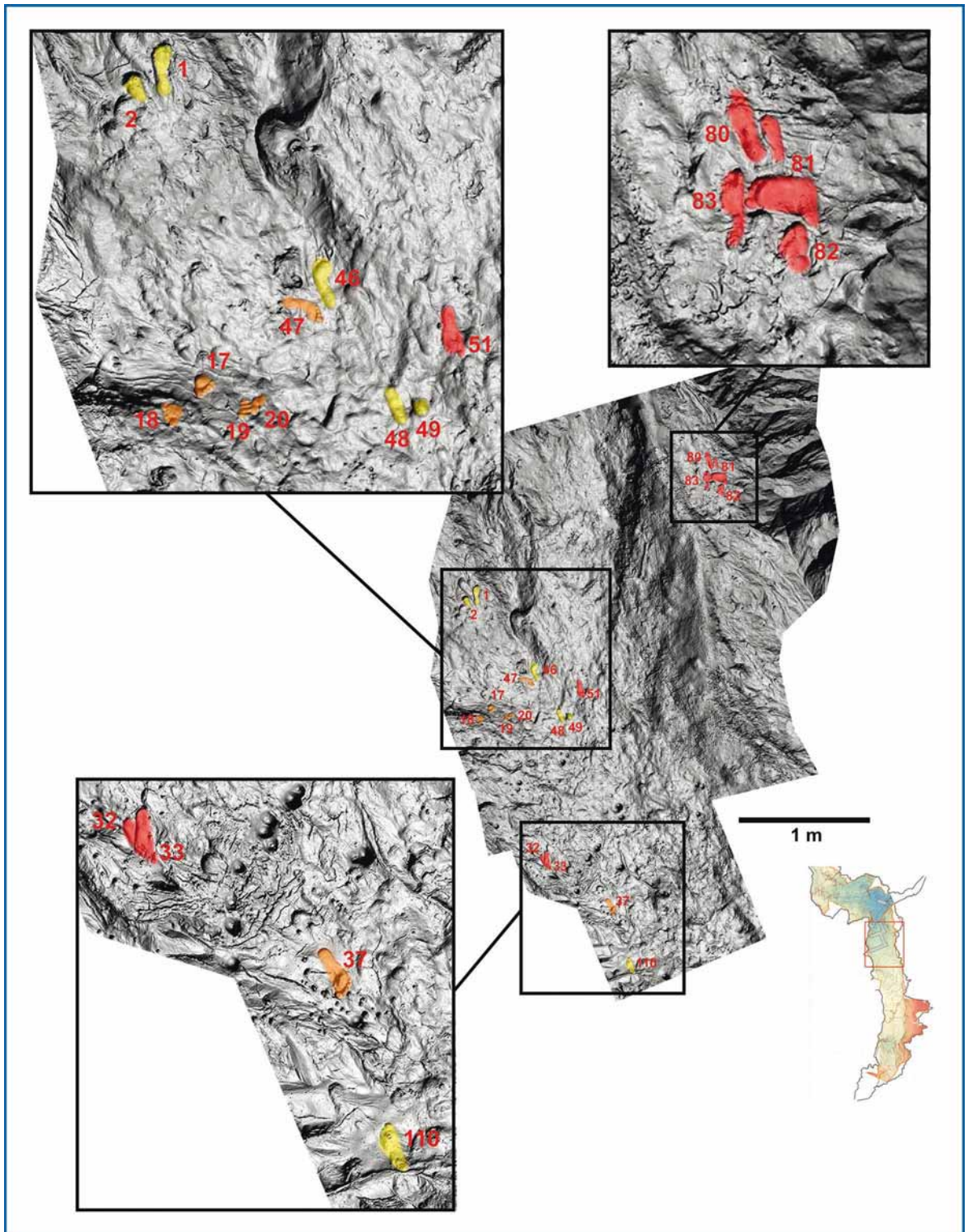
#### Geometric morphometry

The PCA results (**Figure 3**) show that axis 1 (34.1% of the variance) is driven by an opposition between red and orange footprints. Footprints Fon-80, Fon-81 and Fon-82 are grouped together and somewhat separated from the rest in the positive part of axis 1, as are footprints Fon-20, Fon-36 and Fon-47 in the negative part of axis 1. The Fon-17 and Fon-51 footprints are the two that seem to be the most similar despite their position remaining in the negative and positive parts respectively. On axis 2 (16.4% of the variance), there is no separation between red and orange footprints but a separation between Fon-1 in the positive part and Fon-65 in the negative part (yellow footprints not belonging to the two morphotypes previously described). However, unlike Fon-1, Fon-65 falls within the variability of the other footprints. This can be explained by the fact that Fon-1 shows a slight deformation.

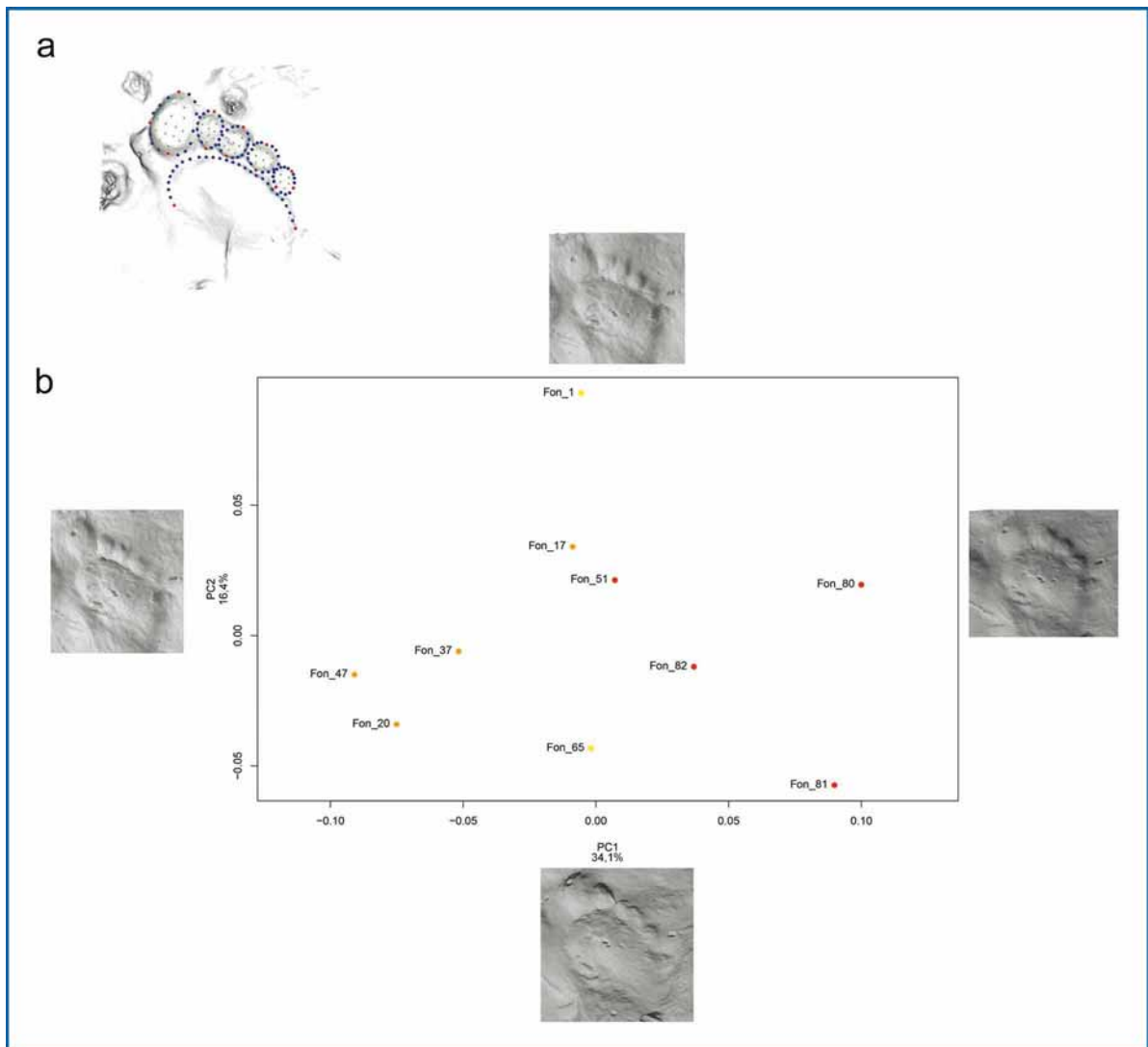
The results of the geometric morphometry analysis are consistent with our visual observations and seem to show the same morphological features than observed visually.

The combination of visual morphological observations and geometric morphometric analysis, coupled with the arrangement of prints, particularly on the main area in the galerie Méroc revealed the existence of at least two individuals. However, the maximum number of individuals is currently more difficult to establish. Nevertheless, the footprints found do not seem to indicate





**Figure 2:** Footprint association test on the main area of the Galerie Méroc. Orange: morphotype 1; red: morphotype 2; yellow: footprints not attached to a morphotype.



**Figure 3:** a: Location of the different landmarks: in red the anatomical landmarks, in blue the curve landmarks and in green the surface landmarks, b: PCA performed on the morphometric data of the footprints, with visualisation of the theoretical shapes associated with the minimum and maximum values of each axis. The first two axes explain 50.5% of the variance.

the presence of many people at the bottom of the cavity. The main area of the Meroc gallery is the only area where superimposed footprints can be seen, which could well be the result of the presence and/or passage of two or three individuals in this sector. The other print areas do not report superimpositions or parallel tracks, which also suggests that the number of people in this part of the cave was low. However, this interpretation must be tempered, by the lack of complete information on the most logical and easy path in this part (most of the time, the possibility of walking

normally and standing upright), which is the one we also use today and which inevitably disappeared following the discovery of the network.

### The authors

The stature tests carried out on the complete footprints of our sample correspond for the most part to small sizes that could correspond to those of children, in particular with regard to statures estimated between approximately 130 cm and 150 cm. The others are in the minority and are around 160 cm (Table 1).

**Table 1: Stature determined on complete footprints (cm).**

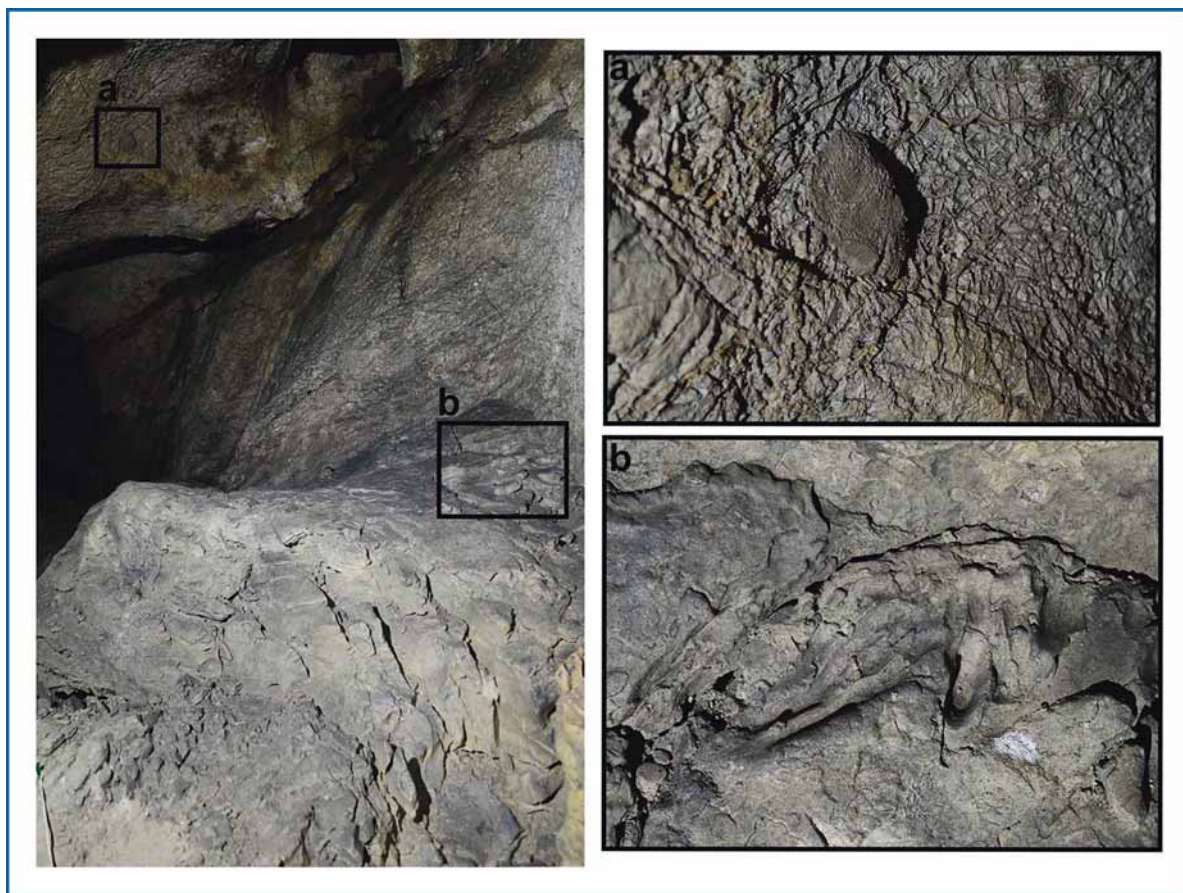
N°	Length foot-prints	(Topinard, 1876)	(Dingwall et al., 2013)	(Webb et al., 2006)
Fon-1	21,3	142	153,7	140,3 ± 10,5
Fon-2	20,4	136	150,3	134,3 ± 10,1
Fon-33	19,2	128	145,9	126,4 ± 9,5
Fon-37	21,2	141,3	153,3	139,6 ± 10,4
Fon-40	19,9	132,7	148,5	131 ± 9,9
Fon-41	22,6	150,7	158,5	148,8 ± 11,2
Fon-46	22,8	152	159,3	150,1 ± 11,3
Fon-48	17,1	114	138,1	112,6 ± 8,5
Fon-51	23,5	156,7	161,9	154,7 ± 11,6
Fon-52	21,3	142	153,7	140,2 ± 10,5
Fon-55	19	126,7	145,1	125,1 ± 9,4
Fon-63	23,8	158,7	163	156,7 ± 11,8
Fon-64	24,5	163,3	165,6	161,3 ± 12,1
Fon-65	29,5	196,7	184,2	194,2 ± 14,6
Fon-80	21	140	152,59	138,2 ± 10,4
Fon-83	21,5	143,3	154,45	141,6 ± 10,6
Fon-110	19,8	132	148,126	130,4 ± 9,8

### Activities/behaviours

All the remains present in the Réseau Wahl show that the Magdalenians explored the entire network. Their installation close to the entrance porch did not prevent them from penetrating further into the network to the end of the network. The sector between the Palaeolithic entrance and the Puits, marked by numerous archaeological remains and wall art testifying to their occupation, gives way after the Puits, and up to the end of the Galerie Méroc, to a sector with very few material remains and a human presence marked by the occurrence of prints and traces on the ground. These traces show an exhaustive use of the network even in areas that are sometimes difficult to access, with risky or even dangerous topography such as the Puits. The prints reflect

**“These prints, resulting from multiple positions and modes of locomotion, attest both to movement within the network and to stops whose duration is unknown.”**

an important dynamism due to their variety, their various orientations, their superimpositions (notably at the level of the main area of the Galerie Méroc) and their locations. These prints, resulting from multiple positions and modes of locomotion, attest both to movement within the network and to stops whose duration is unknown. The latter are in fact highlighted by the superimpositions on the main area of the Galerie Méroc or in restricted areas, but also by the numerous prints testifying to low positions (handprints, distal part of the foot, possible knees or elbows) or the signs on the ground made by the pressure of fingers. Although we do not know the duration of stops in this part of the cave, this is consistent with the occupation of the entrance area, especially as moving through the network to the bottom is



**Figure 4:** General view of the pellet bank. a: pellet attached to the ceiling, b: finger marks, sediment extraction.

relatively easy (except perhaps at the level of the Puits) and quick. The associated hand and footprints may all be the result of crouching positions (observation positions?), not for walking but for stationing. They are either close to the wall and under low ceiling heights or in narrow, low areas. One of the most significant examples of stationing is probably a small bank located in the Galerie Méroc and resulting from an ancient clay-silt filling of about 1.50 m by 90 cm. Although there is not more than one metre between the top of the slope and the ceiling, a multitude of traces were observed on its surface. This small space shows several fingerprints resulting from the removal of sediment, the purpose of which seems to have been to make pellets that we find both on the slope and on the ceiling above it. Pellets crushed to the ground are also observed a few metres away, as well as in other parts of the network. More surprisingly, several footprints

are also attested on this surface on which it is impossible for a person taller than one metre to stand. The narrowness of the surface does not *a priori* allow two people to stay at the same time unless they are small. This evidence is also consistent with the presence of young individuals in the cave. Moreover, the footprints in question here are all small. The presence of children in the subterranean environment is already attested in several caves and this for all periods (Bégouën et al., 2009; Galant et al., 2021; Garcia, 2005; Garcia et al., 1990; Pastoors et al., 2017; Romano et al., 2019). Although their role in the subterranean environment was not defined, they seem to have been involved in both ordinary activities and behaviours as well as in symbolic activities, the boundary between the two being sometimes difficult to establish. In the Réseau Wahl, the stands seem to be the result of activities that may have been playful and in some cases involved clay, as

clay manipulation is also a recorded activity in caves (Bégouën et al., 2009; Garcia and Duday, 1983; Romano et al., 2019).

## Conclusion

The remarkable conservation conditions of the Wahl Network make it a rare ichnological testimony for the Palaeolithic. As there are very few archaeological remains in the deepest half of the network, the prints and their exceptional preservation are a precious element in understanding the human use of the cave. After four years of work in the cave, we can now draw up a profile of the people who walked on the floor of the Réseau Wahl 15,000 years ago and also learn more about the function of this site, which has remained almost intact. Thus, the various human manifestations encountered in the cave seem to belong to both the domestic and the symbolic spheres. They are the result, among others, of young individuals who explored the entire network but also stayed there. More broadly, its similarities with caves such as La Garma or La Bâsura, which are of similar chronology, allow us to highlight patterns of human behaviour in the subterranean environment. Apart from continuing the ichno-

logy study, the next step is to date this part of the network in order to clarify the chronological context of the prints and, more generally, of the entire network.

## Acknowledgments

I would like to thank the Fyssen Foundation for allowing me to continue my research in ichnology, and the supervisor of this project Marie Soressi. I would also like to thank the University of Cantabria and the IIIPC for hosting me, and Pablo Arias for accompanying me during these two years. I am grateful to all the collaborators of the various projects in which my work is integrated. As this article focuses on the Réseau Wahl at Fontanet, I would like to thank the DRAC Occitanie for authorising the work in the cave, and the Eugène Fleischmann Foundation for its support. I would also particularly like to thank Luc Wahl, its inventor, without whom this work would not have been possible, and the team that agreed to conduct this study with me: Marion Corbé, Xavier Muth, Céline Puig, Nathalie Fourment and Céline Pallier. Even if this article is signed by my name alone, it is the result of a collective work, so thank you all.

## La parure en « pierres tendres noires » à la fin du Magdalénien dans l'Arc jurassien

Caroline PESCHAUX

*Institut d'Archéologie de l'université de Neuchâtel, Laténium – Parc et musée d'Archéologie, Espace Paul Vouga, CH-2068 Hauterive, caroline.peschaux@gmail.com*

### Résumé

Par leur valeur identitaire universelle, les objets de parure découverts en contexte archéologique présentent un fort potentiel d'information sur les façons dont les sociétés humaines passées ont choisi de se distinguer et d'interagir entre elles. Cette recherche vise à documenter une pratique originale des populations magdaléniennes de l'Arc jurassien qui correspond à un usage des « pierres tendres noires » pour la production des ornements. Outre un inventaire actualisé des objets découverts, l'approche consiste à intégrer les méthodes de la pétrologie organique à l'analyse morphométrique et technologique du mobilier de parure pour pouvoir étudier les modalités d'exploitation de ces matières (natures et origines des roches, types de productions, techniques de fabrication). Les résultats obtenus témoignent d'une exploitation intensive des ressources régionales (jais du Toarcien), dont les propriétés mécaniques ont permis la fabrication d'une large diversité d'objets de parure. La diffusion à large échelle des matières et formes représentées révèle le dynamisme des interactions sociales à cette période.

### Mots-clés

Parure, Magdalénien, Arc jurassien, Jais, Pétrologie organique

## Adornment in 'black soft stones' at the end of the Magdalenian period in the Jura Arc

### Abstract

Because of their universal identity value, the objects of adornment discovered in archaeological contexts present a strong potential for information on the ways in which past human societies chose to distinguish themselves and to interact with each other. This research aims to document an original practice of the Magdalenian populations of the Jura Arc that corresponds to the use of 'black soft stones' for the production of ornaments. In addition to an updated inventory of the objects discovered, the approach consists of integrating the methods of organic petrology with the morphometric and technological analysis of the ornamental collections in order to study the methods of exploitation of these materials (nature and origins of the rocks, types of production, manufacturing techniques). The results obtained show an intensive exploitation of regional resources (jet from the Toarcian), whose mechanical properties allowed the manufacture of a wide variety of objects of adornment. The wide distribution of the materials and forms represented reveals the dynamism of social interactions during this period.

### Keywords

Adornment, Magdalenian, Jura Arc, Jet, Organic petrology

## Introduction

**D**'hier à aujourd'hui, les parures corporelles remplissent souvent un rôle d'identification du porteur à travers un jeu symbolique où les propriétés inhérentes à l'objet de parure ont une place importante. Un rapide coup d'œil aux habits et accessoires vestimentaires permet d'identifier les siens des autres et le statut des individus (sexe, âge, rang social, etc.). En ce sens, la parure permet aux sociétés humaines de développer leur propre symbolisme social et ainsi de créer une identité collective. Elle participe dès lors au sentiment d'appartenance à une communauté et donc à l'affirmation des groupes humains (Verswijver 1986 ; Hodder, 1991 ; Sanders, 2002 ; Godart, 2010). De plus, en étant à la fois symboles et objets de prestige, les ornements ont universellement été utilisés dans les rapports économiques et diplomatiques des populations traditionnelles pour entretenir les liens sociaux et les positions de pouvoir entre les groupes interculturels, notamment au travers d'un échange régulier de matières et de productions ornementales (cf. exemples de la *Kula* dans le Pacifique : Mauss, 1923-1924 ; ou encore des *Wampum* en Amérique du nord : Lainey, 2004). L'étude des objets de parure découverts en contexte archéologique présente dès lors un fort potentiel d'information sur les modes de vie des sociétés humaines passées, en renseignant sur les manières dont les individus ont choisi de s'identifier et de se distinguer au sein de leur communauté, de leur groupe régional et de leur culture, mais aussi de communiquer et d'interagir avec les groupes humains voisins plus ou moins éloignés.

La recherche porte ici sur une pratique originale consistant en un usage intensifié des « pierres tendres noires » dans la production de parures chez les populations de la fin du Magdalénien (15-13 ka BP), avec comme objectifs de documenter la diversité des types d'objets produits et leur répartition, les méthodes de fabrication, ainsi que la nature exacte des matériaux utilisés, leur(s) origine(s) et leur diffusion. Les objets produits en « pierres tendres noires » se retrouvent un peu partout en Europe occidentale à la fin du Magdalénien (des témoignages existent jusque dans les Cantabres, le Sud-Ouest français, le Bassin parisien, les Ardennes, la Rhénanie et

en Thuringe, signifiant dès lors une pratique répandue : Leroi-Gourhan et Brézillon, 1966 ; Álvarez Fernández, 1999, 2000, 2004, 2005 ; Merlet *et al.*, 2016 ; Peschaux, 2019 ), mais ils sont surtout nombreux et fréquents dans les sites de l'Arc jurassien et ses marges (Bosinski, 1982 ; Bullinger, 2006). L'espace jurassien correspond à un territoire de montagnes nouvellement (ré-)investi par l'homme car jusqu'alors rendus inhospitaliers par la glaciation wurmienne (Mevel, 2017 ; Leesch *et al.*, 2019). L'usage intensifié des roches noires s'inscrit donc dans un contexte de mutation environnementale et sociale (élargissement des territoires dans le cadre de la déglaciation, accroissement démographique, régionalisation des phénomènes culturels, circulation accrue des matériaux : Langlais, 2010 ; Mevel, 2017) qui a certainement entraîné le développement de nouveaux enjeux territoriaux et économiques ayant pu conduire à des refontes globales des identités, des interactions sociales et des modalités d'occupation de l'espace. À l'échelle du Paléolithique supérieur, le Magdalénien correspond en effet à un moment où apparaît de nouvelles façons de se parer, que ce soit dans les matériaux privilégiés ou bien dans les modalités de fabrication et d'attache mises en œuvre (Peschaux, 2017). Dès lors, l'analyse des productions de parures de l'Arc jurassien constitue un terrain d'étude propice aux recherches portant sur les mécanismes menant à l'essor de nouvelles formes d'ornementation.

L'autre enjeu de ce projet est d'ordre méthodologique avec le développement des méthodes d'analyse sur les roches tendres façonnées dont le potentiel informatif reste encore nettement sous-exploité en Préhistoire. Alors que les archéologues ont jusqu'à présent eu tendance à les regrouper sans distinction sous des appellations globales (*lignites* en française ; *gagat* en allemand ; *jet* en anglais ), les « pierres tendres noires » correspondent en fait à une diversité de roches organogènes carbonées (schistes bitumineux, charbons sapropéliques, boghead, torbanite, etc.) et de bois houillifiés (jais, xylite, vitrain, etc.) présents dans les formations géologique du Paléozoïque au Cénozoïque (Teichmüller, 1992). Outre leur couleur, variant du brun au noir intense, l'avantage de ces matériaux est qu'il s'agit de roches tendres et légères (avec des duretés situées entre 2 et 3 sur l'échelle de Mohs) qui, par leurs propriétés mécaniques souples,

sont faciles à travailler et ont la particularité d'offrir une surface brillante et soyeuse une fois polie, ce qui leur confère un fort pouvoir esthétique. Afin de mieux caractériser les roches noires utilisées par les populations magdaléniennes, les méthodes de la pétrologie organique ont été intégrées à l'étude des objets de parure (en collaboration avec Bertrand Ligouis, Université de Tübingen), ce qui a permis d'apporter des informations inédites sur leurs modalités d'exploitation au Magdalénien (natures, faciès lithologiques, origines géographiques possibles, propriétés mécaniques recherchées).

### Matériel et méthodes

Les sites magdaléniens de l'Arc jurassien ont principalement fait l'objet d'investigations anciennes (fin 19<sup>e</sup> / milieu 20<sup>e</sup> siècle), néanmoins complétées par de rares fouilles récentes (Neuchâtel-Monruz, Hauterive-Champréveyres, grotte Blénien, Les Douattes : Affolter *et al.*, 1994 ; Leesch, 1997 ; Pion et Mevel, 2005 ; Bullinger *et al.*, 2006 ; Koehler *et al.*, 2013). Malgré cet historique – qui implique des imprécisions chronostratigraphiques et une dispersion des collections – l'ensemble du mobilier découvert dans ces sites peut être attribué à la fin du Magdalénien *largo sensu* (phases moyennes, récentes et finales : Le Tensorer, 1998 ; Leesch *et al.*, 2012). Afin d'obtenir une vue d'ensemble, un inventaire raisonné, actualisé et exhaustif des objets en roches noires découverts dans les sites magdaléniens de l'Arc jurassien a été dressé (par bibliographie et consultation des collections archéologiques). Un peu plus de 4000 pièces (près de 300 objets finis et plusieurs milliers de déchets de fabrication) issues de 21 sites ont été recensées (**tabl. 1 ; fig. 1**), dont environ 3000 exemplaires ont été directement étudiés et soumis à des analyses morphométriques et technologiques (i.e. descriptions des formes des objets, prises de mesures, études des traces de modifications anthropiques).

L'état de conservation des objets est variable : certains présentent des surfaces lisses bien préservées alors que d'autres montrent des fracturations, des porosités, des modifications de couleur (souvent rouille ou un éclaircissement) ou bien des délitements en feuilletés qui suivent les plans de stratification de la matière. Cette altération, plus ou moins intense, est liée au transit des objets dans des sédiments non adaptés à la

bonne conservation de ces matières, ce qui a pu dans de rares cas limiter leur étude.

L'analyse des matériaux a été réalisée selon la méthode de la pétrologie organique (Teichmüller, 1992 ; Preuschoft-Güttler, 1995 ; Ligouis, 2006). Cette méthode repose sur une caractérisation fine et détaillée de la composition et de la structuration de la matière, en vue de la comparer à un référentiel d'échantillons géologiques et archéologiques connus (ici, celui du département de Géoarchéologie de l'université de Tübingen). L'analyse est réalisée à partir d'un échantillon millimétrique de matière prélevé sur l'objet archéologique (selon une politique non destructrice, dans des cassures récentes ou des fissures) qui est étudié en lumière blanche réfléchie et en mode fluorescence à l'aide d'un microscope métallographique. L'examen prend en compte une série de critères utiles à l'interprétation (couleur, éclat, aspect de la cassure, dureté, trace sur le papier, altération), procède à des mesures du degré d'altération et d'homogénéisation/bituminisation de la matière et comprend une analyse semi-quantitative et structurelle des constituants organiques et minéraux. Cette analyse a été appliquée sur des pièces archéologiques issues de 12 sites : Petersfels, Munzingen, Hohle Fels et Kesslerloch (Preuschoft-Güttler, 1995) ; Neuchâtel-Monruz et Hauterive-Champréveyres (Ligouis, 2006) ; Schweizersbild, Freudenthal, Vorder Eichen, Veyrier-Etrembières, Les Douattes et la grotte Blénien (inédit).

### Résultats

#### Types d'objets

Les types d'objets produits correspondent en majorité à des éléments de parure, auxquels s'ajoutent quelques pièces d'art mobilier : plaquettes et autres supports mobiliers pour la gravure artistique, représentant principalement des chevaux et des motifs évoquant des végétaux (Merk, 1875 ; Mauser, 1970 ; **tabl. 1 ; fig. 2**, n° 1 et 2).

La composition des objets de parure est dominée par les perles, de 5-10 mm de diamètre, qui se composent de morphotypes géométriques très variés comprenant des formes discoïdes, cylindriques, sphériques, biconiques, rectangulaires et en forme de « goutte » (**fig. 2**, n° 3 à 6). De dimensions plus grandes, les rondelles (35-45 mm de diamètre) sont des disques perforés au centre (**fig. 2**, n° 9). Ce type de parure est com-

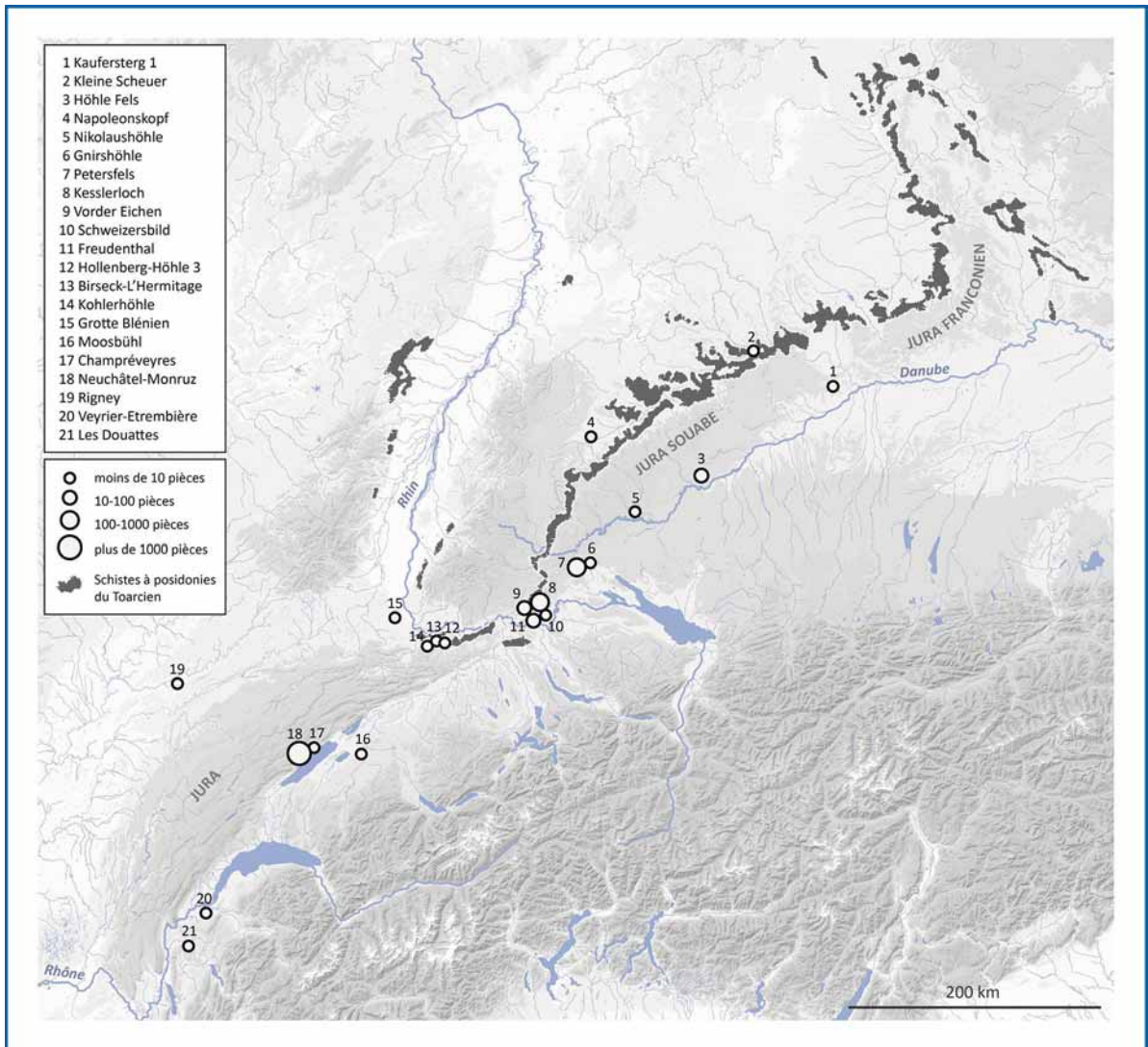


	Perles	Rondelles	Plaquettes biforées	Pièces arquées	Pendants "figures féminines"	Pendants "radioles d'oursin"	Pendants "insectes"	Autres pendants	Objets finis indéterminés	Art mobilier	Déchets de fabrication	TOTAL
Les Douattes	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Veyrier-Etrembières	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	3
Neuchâtel-Monruz	2	-	5	1	3	-	-	-	1	-	>3500	>3512
Hauterive-Champréveyres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
Moosbühl	5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	6
Rigney	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Grotte Blénien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Kohlerhöhle	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hollenberg-Höhle 3	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	2	5
Birseck-L'Hermitage	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Schweizersbild	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
Freudenthal	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	6	10
Kesslerloch	7	4	-	5	-	8	1	2	11	4	>200	>242
Vorder Eichen	1	-	-	2	-	-	-	1	-	1	12	17
Gnirshöhle	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Petersfels	123	13	17	20	19	-	2	-	21	-	>200	>415
Nikolaushöhle	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Napoleonskopf	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Hohle Fels	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	7	10
Kleine Scheuer	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Kaufertsberg 1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>144</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>&gt;3934</b>	<b>4234</b>

**Tableau 1 :** Dénombrement par site et par type des objets en « pierres tendres noires » des sites magdaléniens de l'Arc jurassien. x : présence, sans données chiffrées.

mun sur l'ensemble de l'espace magdalénien, avec des exemplaires plus communément réalisés en os et, plus rarement, dans des matières minérales diverses (Bellier *et al.*, 1991). Les plaquettes biforées sont des objets plats (autour de

3 mm d'épaisseur) à la forme variée (ovale, triangulaire, en forme de « haricot ») de 15-20 mm de longueur qui ont la particularité d'être aménagées de deux perforations (fig. 2, n° 7 et 8). La forme des pièces arquées s'inscrit dans un



**Figure 1 :** Sites magdaléniens de l'Arc jurassien ayant livré des objets en « pierres tendres noires ». Fond de carte : SIG G. Encelot, SRTM (relief), Openstreetmap (hydrographie).

triangle plus ou moins allongé (30 mm de longueur pour les plus courts et jusqu'à 70 mm pour les plus longs) au sommet arrondi et aux extrémités se terminant en biseau (fig. 2, n° 10 et 11). Les pièces arquées portent une perforation centrale sur le côté ou, plus rarement, une entaille centrale sur la face supérieure.

Les « pierres tendres noires » ont également servi à la fabrication de pendants (i.e. objets perforés à une extrémité) dont la particularité est qu'une partie d'entre eux sont figuratifs, bien que schématiques, et réalisés en ronde-bosse. Parmi les éléments les plus connus, les

figures féminines schématisées percées, dites de type « Petersfels », sont particulièrement remarquables (fig. 2, n° 18 à 20). Généralement de petites dimensions – situées autour de 15-20 mm de longueur, plus rarement jusqu'à 40 mm – la forme de ces pendants est divisée en 3 volumes sans détails figuratifs : un tronc sans tête à appendice plat et de section rectangulaire sur lequel est généralement installé la perforation ; un fessier saillant ; et des membres inférieurs de proportions réduites, avec les jambes jointes non individualisables et sans pieds, se terminant en pointe mousse (Bullinger,

2006). Cette façon de représenter la figure féminine, de type « Gönnersdorf-Lalinde », est un motif récurrent au Magdalénien qui se retrouve sous la forme de statuettes et en gravure mobilière et pariétale dans toute l'Europe (Bourrillon *et al.*, 2012). Sous cette forme, ces pendants sont identifiés au Petersfels (Mauser, 1970) et à Neuchâtel-Monruz (Bullinger, 2006). De possibles fragments plus controversés ont aussi été évoqués à Hollenberg-Höhle 3 (Bay, 1953 ; Sedlmeier, 1982) et à Höhle Fels (Álvarez Fernández, 2004). Enfin, des représentations féminines schématiques de forme différente – jambes étendues, jambes et poitrine individualisées par de courtes entailles longitudinales centrales – existent sur les sites du Schweizersbild (fig. 2, n° 21 ; Schmid, 1975 ; Höneisen et Peyer, 1994) et du Petersfels (Braun, 2006). Ces dernières ne sont pas perforées, mais paraissent inachevées, autrement dit abandonnées en cours de fabrication.

Un autre type de pendants correspond à des imitations de radioles d'oursin fossiles (Bosinski, 1980). Leur forme allongée (25-40 mm de longueur) se compose d'une tige de section quadrangulaire et d'un bouton en partie distale (fig. 2, n° 12 à 14). L'extrémité proximale, là où est aménagée la perforation, prend des formes variées : spatulée, ogivale ou cordiforme. Cette variabilité rappelle en effet les radioles primaires d'oursins réguliers, en particulier ceux appartenant aux formes fossiles de l'ordre des Cidaroides (Cidaroida) qui présentent des formes originales et qui sont fréquentes dans les formations géologiques du Mésozoïque, notamment dans l'Arc jurassien (Smith et Wright, 1989). Il est à relever que des exemplaires en ivoire sont mentionnés à Freudenthal (Worm, 1980), ainsi que dans le Sud-Ouest de la France, au Mas d'Azil et à Laugerie-Basse (Bosinski, 1980).

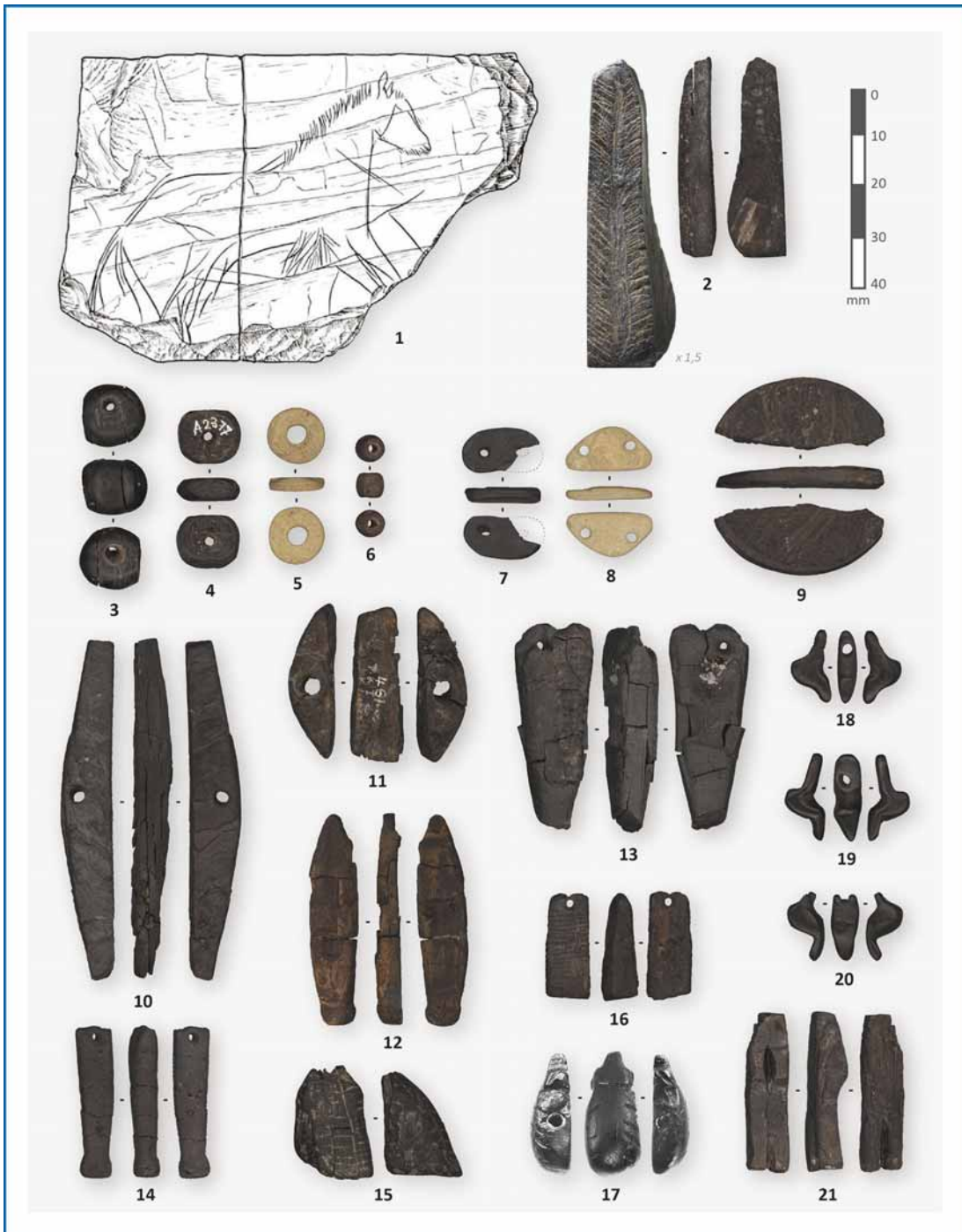
Un dernier type de pendants correspond à des représentations d'insectes. Dans l'Arc jurassien, il existe un exemplaire au Petersfels d'un probable coléoptère (mentionné comme étant un « scarabée » ou un « hérisson ») qui est aménagée d'une perforation latérale située au centre de la pièce (fig. 2, n° 17 ; Mauser, 1970 ; Adam et Kurz, 1980). Le site de Kleine Scheuer a livré une larve interprétée comme étant celle d'un œstre (mouche) du renne, qui est aménagée d'une perforation cassée à une extrémité (Bosinski, 1982 ;

Adam, 2002). Au Kesslerloch, un objet piriforme non percé mais couvert d'un décor composé de courtes incisions évoque également une possible représentation d'un insecte ou d'une larve (Bosinski, 1980, 1982). D'autres exemplaires existent en dehors de l'aire d'étude : à la grotte du Trilobite à Arcy-sur-Cure (un exemplaire biforcé de coléoptère interprété comme un « bupreste » : Schmider *et al.*, 1995), à la grotte du Coléoptère en Belgique (un exemplaire biforcé en ivoire : Hamal-Nandrin et Servais, 1925) et deux autres pièces plus douteuses à Fontalès (Darasse et Guffroy, 1960) et à l'Abri Durif à Enval (Merlet *et al.*, 2016).

### Techniques de fabrication

En plus des objets finis, plusieurs sites ont livré de petits blocs, fragments et esquilles de « pierres tendres noires », plus ou moins bien représentés selon les sites et les conditions de fouilles (tabl. 1). Ces éléments témoignent d'un travail de ces matières réalisé directement sur les sites. Parmi les pièces étudiées, une partie des déchets présente des traces nettes de modifications anthropiques (cf. infra). Les autres ne portent pas de traces apparentes mais peuvent, au moins pour la majorité d'entre eux, être tout de même considérés comme des déchets de fabrication correspondant à des portions de matière brute importée ou à des chutes variées produites au cours de la fabrication des objets.

Parmi les déchets qui présentent des traces de modification anthropique, certains correspondent à des éclats dont les caractéristiques morphotechniques identifiées (bulbe, ondes de choc, lancettes sur la face d'éclatement ; négatifs d'enlèvements précédents sur la face extérieure) sont similaires à celles observées sur les produits de la taille du silex. D'une part, ils prennent la forme de grands éclats de 30-60 mm de longueur qui, pour une partie d'entre eux, présentent un début de reprise constituée de série de petits négatifs d'enlèvement sur le pourtour. D'autre part, ces éclats peuvent être de très petites dimensions, moins de 10 mm de longueur (fig. 3). Il est également à mentionner deux objets ébauchés au Petersfels qui présentent de nettes négatifs d'enlèvement (Mauser, 1970 ; Albretcht *et al.*, 1994). L'ensemble de ces pièces induit l'emploi de la percussion pour le travail des « pierres tendres noires », en particulier pour l'obtention et la mise en forme initiale des sup-



**Figure 2 :** Objets produits en « pierres tendres noires » des sites magdaléniens de l'Arc jurassien. 1 : plaquette gravée d'un cheval (Mauser, 1970) ; 2 : « Baguette » gravée d'un possible motif végétal (vue agrandie : Bettina Jacot-Descombes © Musées d'art et d'histoire, Ville de Genève) ; 3-6 : perles ; 7-8 : plaquettes biforées ; 9 : Rondelle ; 10-11 : pièces arquées ; 12-14 : pendants type « radioles d'oursin », respectivement ogival, cordiforme et spatulé ; 15-16 : autres pendants décorés ; 17 : pendant type « insecte » (Adam et Kurz, 1980) ; 18-21 : pendants type « figures féminines ». Photos : C. Peschoux, sauf mention contraire.



**Figure 3** : Petits éclats de mise en forme en jais obtenus par percussion identifiés sur le site de Neuchâtel-Monruz (Suisse). Échelle (trait blanc) : 3 mm. Photos : C. Peschaux.

ports sur lesquels sont ensuite façonnés les objets.

Les autres déchets avec traces de fabrication correspondent à des fragments qui présentent sur une ou plusieurs faces des pans de rainurage, des plages de raclage et/ou d'abrasion qui témoignent également de l'utilisation de techniques plus fines, davantage connues pour être utilisées dans le travail des matières osseuses (Averbouh et Provenzano, 1998-1999). Les observations technologiques réalisées sur les objets finis montrent en effet que la mise en forme finale des objets a fait appel à ces techniques : raclage pour le façonnage puis abrasion et polissage pour la régularisation des surfaces. Les perforations sont réalisées par raclage rotatif bifacial, parfois précédé d'incisions de grattage ayant éventuellement permis de marquer l'emplacement de l'orifice, d'entamer le creusement et de créer un point de calage pour l'application du raclage rotatif. Les décors et gravures installés sur les objets sont réalisés par incision pratiquée à l'aide d'une pointe lithique.

#### Matériaux utilisés : natures et origines

Les analyses de pétrologie organique révèlent que les objets sont majoritairement façonnés dans du jais (98 % du corpus analysé). Géologiquement, le jais correspond à un fragment de bois flotté (généralement du Gymnospermes) ayant subi des phases d'humification, de gélification puis de bituminisation au cours de sa diagenèse (Stach *et al.*, 1982). À l'état frais, il s'agit d'un matériau noir, brillant, d'aspect gras et donc tendre mais à cassure conchoïdale qui a ainsi l'avantage de posséder des propriétés méca-

niques à la fois souples et rigides. Tous les jais analysés ici présentent des structures identiques caractérisées par un degré élevé de bituminisation (et donc d'homogénéisation de la structure) et par une forte compression des tissus (de couleur gris sombre) et des cellules (remplies de matière humique de couleur brun-roux) qui, en étant juxtaposées en chapelet, dessinent des bandes sinueuses discontinues (**fig. 4**). Ces caractéristiques constituent une signature pétrographique qui indique une origine géologique commune pour l'ensemble des pièces analysées, correspondant aux formations de schiste bitumineux à posidonies (*Posidonienschiefer* en allemand ; *Posidonia shale* en anglais) du Toarcien inférieur (échantillons géologiques de référence : R7 Balingen et Hechingen 2014, SO Allemagne). Ces formations sont très bitumineuses et riches en jais où cette ressource y est présente sous forme de lentilles de taille variable, allant du millimètre au mètre selon la dimension du fragment de bois fossilisé (rameau, branche, tronc ; Riegarf, 1985 ; Prauss *et al.*, 1991). Régionalement, les schistes à posidonies sont surtout accessibles à l'affleurement sur le versant oriental du Jura souabe jusque dans le Jura Franconien et, plus sporadiquement dans la vallée du cours supérieur du Rhin (**fig. 1** ; Galasso *et al.*, 2021).

En complément, de rares objets sont fabriqués dans des schistes bitumineux de couleur claire brun-jaune (**fig. 2**, n° 5 et 8). Ils correspondent à des perles et plaquettes biforées découvertes à Neuchâtel-Monruz (3 exemplaires : Bullinger, 2006) et à Moosbühl (2 exemplaires : Nielsen, 2018). Cette matière, composée d'une alternance

de lamines claires et plus foncées, est aujourd'hui pauvre en bituminite (d'où sa teinte claire ; Ligouis, 2006). La couleur de la roche devait être plus foncée à l'origine (avec une altération post-dépositionnelle des bitumes subie dans le site archéologique), mais présentait quoi qu'il soit une teinte plus claire que les jais. À ce stade, l'origine de ce schiste bitumineux n'est pas définie.

## Discussion

Les résultats obtenus confirment une exploitation magdalénienne des « pierres tendres noires » principalement dédiée à la production des objets à valeur symbolique (objets de parure et supports d'art mobilier). Ce choix repose probablement sur leurs propriétés particulières, qui en couplant atouts esthétiques (couleur noire, surface lisse et brillante) et mécaniques (matière souple et rigide permettant d'appliquer une gamme élargie de techniques), permet la fabrication d'ornements de formes diverses, allant des formes simples géométriques (perles, rondelles, plaquettes, pièces arquées) aux formes plus complexes et figuratives (représentations féminines, radioles d'oursins et insectes).

Les analyses de pétrologie organique nous apprennent que les roches utilisées sont étonnamment peu diversifiées, avec une exploitation majeure du jais noir, agrémentée de rares productions en schistes bitumineux de couleur plus claire. Si l'origine du jais identifié se limite au nord-est de l'Arc jurassien, dans les formations à posidonies du Toarcien du Jura souabe, cette matière est néanmoins identifiée sur l'ensemble des sites magdaléniens du territoire considéré, d'un bout à l'autre du massif du Jura. Cette circulation, sur au moins 300 km, suggère un attrait particulier pour cette matière et implique la mise en place de stratégies d'acquisition spécifiques ayant permis cette large diffusion (probablement, contacts et échanges réguliers entre groupes humains magdaléniens).

La présence de nombreux déchets de fabrication, aussi bien dans les sites proches des sources d'approvisionnement (comme le Kesslerloch et le Petersfels) que dans des sites plus éloignés

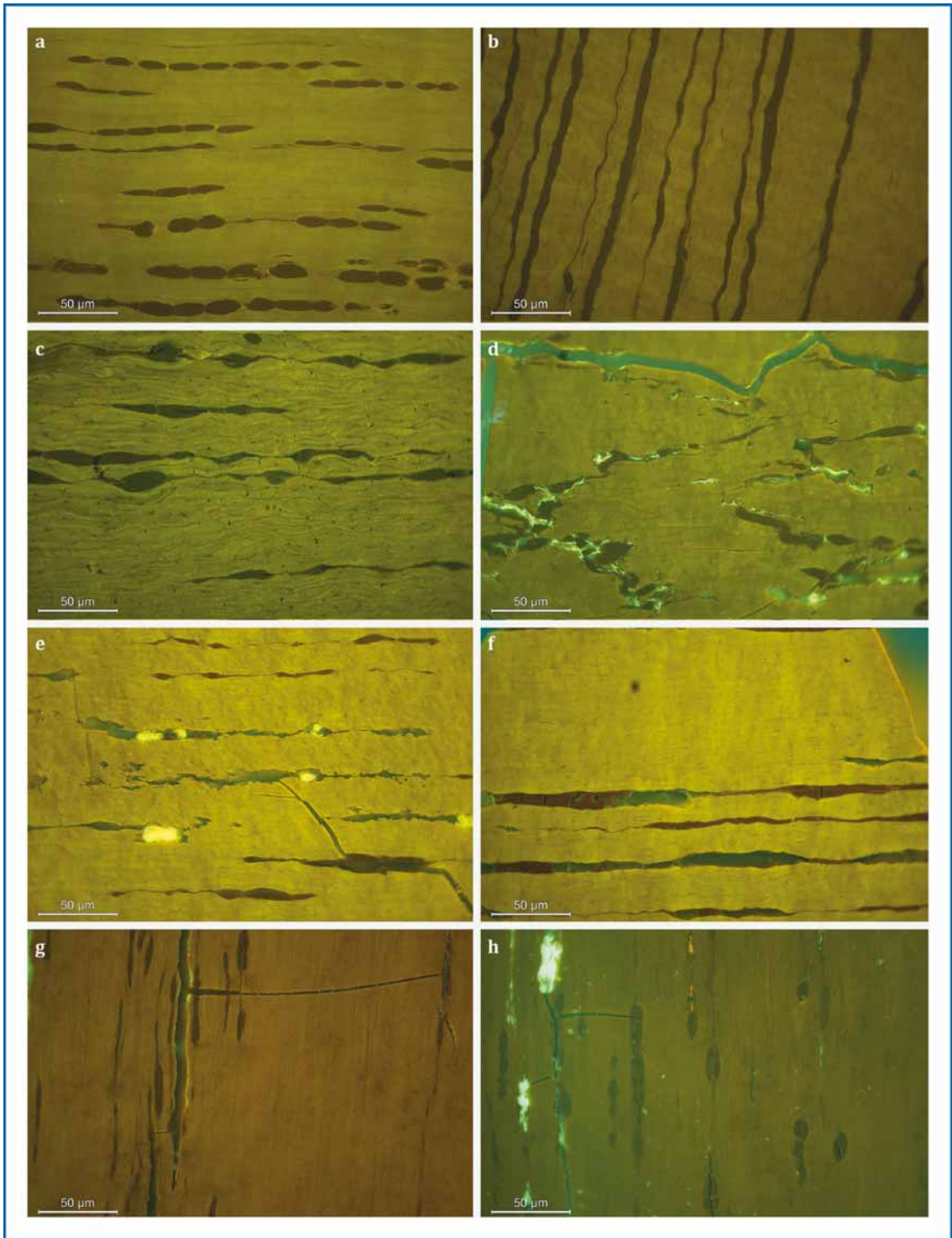
(comme à Neuchâtel-Monruz), semble indiquer une circulation du jais sous la forme de matière brute plutôt que comme objets déjà produits. Dans la mesure où les types d'ornement produits se répètent d'un site à l'autre, le bagage culturel (et les codes esthétiques associés) paraît s'être diffusé de pair avec la matière. Toutefois, les récurrences les plus lointaines sont réalisées dans d'autres matières (rondelles en os et représentations en ivoire de radioles d'oursin et d'insecte) ou sous d'autres formes (statuettes et gravures des représentations féminines), ce qui suggère que les idées pourraient avoir eu une diffusion plus large que la matière.

Les productions en « pierres tendres noires » constituent ainsi une composante importante des sites magdaléniens de l'Arc jurassien. Elles se développent au moment de la réoccupation post-glaciaire de cet espace, matérialisant une réappropriation du territoire via l'exploitation d'une ressource régionale. Ces productions ont certainement contribué à créer une identité collective locale qui s'inscrit dans la régionalisation des comportements magdaléniens à cette période. Par les formes et sujets représentés (figures féminines, radioles d'oursin, insectes, rondelles), qui trouvent des récurrences d'un bout à l'autre de l'Europe, ces productions témoignent également de l'intensité des connexions interrégionales et donc du dynamisme des réseaux sociaux, étayant une nouvelle fois l'idée pressentie d'espaces magdaléniens connectés les uns aux autres.

## Conclusion

Cette recherche a permis d'apporter des résultats inédits sur l'exploitation des « pierres tendres noires » au Magdalénien : d'une part, en précisant les modalités et objectifs des productions (fabrication exclusive d'objets à valeur symbolique ; travail de ces matières adapté à leurs propriétés mécaniques particulières) ; et d'autre part, en documentant les natures et origines des roches exploitées (place centrale et diffusion du jais du Jura souabe, couplé à des exploitations sporadiques de schistes bitumineux). Les analyses devront se poursuivre par l'étude d'autres collections d'objets en « pierres tendres noires »

**“Ces productions témoignent également de l'intensité des connexions interrégionales et donc du dynamisme des réseaux sociaux.”**



**Figure 4** : Vues en mode fluorescence des jais analysés. a, b : jais géologique de référence des schistes à posidonies du Toarcien ; c : Neuchâtel-Monruz ; d : Petersfels ; e : grotte Blénien ; f : Freudenthal ; g : Holhe Fels ; h : Kesslerloch. Photos : B. Ligouis.

issues des sites magdaléniens du nord-ouest de l'Europe (Bassin parisien, Ardennes, Rhénanie, etc.) afin d'enrichir les données et cerner plus précisément la diversité et la complexité des stratégies techno-économiques magdaléniennes développées pour cette activité.

L'autre apport est d'ordre méthodologique, en ayant permis le développement d'une méthode d'analyse des objets en pierres tendres façonnées, jusqu'à présent encore peu investigués en Préhistoire. L'application de la pétrologie organique à l'étude des pièces en « pierres tendres noires » a permis de fournir des données détaillées sur la nature et l'origine géologique de ces roches qui, une fois couplées aux données techno-économiques, fournissent des informations essentielles sur les stratégies d'exploitation préhistoriques de ces matières. Cette recherche a représenté un premier jalon dans l'application de cette démarche qui peut désormais être systématisée dans l'étude des objets archéologiques réalisés en « pierres tendres noires ».

## Remerciements

Ce projet a été financé par une allocation postdoctorale de la Fondation Fyssen. Il a été mené entre janvier 2020 et avril 2021 à l'Institut d'Archéologie de l'université de Neuchâtel (Suisse), dans les locaux du Laténium - Parc et musée d'archéologie, sous la direction du professeur Matthieu Honegger. Ce projet a également reçu le soutien et l'accueil de la Fondation Maison Borel (Auvornier, Suisse). Je remercie les conservateurs des institutions détentrices des collections archéologiques qui m'ont autorisé leur accès et accompagné lors de mes analyses : Musée d'Art et d'Histoire de Genève, Museum zu Allerheiligen à Schaffhouse, Service archéologique cantonal du Schaffhouse, Musée des Cultures à Bâle, la Maison des Sciences de l'Homme Mondes à Nanterre. Je remercie également le PCR « *Du dernier maximum glaciaire à l'optimum climatique dans le Bassin parisien et ses marges. Habitats, sociétés et environnements* » (dir. L. Mevel et S. Griselin) pour le financement des analyses de pétrologie organique. Enfin, un remerciement particulier à Bertrand Ligouis et au Département de Géochronologie de l'université de Tübingen pour leur collaboration et investissement dans le volet pétrographique de ce projet.

## Références bibliographiques

- ADAM K.D., KURZ R. (1980) – *Eiszeitkunst im süddeutschen Raum*, Konrad Theiss Verlag GmbH, Stuttgart, 160 p.
- ADAM K. D. (2002) – *Die Skulptur einer Dasselfliegenderlarve aus einer Höhlenstation in der Schwäbischen Alb*, Ein Beitrag zur Ausdeutung von Kleinkunstwerken aus der Altsteinzeit des südwestdeutschen Raumes, Einhorn-Jahrbuch Schwäbisch Gmünd, Einhorn-Verlag GmbH, p. 179-200.
- AFFOLTER J., CATTIN M.-I., LEESCH D., MOREL P., PLUMETTAZ N., THEW N., WENDLING G. (1994) – Monruz : une nouvelle station magdalénienne au bord du lac de Neuchâtel, *Archéologie suisse*, 17-3, p. 94-104.
- ALBRECHT G., BERKE H., BURKERT W., HAAS-CAMPEN S., HAHN-WEISHAUP A. (1994) – Die Funde vom Petersfels in der städtischen Sammlung Engen im Hegau, *Fundberichte aus Baden-Württemberg*, 19-1, p. 1-62.
- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ E. (1999) – Las perlas de madera fósil del Terciario y los objetos de adorno-colgantes sobre dientes de zorro y ciervo del Magdaleniense de Gönnersdorf y Andernach-Martinsberg-2, (Neuwied, Rheinland Pfalz, Alemania), *Zephyrus*, 52, p. 79-106.
- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ E. (2000) – Rheinische Kleinkunst : Die Schmuckgegenstände aus Gagat, Fuchszähnen und Hirschgrandeln von Gönnersdorf und Andernach-Martinsberg-2 Fundplätze. Neuwied, Deutschland, *Archäologische Informationen*, 23 (1), p. 143-147.
- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ E. (2004) – *Azabache et alii* : la utilización del lignito durante el Paleolítico superior en Europa, in Allué E., Martín J., Canaés A. et Carbonell E. (eds.), *I. Congreso Peninsular de Estudiantes de Prehistoria*, Universitat Rovira i Vigili, Tarragona, p. 386-393.
- ÁLVAREZ FERNÁNDEZ E. (2005) – « Éloignés mais pas isolés » : la parure hors de la « frontière française » pendant le Magdalénien, in Dujardin V. (dir.), *Industries osseuses et parures du Solutréen au Magdalénien en Europe*, actes de la table-ronde sur le Paléolithique supérieur récent, Angoulême, 28-30 mars 2003, *Mémoire de la Société préhistorique française* 39, p. 25-38.
- AVERBOUH A., PROVENZANO N. (1998-1999) – Proposition pour une terminologie du



travail préhistorique des matières osseuses : I – Les techniques, *Préhistoire Anthropologie méditerranéennes*, 7-8, p. 5-25.

- BAYR. (1953) – Die Magdalénienstation am Hollenberg bei Arlesheim (Kanton Baselland), *Tätigkeitsberichte der Naturforschenden Gesellschaft Baselland*, 19, p. 164-178.

- BELLIER C., BOTT S., CATTELAÏN, P. (1991) – Fiche Rondelles, in : Camps-Fabrer H. (dir.), *Fiches typologiques de l'industrie osseuse préhistorique*, Cahier IV, Objets de parure, fiche 5, éditions de l'Université de Provence Aix-en-Provence, Aix-en-Provence, 25 p.

- BOSINSKI H. (1980) – Nachbildungen von Seeigel und Seeigelstacheln im Magdalénien, *Archäologisches Korrespondenzblatt*, 10 (1), p. 11-16.

- BOSINSKI G. (1982) – *Die Kunst der Eiszeit in Deutschland und in der Schweiz*, Kataloge Vor- und Frühgeschichte Altertümer, 20, Rudolf Habelt GMBH, Bonn, 92 p.

- BOURRILLON R., FRITZ C., SAUVET G. (2012) – La thématique féminine au cours du Paléolithique supérieur européen : permanences et variations formelles, *Bulletin de la Société Préhistorique Française*, 109-1, p. 85-103.

- BRAUN I. M. (2006) – Art mobilier magdalénien en Suisse, *Préhistoire, Art et Sociétés*, 60, p. 25-44.

- BULLINGER J. (2006) – Le jais, in Bullinger J., Leesch D. et Plumettaz N. (dir.), *Le site magdalénien de Monruz*, 1. Premiers éléments pour l'analyse d'un habitat de plein air, Archéologie neuchâteloise 33, Neuchâtel, Service et Musée cantonal d'archéologie, p. 158-164.

- BULLINGER J., LEESCH D., PLUMETTAZ N. (2006) – *Le site magdalénien de Monruz*, 1. Premiers éléments pour l'analyse d'un habitat de plein air, Archéologie neuchâteloise 33, Neuchâtel, Service et Musée cantonal d'archéologie, 227 p.

- DARASSE P., GUFFROY S. (1960) – Le Magdalénien supérieur de l'abri de Fontalès près Saint-Antonin (Tarn-et-Garonne), *L'Anthropologie*, 64, p. 1-35.

- GALASSO F., SCHMID-RÖHL A., FEISTBURKHARDT S., BERNASCONI S.M., SCHNEBELI-HERMANN E. (2021) – Changes in organic matter composition during the Toarcian Oceanic Anoxic Event (T-OAE) in the Posidonia

Shale Formation from Dormettingen (SW-Germany), *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 569, 110327, 14 p.

- GODART F. (2010) – *Sociologie de la mode*, coll. Repères, La découverte, Paris, 128 p.

- HAMAL-NANDRIN J., SERVAIS J. (1925) – La grotte dite « du Coléoptère », rapport sur les fouilles 1923-1924, *Revue Anthropologique*, 35, p. 120-144.

- HODDER I. (1991) – *The Meanings of Things. Material Culture and Symbolic Expression*, Harper Collins, London, 265 p.

- HÖNEISEN M., PEYER S. (1994) – *Schweizersbild, ein Jägerlager der Späteiszeit*, Schaffhauser Archäologie, 2, Schaffhausen, 236 p.

- KOEHLER H., ANGEVIN R., BIGNON-LAU O., GRISELIN S. (2013) – Découverte de plusieurs occupations du Paléolithique supérieur récent dans le sud de l'Alsace, *Bulletin de la Société préhistorique française*, 110 (2), p. 356-359.

- LANGLAIS M. (2010) – *Les sociétés magdaléniennes de l'isthme pyrénéen*, éditions du CTHS, Paris, 336 p.

- LAINEY J. C. (2004) – *La « monnaie des sauvages ». Les colliers de wampum d'hier à aujourd'hui.*, Septentrion, Sillery (Québec), 283 p.

- LEESCH D. (1997) – *Hauterive-Champréveyres*, 10. *Un campement magdalénien au bord du lac de Neuchâtel. Cadre chronologique et culturel, mobilier et structures, analyse spatiale (secteur 1)*, Archéologie neuchâteloise 19, Neuchâtel, Service et Musée cantonal d'archéologie, 272 p.

- LEESCH D., MÜLLER W., NIELSEN E., BULLINGER J. (2012) – The Magdalenian in Switzerland: Re Colonization of a Newly Accessible Landscape, *Quaternary International*, 30, p. 1-18.

- LEESCH D., BULLINGER J., MÜLLER W. (2019) – *Vivre en Suisse il y a 15 000 ans. Le Magdalénien*, Archéologie suisse (Préhistoire de la Suisse), Bâle, 175 p.

- LEROI-GOURHAN A., BRÉZILLON M. (1966) – L'habitation magdalénienne n°1 de Pinchevent près Montereau (Seine-et-Marne), *Gallia Préhistoire*, 9-2, p. 263-385.

- LE TENSORER J.-M. (1998) – *Le Paléolithique en Suisse*, Jérôme Million, Grenoble, 499 p.

- LIGOUIS B. (2006) – Jais, lignite, charbon et autres matières organiques fossiles : application de la pétrologie organique à l'étude des éléments de parure et des fragments bruts, in : Bullinger J., Leesch D. et Plumettaz N. (dir.), *Le site magdalénien de Monruz, 1. Premiers éléments pour l'analyse d'un habitat de plein air*, Archéologie neuchâteloise 33, Neuchâtel, Service et Musée cantonal d'archéologie, p. 197-216.
- MAUSER P.F. (1970) – *Die jungpaläolithische Höhlenstation Petersfels im Hegau*, Badische Fundberichte, Sonderheft 13, 127 p.
- MAUSS M. (1923-1924) - Essai sur le don : forme et raison de l'échange dans les sociétés archaïques, *L'Année Sociologique*, I, p. 30-186.
- MERK K. (1875) – *Der Höhlenfund im Kesslerloch bei Thayngen (Kanton Schaffhausen)*, Mitteilungen der Antiquarischen Gesellschaft, Zürich, 44 p.
- MERLET J.-C., PLASSARD F., CHAUVIÈRE F.-X. (2016) – L'art mobilier et la parure du gisement magdalénien de l'Abri Durif à Enval (Vic-le-Comte, Puy-de-Dôme, France), in : Cleyet-Merle J.-J., Geneste J.-M., Man-Estier E. (dir.), *L'art au quotidien. Objets ornés du Paléolithique supérieur*, actes du colloque international, 16-20 juin 2014, Les Eyzies-de-Tayac, Paléo, numéro spécial, p. 401-423.
- MEVEL L. (2017) – *Des sociétés en mouvement. Évolution des sociétés magdaléniennes et aziliennes des alpes du nord françaises*, éditions du CTHS, Paris, 329 p.
- NIELSEN E.H. (2018) – Die späteiszeitliche Fundstelle Moosseedorf, Moosbühl 1, *Archäologie Bern/Archéologie Bernoise*, p. 208-241.
- PESCHAUX C. (2017) – *La parure des sociétés du Dernier Maximum Glaciaire. Evolution des pratiques et traditions ornementales entre la fin du Solutréen, le Badegoulien et le début du Magdalénien dans les Bassins parisiens, ligérien et aquitain*, thèse de Doctorat, université de Paris 1 Panthéon-Sorbonne, 296 p.
- PESCHAUX C. (2019) – Les perles, in Begouën R., Pastoors A., Clottes J. (dir.), *La grotte d'Enlène. Immersion dans un habitat magdalénien*, In Fine éditions d'Art, Paris, Association Louis Begouën, Montesquieu-Avantès, 2019, p. 278-284.
- PION G., MEVEL L. (2005) - Nouvelles recherches sur les occupations tardiglaciaires dans les Alpes du nord françaises : premiers résultats des fouilles de l'abri des Douattes (Musièges - Haute-Savoie), *Antiquités Nationales*, 35, p. 63-68.
- PRAUSS M., LIGOUIS B., LUTERBACHER H.P. (1991) – Organic matter and palynomorphs in the "Posidonienschiefer" (Toarcian, Lower Jurassic) of southern Germany, in: Tyson R.V., Pearson T.H. (eds), *Modern and Ancient Continental Shelf Anoxia*, Geological Society of London, special publication, 58, p. 335-351.
- PREUSCHOFT-GUTTLER A. (1995) – *Untersuchungen zur Präzision des Begriffs « Gagat » im Magdalénien Südwestdeutschlands und der Schweiz*, Magisterarbeit an der Geowissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen (unveröffentlicht), 186 p.
- RIEGRAF W. (1985) – *Mikrofauna, Biostratigraphie und Fazies im unteren Toarcium Südwestdeutschlands und Vergleiche mit benachbarten Gebieten*, Institut für Geologie und Paläontologie, Tübinger Monographien Mikropaläontologische Mitteilungen, 3, Tübingen, 232 p.
- SANDERS J.-M. (2002) – Ethnic Boundaries and Identity in Plural Societies, *Annual Review of Sociology*, 28, p. 327-357.
- SCHMID E. (1975) – Neue Objekte der altsteinzeitlichen Kunst, *Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel*, 86, p. 343-347.
- SCHMIDER B., VALENTIN B., BAFFIER D., DAVID F., JULIEN M., LEROI-GOURHAN A., MOURER-CHAUVIRE C., POULAIN T., ROBLIN-JOUVE A., TABORIN Y. (1995) – L'Abri du Logopède (Fouilles Leroi-Gourhan) et le Magdalénien des Grottes de la Cure (Yonne), *Gallia Préhistoire*, 35, p. 55-114.
- SEDLMEIER J. (1982) – *Die Hollenberg-Höhle 3. Eine Magdalénien-Fundstelle bei Arlesheim, Kanton Basel-Landschaft*, Derendingen-Solothurn, Basler Beiträge zur Ur- und Frühgeschichte 8, 101 p.
- SMITH A.B., WRIGHT C.W. (1989) - British Cretaceous echinoids. Part 1, general introduction and Cidaroida, *Monograph of the Palaeontological Society*, 578 London, p. 1-101.
- STACH E., MACKOWSKY M.-T., TEICHMÜLLER M., TAYLOR G.H., CHANDRA D., TEICHMÜLLER R. (1982) – *Stach's textbook of coal petrology*, Gebrüder Bornträger, Berlin, 535 p.

- TEICHMÜLLER M. (1992) – Organic petrology in the service of archaeology, *International Journal of Coal Archaeology*, 20, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 1-21.

- VERSWIJVER G. (1986) – Analyse comparative des parures Nahua : similitudes et différences, *Bulletin Annuel du Musée d'Ethnographie de la Ville de Genève*, 29, p. 25-67.

- WORM H. (1980) – Zwei Anhänger aus der Höhle im Freudenthal, Kanton Schaffhausen (Schweiz), *Archäologisches Korrespondenzblatt*, 10, p. 9-10.

## Introduction

From yesterday to today, body adornments often fulfil a role of identification of the wearer through a symbolic game where the inherent properties of the object of adornment have an important place. A quick glance at clothes and clothing accessories allows one to identify one's own from others and the status of individuals (gender, age, social rank, etc.). In this sense, clothing allows human societies to develop their own social symbolism and thus to create a collective identity. It therefore contributes to the feeling of belonging to a community and therefore to the affirmation of human groups (Verswijver 1986; Hodder, 1991; Sanders, 2002; Godart, 2010). Moreover, by being both symbols and objects of prestige, ornaments have been universally used in the economic and diplomatic relations of traditional populations to maintain social links and positions of power between intercultural groups, notably through a regular exchange of materials and ornamental productions (cf. examples of the Kula in the Pacific: Mauss, 1923-1924; or the Wampum in North America: Lainey, 2004). The study of ornamental objects discovered in an archaeological context has great potential for providing information on the lifestyles of past human societies, by providing information on the ways in which individuals chose to identify and distinguish themselves within their community, their regional group and their culture, but also to communicate and interact with neighbouring human groups that were more or less distant.

The research here focuses on an original practice consisting of an intensified use of 'black soft stones' in the production of ornaments among the populations of the late Magdalenian period

(15-13 ka BP), with the aim of documenting the diversity of the types of objects produced and their distribution, the methods of manufacture, as well as the exact nature of the materials used, their origin(s) and their distribution. Objects produced in 'black soft stones' are found almost everywhere in Western Europe at the end of the Magdalenian period (evidence exists as far as the Cantabrian mountains, southwestern France, the Paris Basin, the Ardennes, the Rhineland and Thuringia, indicating a widespread practice: Leroi-Gourhan and Brézillon, 1966; Álvarez Fernández, 1999, 2000, 2004, 2005; Merlet et al, 2016; Peschaux, 2019), but they are especially numerous and frequent in the sites of the Jura Arc and its margins (Bosinski, 1982; Bullinger, 2006). The Jurassic area corresponds to a mountainous territory newly (re)invested by man because it was previously made inhospitable by the Würmian glaciation (Mevel, 2017; Leesch et al., 2019). The intensified use of black rocks is therefore part of a context of environmental and social mutation (enlargement of territories in the context of deglaciation, demographic growth, regionalisation of cultural phenomena, increased circulation of materials: Langlais, 2010; Mevel, 2017) which certainly led to the development of new territorial and economic issues that could have led to global reworking of identities, social interactions and spatial occupation modalities. On the scale of the Upper Palaeolithic, the Magdalenian period corresponds to a time when new ways of adornment appeared, whether in terms of the preferred materials or the methods of manufacture and attachment used (Peschaux, 2017). Consequently, the analysis of the production of ornaments in the Jura Arc is a favourable field of study for research into the mechanisms leading to the development of new forms of ornamentation.

The other issue at stake in this project is methodological, with the development of analysis methods for shaped soft rocks, whose informative potential is still clearly under-exploited in prehistory. While archaeologists have until now tended to group them indiscriminately under global names (*lignites* in French; *gagat* in German; *jet* in English), the 'black soft stones' in fact correspond to a diversity of carbonaceous organogenic rocks (bituminous shales, sapropelic coals, boghead, torbanite, etc.) and coal-bearing woods (jet, xylite, vitrain, etc.) present in geolo-

gical formations from the Palaeozoic to the Cenozoic (Teichmüller, 1992). Apart from their colour, which varies from brown to intense black, the advantage of these materials is that they are soft and light rocks (with hardnesses between 2 and 3 on the Mohs scale) which, due to their flexible mechanical properties, are easy to work with and have the particularity of offering a shiny and silky surface once polished, which gives them a strong aesthetic power. In order to better characterise the black rocks used by the Magdalenian populations, organic petrology methods were integrated into the study of ornamental objects (in collaboration with Bertrand Ligouis, University of Tübingen), which provided new information on the ways in which they were exploited during the Magdalenian period (nature, lithological facies, possible geographical origins, desired mechanical properties).

### Material et methods

The Magdalenian sites of the Jura Arc have mainly been the subject of old investigations (late 19th/mid-20th century), nevertheless supplemented by rare recent excavations (Neuchâtel-Monruz, Hauterive-Champréveyres, Blénien cave, Les Douattes: Affolter et al, 1994; Leesch, 1997; Pion and Mevel, 2005; Bullinger et al, 2006; Koehler et al, 2013). Despite this history – which implies chronostratigraphic inaccuracies and a dispersal of collections – all of the material discovered at these sites can be attributed to the late Magdalenian *largo sensu* (middle, recent and final phases: Le Tensorer, 1998; Leesch et al., 2012). In order to obtain an overview, a reasoned, up-to-date and exhaustive inventory of the black stone objects found in the Magdalenian sites of the Jura Arc was drawn up (by bibliography and consultation of archaeological collections). A little over 4000 pieces (nearly 300 finished objects and several thousand manufacturing wastes) from 21 sites were listed (**tabl. 1; fig. 1**), of which approximately 3000 were directly studied and subjected to morphometric and technological analyses (i.e., descriptions of the objects' shapes, measurements, studies of the traces of anthropic modifications).

The state of conservation of the objects varies: some have smooth, well-preserved surfaces, while others show fractures, porosities, changes in colour (often rust or lightening) or disintegration into sheets that follow the stratification

planes of the material. This alteration, more or less intense, is linked to the transit of the objects in sediments not adapted to the good conservation of these materials, which could in rare cases limit their study.

The materials were analysed using the organic petrology method (Teichmüller, 1992; Preuschoft-Güttler, 1995; Ligouis, 2006). This method is based on a detailed characterisation of the composition and structuring of the material, with a view to comparing it with a reference base of known geological and archaeological samples (here, that of the Geoarchaeology Department of the University of Tübingen). The analysis is carried out on the basis of a millimetre-sized sample of material taken from the archaeological object (using a non-destructive policy, in recent breaks or cracks) which is studied in reflected white light and in fluorescence mode using a metallographic microscope. The examination takes into account a series of criteria useful for interpretation (colour, luster, fracture appearance, hardness, paper trace, weathering), measures the degree of weathering and homogenisation/bituminisation of the material and includes a semi-quantitative and structural analysis of the organic and mineral constituents. This analysis was applied to archaeological finds from 12 sites: Petersfels, Munzingen, Hohle Fels and Kesslerloch (Preuschoft-Güttler, 1995); Neuchâtel-Monruz and Hauterive-Champréveyres (Ligouis, 2006); Schweizersbild, Freudenthal, Vorder Eichen, Veyrier-Etrembières, Les Douattes and the Blénien cave (previously unpublished).

### Results

#### Types of objects

The types of objects produced correspond mainly to items of adornment, to which are added a few pieces of furniture art: plates and other movable supports for artistic engraving, representing mainly horses and motifs evoking plants (Merk, 1875; Mauser, 1970; **tabl. 1; fig. 2**, no. 1 and 2).

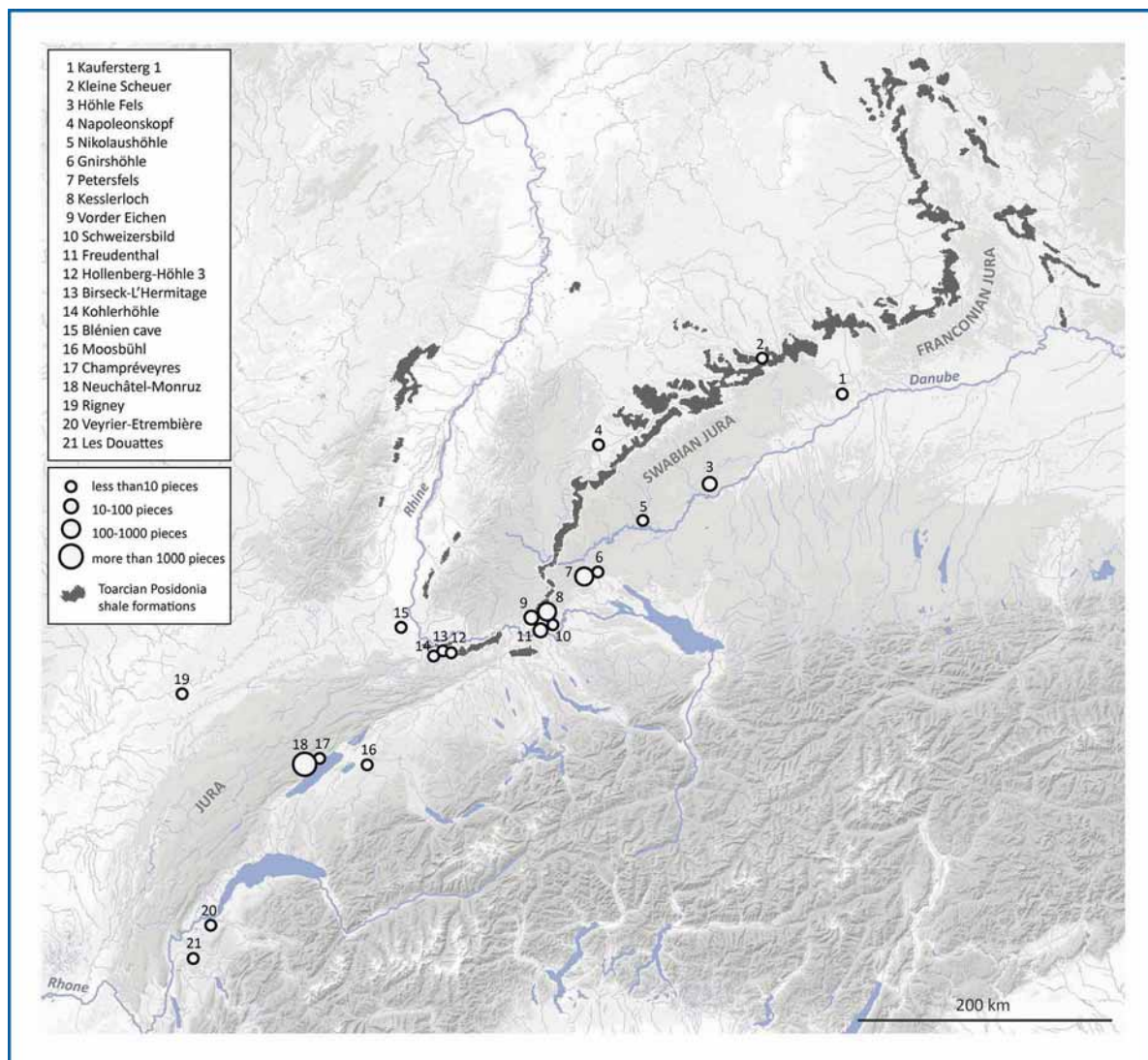
The composition of ornamental objects is dominated by beads, 5-10 mm in diameter, which consist of a wide variety of geometric morphotypes including discoid, cylindrical, spherical, biconical, rectangular and 'drop' shapes (**Fig. 2**, nos. 3-6). The larger rondelles (35-45 mm diameter) are discs with holes in the centre (**Fig. 2**, no. 9). This type of ornament is common throu-

	Bead	Rondelle	Biforate plate	arched piece	Pendant "feminine figure"	Pendant "urchin spine"	Pendant "insect"	Others pendants	Undetermined finished objects	Movable art	Manufacturing waste	TOTAL
Les Douattes	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Veyrier-Etrembières	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	3
Neuchâtel-Monruz	2	-	5	1	3	-	-	1	-	-	>3500	>3512
Hauterive-Champréveyres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	5
Moosbühl	5	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	6
Rigney	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Blénien Cave	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Kohlerhöhle	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hollenberg-Höhle 3	-	1	-	-	1	-	-	-	1	-	2	5
Birseck-L'Hermitage	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Schweizersbild	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
Freudenthal	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	6	10
Kesslerloch	7	4	-	5	-	8	1	2	11	4	>200	>242
Vorder Eichen	1	-	-	2	-	-	-	1	-	1	12	17
Gnirshöhle	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Petersfels	123	13	17	20	19	-	2	-	21	-	>200	>415
Nikolaushöhle	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Napoleonskopf	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
Hohle Fels	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	7	10
Kleine Scheuer	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Kaufertsberg 1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>144</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>30</b>	<b>25</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>34</b>	<b>5</b>	<b>&gt;3934</b>	<b>4234</b>

**Table 1:** Number of 'black soft stone' objects per site and per type from Magdalenian sites in the Jura Arc. x: presence, no quantitative data.

ghout the Magdalenian space, with examples more commonly made of bone and, more rarely, of various mineral materials (Bellier et al., 1991). The biforate plates are flat objects (around 3 mm

thick) with a varied shape (oval, triangular, bean-shaped) of 15-20 mm in length, which have the particularity of being fitted with two perforations (Fig. 2, nos. 7 and 8). The shape of the arched



**Figure 1:** Magdalenian sites in the Jura Arc that have yielded objects made of 'black soft stone'. Map background: GIS G. Encelot, SRTM (relief), Openstreetmap (hydrography).

pieces is a more or less elongated triangle (30 mm long for the shortest and up to 70 mm for the longest) with a rounded top and bevelled ends (fig. 2, nos. 10 and 11). The arched pieces have a central perforation on the side or, more rarely, a central notch on the upper side.

The 'black soft stones' were also used to make pendants (i.e., objects with holes at one end), the particularity of which is that some of them are figurative, although schematic, and made in the round. Amongst the best-known elements, the schematised pierced feminine figures, known as "Petersfels", are particularly remarkable (Fig. 2,

nos. 18-20). Generally small in size – around 15-20 mm in length, more rarely up to 40 mm - the shape of these pendants is divided into three volumes without figurative details: a headless trunk with a flat appendage and a rectangular cross-section on which the perforation is generally installed; a protruding buttock; and lower limbs of reduced proportions, with joined legs that cannot be individualised and without feet, ending in a mossy point (Bullinger, 2006). This 'Gönnersdorf-Lalinde' type of representation of the female figure is a recurrent motif in the Magdalenian period, which is found in the form

of statuettes and in movable and parietal engravings throughout Europe (Bourrillon et al., 2012). In this form, these pendants are identified at Petersfels (Mauser, 1970) and at Neuchâtel-Monruz (Bullinger, 2006). Possible more controversial fragments have also been mentioned at Hollenberg-Höhle 3 (Bay, 1953; Sedlmeier, 1982) and at Höhle Fels (Álvarez Fernández, 2004). In addition, schematic female representations of different form - extended legs, legs and chest individualised by short central longitudinal cuts - exist at the Schweizersbild (**Fig. 2**, no. 21; Schmid, 1975; Höneisen and Peyer, 1994) and Petersfels sites (Braun, 2006). The latter are not perforated, but appear to be unfinished and abandoned in the course of manufacture.

Another type of pendants are imitations of fossil sea urchin spines (Bosinski, 1980). Their elongated shape (25-40 mm long) consists of a quadrangular cross-sectional stem and a knob at the distal end (**fig. 2**, nos. 12-14). The proximal end, where the perforation is made, takes various forms: spatulate, ogival or cordial. This variability is reminiscent of the primary spines of regular urchins, in particular those belonging to the fossil forms of the order Cidaroides (Cidaroida), which have original shapes and are frequent in Mesozoic geological formations, particularly in the Jura Arc (Smith and Wright, 1989). It should be noted that ivory specimens are mentioned in Freudenthal (Worm, 1980), as well as in the south-west of France, at Mas d'Azil and Laugerie-Basse (Bosinski, 1980).

A last type of pendant corresponds to representations of insects. In the Jura Arc, there is a specimen at Petersfels of a probable beetle (mentioned as a 'beetle' or 'hedgehog') which is fitted with a lateral perforation in the centre of the piece (**Fig. 2**, no. 17; Mauser, 1970; Adam and Kurz, 1980). The Kleine Scheuer site yielded a larva interpreted as a reindeer fly with a broken perforation at one end (Bosinski, 1982; Adam, 2002). At the Kesslerloch, an unperforated piri-form object covered with a decoration of short incisions also suggests a possible representation of an insect or larva (Bosinski, 1980, 1982). Other specimens exist outside the study area: at the Trilobite cave in Arcy-sur-Cure (a bifurated specimen of a beetle interpreted as a "bupreste": Schmider et al, 1995), at the Grotte du Coléoptère in Belgium (a bifurated specimen in ivory: Hamal-

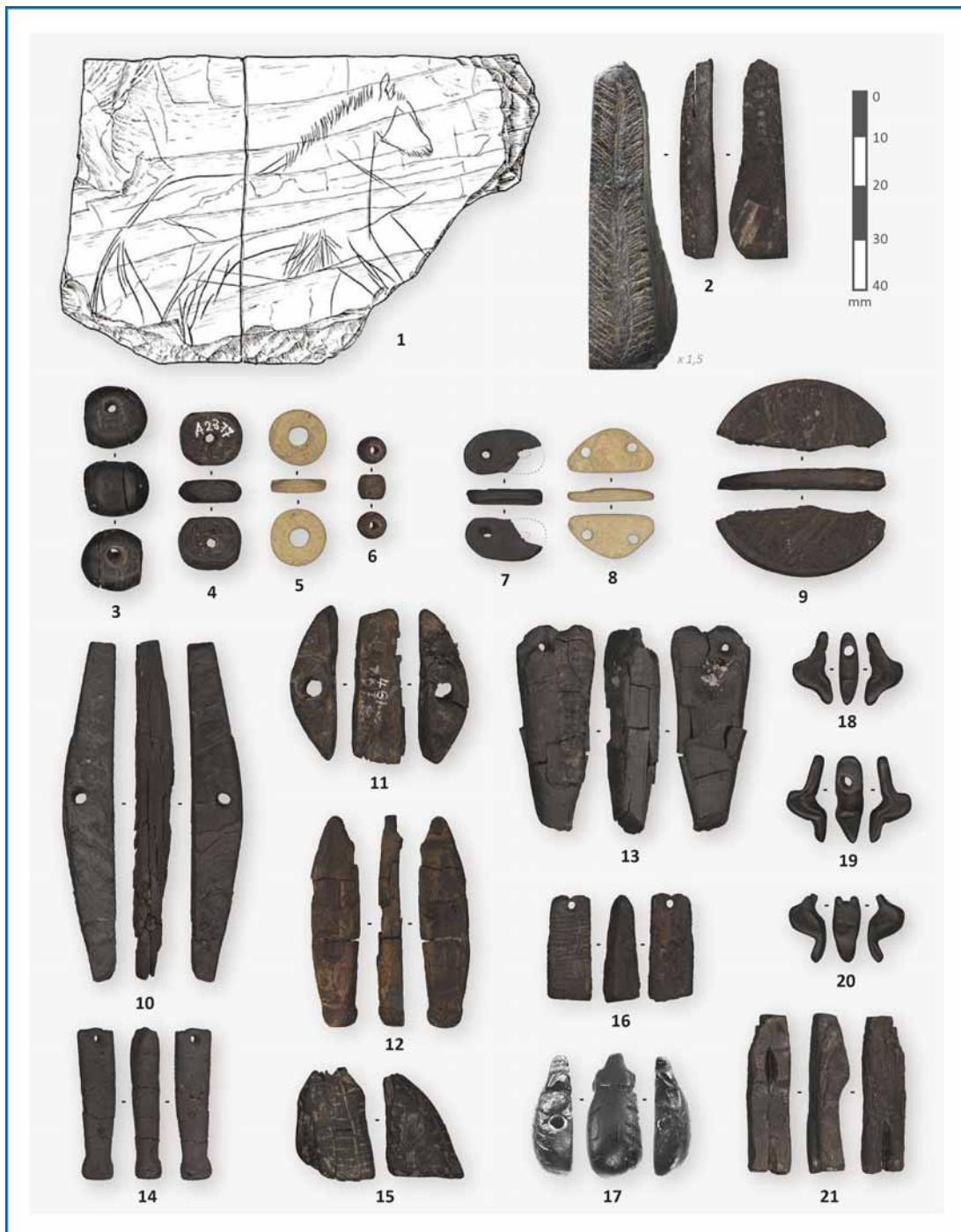
Nandrin et Servais, 1925) and two other more doubtful pieces at Fontalès (Darasse et Guffroy, 1960) and at the Abri Durif in Enval (Merlet et al., 2016).

### Manufacturing techniques

In addition to the finished objects, several sites yielded small blocks, fragments and sketches of 'black soft stone', which were more or less well represented depending on the site and the excavation conditions (**Tab. 1**). These elements show that these materials were worked directly on the sites. Among the pieces studied, a part of wastes shows clear traces of anthropic modifications (see below). The others show no apparent traces but can, at least for the majority of them, still be considered as manufacturing waste corresponding to portions of imported raw material or to various scraps produced during the manufacture of the objects.

Amongst the wastes that show traces of anthropic modification, some are flakes whose identified morphotechnical characteristics (bulb, shock waves, lancets on the splintering face; previous removal negatives on the outer face) are similar to those observed on flint knapping products. On the one hand, they take the form of large flakes of 30-60 mm in length which, for some of them, show the beginnings of a recovery consisting of a series of small removal negatives on the periphery. On the other hand, these flakes may be very small, less than 10 mm long (**Fig. 3**). Also worth mentioning are two objects from the Petersfels that show clear removal negatives (Mauser, 1970; Albretcht et al., 1994). All of these pieces indicate the use of percussion for the working of the 'black soft stones', in particular for the obtaining and initial shaping of the supports on which the objects are then shaped.

The other wastes with traces of manufacture correspond to fragments that show grooving, scraping and/or abrasion on one or more faces, which also testify to the use of finer techniques, better known for being used in the working of bone materials (Averbouh and Provenzano, 1998-1999). The technological observations made on the finished objects show that the final shaping of the objects used these techniques: scraping for shaping and then abrasion and polishing for the regularisation of the surfaces. The perforations are made by bifacial rotary scraping, sometimes preceded by scraping inci-



**Figure 2:** Objects produced in 'black soft stone' from Magdalenian sites in the Jura Arc. 1: plate engraved with a horse (Mauser, 1970); 2: "Baguette" engraved with a possible vegetal motif (enlarged view: Bettina Jacot-Descombes © Musées d'art et d'histoire, Ville de Genève); 3-6: beads; 7-8: biforate plates; 9: rondelle; 10-11: arched pieces; 12-14: pendants of the "sea urchin radiolae" type, respectively ogival, cordiform and spatulate; 15-16: other decorated pendants; 17: pendant of the "insect" type (Adam and Kurz, 1980); 18-21: pendants of the "female figure" type. Photos: C. Peschaux, unless otherwise stated.





**Figure 3:** Small shaped flakes of jet obtained by percussion identified at the Neuchâtel-Monruz site (Switzerland). Scale (white line): 3 mm. Photos: C. Peschoux.

sions that may have been used to mark the location of the hole, to start the hollowing and to create a wedge for the application of the rotary scraping. The decorations and engravings on the objects are made by incision with a lithic point.

#### Materials used: nature and origin

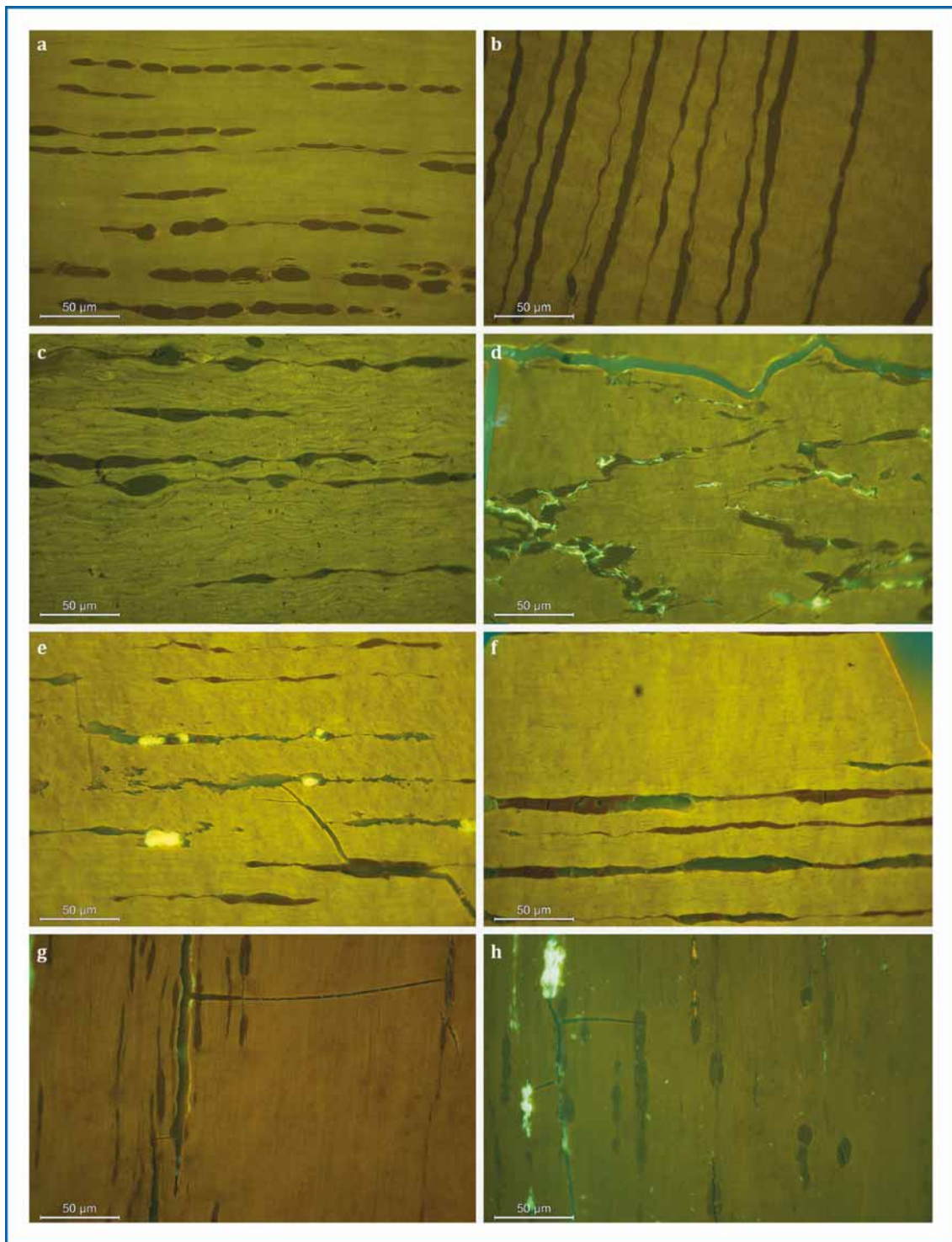
The organic petrology analyses reveal that the objects are mostly made of jet (98% of the corpus analysed). Geologically, jet corresponds to a fragment of driftwood (generally Gymnosperms) that has undergone phases of humification, gelation and bituminisation during its diagenesis (Stach et al., 1982). In the fresh state, it is a black, shiny material, with a greasy appearance and therefore soft but with a conchoidal fracture, which has the advantage of possessing both flexible and rigid mechanical properties. All the jet samples analysed here have identical structures characterised by a high degree of bituminisation (and therefore homogenisation of the structure) and by a strong compression of the tissues (dark grey in colour) and cells (filled with humic matter, reddish-brown in colour) which, when juxtaposed in a string, draw discontinuous sinuous bands (Fig. 4). These characteristics constitute a petrographic signature that indicates a common geological origin for all the pieces analysed, corresponding to the Posidonia shale formations (*Posidonienschiefer* in German; *Schiste bitumineux à posidonies* in French) of the Lower Toarcian (geological reference samples: R7 Balingen and Hechingen 2014, SW Germany). These formations are very bituminous and rich in jet where this resource is present in the form of lenses of variable size, ranging from millimetre to metre depending on the size of the fossilised wood

fragment (twig, branch, trunk; Riegarf, 1985; Prauss et al., 1991). Regionally, Posidonia schists are mainly found in outcrops on the eastern slopes of the Swabian Jura as far as the Franconian Jura and, more sporadically, in the upper Rhine valley (Fig. 1; Galasso et al., 2021).

In complement, rare objects are made from light yellow-brown bituminous shale (Fig. 2, nos. 5 and 8). They correspond to beads and biforate plates found in Neuchâtel-Monruz (3 specimens: Bullinger, 2006) and Moosbühl (2 specimens: Nielsen, 2018). This material, composed of alternating light and darker laminae, is now poor in bituminite (hence its light colour; Ligouis, 2006). The colour of the rock must have been darker originally (with post-depositional alteration of the bitumens experienced at the archaeological site), but was in any case lighter in hue than the jet. At this stage, the origin of this oil shale is not defined.

#### Discussion

The results obtained confirm that the Magdalenian exploitation of 'black soft stone' was mainly dedicated to the production of objects of symbolic value (ornamental objects and movable art supports). This choice is probably based on their particular properties, which, by combining aesthetic advantages (black colour, smooth and shiny surface) and mechanical advantages (flexible and rigid material allowing the application of a wide range of techniques), allowed the production of ornaments of various shapes, ranging from simple geometric forms (beads, rondelles, plates, arched pieces) to more complex



**Figure 4:** Fluorescence views of the analysed jet. a, b: geological reference jet of the Toarcian *Posidonia* schists; c: Neuchâtel-Monruz; d: Petersfels; e: Blénien cave; f: Freudenthal; g: Holhe Fels; h: Kesslerloch. Photos: B. Ligouis.

and figurative forms (feminine representations, urchin spines and insects).

The organic petrology analyses tell us that the rocks used are surprisingly little diversified, with a major exploitation of black jet, with rare productions of lighter coloured oil shales. Although the origin of the identified jet is limited to the north-east of the Jura Arc, in the Posidonia formations of the Toarcian of the Swabian Jura, this material has nevertheless been identified on all the Magdalenian sites in the area under consideration, from one end of the Jura massif to the other. This circulation, over at least 300 km, suggests a particular attraction for this material and implies the implementation of specific acquisition strategies that allowed this wide diffusion (probably, contacts and regular exchanges between Magdalenian human groups).

The presence of numerous manufacturing wastes, both in sites close to the sources of supply (such as Kesslerloch and Petersfels) and in more distant sites (such as Neuchâtel-Monruz), seems to indicate a circulation of jet as raw material rather than as already produced objects. In so far as the types of ornament produced are repeated from one site to another, the cultural baggage (and associated aesthetic codes) seems to have spread along with the material. However, the most distant recurrences are made in other materials (bone discs and ivory representations of urchin spine and insect) or in other forms (statuettes and engravings of feminine representations), which suggests that the ideas may have spread more widely than the material.

The production of 'black soft stone' ornaments is thus an important component of the Magdalenian sites of the Jura Arc. It developed at the time of the post-glacial reoccupation of this area, materialising a reappropriation of the territory through the exploitation of a regional resource. These productions certainly contributed to the creation of a local collective identity, which is part of the regionalisation of Magdalenian behaviour at this period. Through the forms and subjects represented (feminine figures, urchin spines, insects, discs), which are recurrent

throughout Europe, these productions also bear witness to the intensity of inter-regional connections and therefore to the dynamism of social networks, once again supporting the presumed idea of interconnected Magdalenian spaces.

## Conclusion

This research has made it possible to provide new results on the exploitation of 'black soft stones' at the Magdalenian period: on the one hand, by specifying the methods and objectives of production (exclusive manufacture of objects with symbolic value; working of these materials adapted to their particular mechanical properties); and on the other hand, by documenting the nature and origins of the rocks exploited (central place and diffusion of jet from the Swabian Jura, coupled with sporadic exploitations of bituminous shale). The analyses will have to be continued by studying other collections of objects made of 'black soft stone' from Magdalenian sites in north-western Europe (Paris Basin, Ardennes, Rhineland, etc.) in order to enrich the data and to identify more precisely the diversity and complexity of the Magdalenian techno-economic strategies developed for this activity.

The other contribution is methodological, having allowed the development of a method for the analysis of shaped soft stone objects, which until now have been little investigated in prehistory. The application of organic petrology to the study of 'black soft stone' objects has provided detailed data on the nature and geological origin of these rocks which, when coupled with techno-economic data, provide essential information on the prehistoric exploitation strategies of these materials. This research represented a first step in the application of this approach, which can now be systematised in the study of archaeological objects made of "black soft stones".

## Acknowledgements

This project was funded by a postdoctoral grant from the Fyssen Foundation. It was carried out between January 2020 and April 2021 at the

**“These productions also bear witness to the intensity of inter-regional connections and therefore to the dynamism of social networks.”**

Institute of Archaeology of the University of Neuchâtel (Switzerland), on the premises of the Laténium – Parc et musée d'archéologie, under the supervision of Professor Matthieu Honegger. This research was also supported and hosted by the Fondation Maison Borel (Auvornier, Switzerland). I would like to thank the curators of the institutions holding the archaeological collections who allowed me access and accompanied me during my analyses: Musée d'Art et d'Histoire de Genève, Museum zu Allerheiligen in Schaffhausen, Service archéologique cantonal du

Schaffhouse, Musée des Cultures in Basel, Maison des Sciences de l'Homme Mondes in Nanterre. I would also like to thank the PCR “ *Du dernier maximum glaciaire à l'optimum climatique dans le Bassin parisien et ses marges. Habitats, sociétés et environnements*” (dir. L. Mevel and S. Griselin) for the funding of organic petrology analyses. Lastly, special thanks to Bertrand Ligouis and the Department of Geoarchaeology of the University of Tübingen for their collaboration and investment in the petrographic part of this project.

## Remerciements

Nous remercions pour leur collaboration les auteurs soutenus dans leurs travaux de recherche par la Fondation Fyssen, nos lecteurs pour leur fidélité, et tous nos correspondants et bibliothèques qui permettent la libre consultation de notre revue.

We thank for their collaboration the authors supported in their research works by the Fyssen Foundation, our readers for their fidelity, and all our correspondents and libraries which allow the free consultation of our review.

Achévé d'imprimer en juin 2022  
Sur les presses numériques