

PRIX DE THÈSE D'UNIVERSITÉ DE L'AVF 2022 : UNE APPROCHE TRANSLATIONNELLE DE LA RECHERCHE SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SCHIZOPHRÉNIE ET LES INTERACTIONS GÈNES-ENVIRONNEMENT

UNIVERSITY THESIS PRIZE OF THE AVF 2022 : A TRANSLATIONNAL APPROACH OF RESEARCH ON THE PATHOPHYSIO- LOGY OF SCHIZOPHRENIA AND GENES-ENVIRONMENT INTERACTIONS

Par Fanny DEMARS¹, Boris CHAUMETTE², Thérèse JAY³, Marco POMPILI^{4*}, Marie-Odile KREBS^{5*}

(manuscrit reçu le 18 mai 2023, accepté le 28 août 2023)

RÉSUMÉ

Cet article présente mon travail de thèse (« Variabilité interindividuelle des réponses comportementales face aux interactions entre gènes et environnement ») qui a été dirigé par le Pr Krebs et récompensé par le prix de thèse d'université de l'Académie Vétérinaire de France 2022. La schizophrénie est une maladie fréquente qui résulte de facteurs environnementaux et génétiques. Identifier des biomarqueurs associés à la physiopathologie de l'apparition de la maladie est nécessaire pour développer des stratégies thérapeutiques précoces et personnalisées pouvant prévenir ou limiter la progression des symptômes. Pour cela, nous avons développé une approche translationnelle en travaillant chez l'être humain et sur des modèles animaux. Cette thèse a permis d'étudier les mécanismes sous-jacents au développement de la schizophrénie parmi des personnes à risque et de proposer des pistes d'amélioration des modèles animaux utilisés dans la recherche sur les maladies psychiatriques à travers l'exemple des modèles d'extinction d'une peur conditionnée.

Mots-Clés : Schizophrénie, psychose, ultra-haut risque, 22q11DS, vulnérabilité interindividuelle, stress, extinction de la peur, modèle animal, épigénétique

ABSTRACT

This article presents my thesis work ("Interindividual variability of behavioral responses to gene-environment interactions") which has been directed by Pr Krebs and awarded the 2022 university thesis prize of the Académie Vétérinaire de France. Schizophrenia is a common disease resulting from environmental and genetic factors. The identification of biomarkers associated with the pathophysiology of the onset of the disease is necessary to develop early and personalized therapeutic strategies to prevent or limit the progression of symptoms. For this purpose, we have developed a translational approach, i.e. at the interface between the environment and human and animal health, by working in humans and animal models. This thesis allowed us to study the mechanisms underlying the development of schizophrenia in individuals at risk and to propose ways to improve the animal models used in research on psychiatric diseases through the example of fear extinction model.

Keywords: Schizophrenia, psychosis, at-risk mental state, ultra-high risk, 22q11DS, interindividual vulnerability, stress, fear extinction, animal model, epigenetic

1- DVM PhD, ORCID 0000-0002-4816-1511, Vetoadom Alpin – Institut de Psychiatrie, 9 rue Colonel Denfert Rochereau 38000 Grenoble, France.

Courriel : fanny.demars@vetoadom-alpin.com

2- MD PhD, ORCID 0000-0002-1313-2788, Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, GHU Paris Psychiatrie et Neurosciences, Paris, France.

Courriel : boris.chaumette@inserm.fr

3- PhD, ORCID 0000-0003-3553-9236, Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, GHU Paris Psychiatrie et Neurosciences, Paris, France.

Courriel : therese.jay@inserm.fr

4- PhD, ORCID 0000-0003-3567-6345, Aix Marseille Université, INSERM, INS, Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France.

Courriel : marco.pompili@normalesup.org

5- MD PhD, ORCID 0000-0002-4715-9890, Université Paris Cité, Institute of Psychiatry and Neuroscience of Paris, GHU Paris Psychiatrie et Neurosciences, Paris, France.

Courriel : marie-odile.krebs@inserm.fr

* Co derniers auteurs



INTRODUCTION

Les pathologies psychiatriques constituent un enjeu majeur de santé publique. C'est notamment le cas des troubles anxieux, comme les troubles post-traumatiques, mais aussi des troubles psychotiques, dont la schizophrénie. Ces maladies sont invalidantes, fréquentes et touchent souvent des jeunes. La schizophrénie est un trouble chronique et hétérogène, associé à un large spectre de symptômes dit « positifs », « négatifs » et de désorganisation. Elle touche environ 1% de la population et les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces. Les troubles psychotiques apparaissent généralement à l'adolescence après une période de symptômes atténués (McGorry 2013; Krebs *et al.* 2014). Parmi ces jeunes « à risque », environ un tiers développeront une psychose alors que d'autres présenteront une stabilisation ou une régression des symptômes (Figure 1) (Fusar-Poli *et al.* 2013). Des facteurs de vulnérabilité génétique et environnementaux associés à un risque accru de développer une schizophrénie ont été identifiés mais la physiopathologie sous-jacente reste largement méconnue.

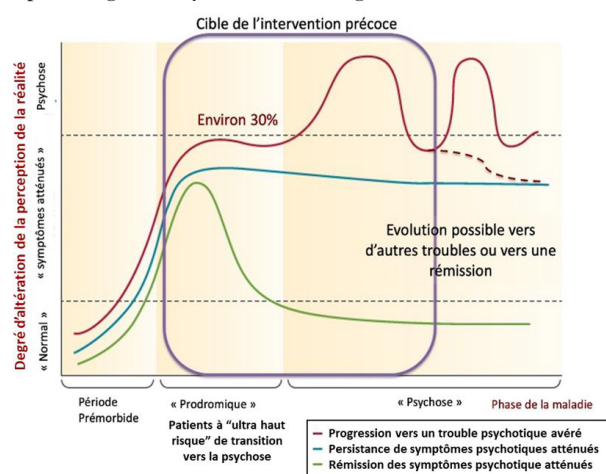


Figure 1 : Évolutions possibles des symptômes psychotiques chez les jeunes patients souffrant de symptômes atténués. Environ 30% des patients dit à « ultra haut risque » de transition évoluent vers un trouble psychotique avéré. (Source : Institut de Psychiatrie).

L'architecture génétique de la schizophrénie est complexe : plus de 100 loci ont été associés à un risque faible mais significatif de développer la maladie (Pardiñas *et al.* 2018 ; Lam *et al.* 2019). D'autre part, il existe des « variations du nombre de copies » de régions chromosomiques (CNV) qui sont rares mais qui confèrent un risque élevé de développer une schizophrénie (Marshall *et al.* 2017). La plus fréquente est la délétion 22q11.2 (22q11.2DS, ou syndrome de DiGeorge, 1/3 500 naissances) qui constitue un des facteurs de risque les plus importants puisque environ 40% des individus porteurs souffrent de psychose (Laurent *et al.* 2013 ; Schneider *et al.* 2014 ; McDonald-McGinn *et al.* 2015). Cette microdélétion concerne généralement 1,5 à 3 millions de paires de base. La grande variabilité des troubles somatiques mais aussi psychiatriques (troubles psychotiques, du spectre autistique, de l'attention ou de l'humeur, ect.) associés ne semble pas directement liée à la

taille de la délétion. L'hétérogénéité des phénotypes cliniques entre jumeaux monozygotes et l'implication de facteurs environnementaux (infections, stress environnementaux...) soutiennent l'hypothèse que des modifications épigénétiques pourraient être associées au développement de troubles psychotiques chez les individus porteurs de la délétion 22q11.2.

Les agressions environnementales, telles que le cannabis et le stress, notamment psychosocial, constituent un facteur de risque supplémentaire pour le développement de la schizophrénie (Davies *et al.* 2020 ; Marconi *et al.* 2016 ; Krebs *et al.* 2020). Les mécanismes biologiques sous-tendant la façon dont ces facteurs environnementaux interagissent avec le développement et le fonctionnement du cerveau, entraînant parfois la progression de troubles psychiatriques, restent méconnus.

L'identification de biomarqueurs prédictifs de l'évolution de la schizophrénie ainsi que la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents aux interactions entre facteurs génétiques et environnementaux restent à ce jour des défis majeurs à relever en vue d'améliorer la prise en charge des patients et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques précoces et personnalisées. Mieux comprendre la physiopathologie associée aux différences de vulnérabilité/résilience interindividuelle et améliorer les modèles animaux utilisés sont aussi des enjeux majeurs pour améliorer la prise en charge des patients. Cet article présente un aperçu de notre travail de thèse (Demars 2021) divisé en 3 études indépendantes qui s'articulent autour de ces questions.

BIOMARQUEURS DE LA TRANSITION PSYCHOTIQUE

Introduction

Dans une première étude, nous avons réalisé un suivi longitudinal de l'expression sanguine des gènes de la famille YWHA chez des jeunes à risque ayant ou non évolué vers un premier épisode psychotique (Demars *et al.* 2020). Ces gènes codent pour des protéines appelées 14-3-3 qui jouent un rôle important dans le développement et le fonctionnement du cerveau (Berg *et al.* 2003 ; Foote *et al.* 2015). Des études antérieures ont fourni des arguments en faveur de leur implication dans la schizophrénie (Foote et Zhou 2012 ; Qing *et al.* 2016), mais leur éventuel rôle précoce, pendant l'apparition de la maladie, est inconnu.

Méthode

Nous avons exploré le niveau d'expression des sept gènes YWHA dans le sang périphérique de 92 jeunes individus à « ultra haut risque » de psychose (cohorte ICAAR). Au cours de l'étude, 36 participants ont développé une psychose. L'expression des gènes YWHA a été évaluée à l'inclusion et après un suivi (10,3 mois en moyenne) par PCR quantitative multiplex.

Résultats

Les individus ayant évolué vers la psychose avaient des niveaux d'expression de base significativement plus élevés pour 5 gènes de la famille YWHA (YHWAB/E/G/Q/Z) et des change-

ments longitudinaux significativement différents dans l'expression des gènes YWHAЕ, YWHAG, YWHAH, YWHAS et YWAHZ.

Discussion

Ces résultats indiquent que plusieurs des gènes YWHA pourraient jouer un rôle dans les premiers processus pathologiques menant à la psychose. Cependant, il est important de noter que ces résultats ont été obtenus sur du sang périphérique ce qui ne reflète que de façon indirecte les processus cérébraux associés. De plus, le rôle exact des protéines codées par les gènes YWHA devra être identifié avant d'envisager le développement d'applications cliniques de ces travaux. De futures études sur des modèles animaux pourraient permettre d'identifier le rôle de ces protéines au cours de la maturation du cerveau à l'adolescence.

ÉTUDE COMPARÉE DE FACTEURS DE RISQUE

Introduction

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés à la pénétrance incomplète de la schizophrénie parmi des individus porteurs d'une délétion 22q11.2 (Demars 2021). Les souris Df(h22q11)/+, l'un des modèles de cette délétion, portent une délétion similaire qui touche une zone porteuse de gènes partiellement similaires à ceux concernés par la délétion chez l'Homme. Elles présentent des déficits des interactions sociales, des capacités cognitives et de la plasticité entre l'hippocampe et le cortex préfrontal (Didriksen *et al.* 2017 ; Tripathi *et al.* 2020), ce qui est cohérent avec les anomalies observées chez les patients atteints de schizophrénie (Spedding *et al.* 2021). Ces animaux constituent donc un modèle expérimental de la délétion 22q11.2.

Méthode

Nous avons étudié la méthylation de l'ADN à l'échelle du génome sur du sang périphérique de 14 individus porteurs d'une délétion 22q11.2, atteints ou non de schizophrénie (PsyDEv Cohorte, dont une paire de jumeaux discordant), ainsi que celle du cortex préfrontal de souris Df(h22q11)/+ qui ont été exposées ou non à un stress environnemental aigu réalisé en déposant les animaux sur une plateforme surélevée, instable, avec une forte lumière, pendant 30 minutes (n=5/groupe) selon une procédure précédemment décrite (Tripathi *et al.* 2016). Les données de méthylation ont été obtenues grâce à la méthode « Reduced-Representation Bisulfite Sequencing » et l'identification des CpGs et des régions différenciellement méthylées a été réalisée en utilisant methylKit R.

Résultats

Nous avons identifié des différences de niveaux de méthylation sur 221 gènes entre les individus souffrant ou non de schizophrénie. En croisant ces résultats avec ceux obtenus chez

l'animal, 34 gènes candidats ont été identifiés. Leurs niveaux de méthylation pourraient être associés à la schizophrénie et à la vulnérabilité au stress chez les individus porteurs d'une délétion 22q11.2. Certains de ces gènes sont notamment connus pour leur rôle dans le fonctionnement des neurones et des synapses, la signalisation glutamatergique et dopaminergique, les voies de signalisation de l'AMPC, et la régulation de l'expression des gènes.

Discussion

Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle des facteurs de stress environnementaux pourraient jouer un rôle important dans l'apparition de la schizophrénie parmi les individus porteurs d'une délétion 22q11.2 et confirment la pertinence d'une approche translationnelle chez l'être humain et l'animal. Les résultats de cette étude pilote devront être répliqués sur des cohortes de plus grande taille avec l'association d'une étude génomique aux données épigénétiques (idéalement recueillies de façon longitudinale). Étudier la physiopathologie sous-jacente à des différences de vulnérabilités comportementales parmi des souris porteuses de différentes mutations concernant les régions et gènes touchés par la délétion 22q11.2 chez l'homme (Didriksen *et al.* 2017 ; Karayiorgou *et al.* 2010 ; Saito *et al.* 2020) et soumises à des facteurs de risque tel qu'un stress environnemental permettrait d'améliorer la compréhension des mécanismes de vulnérabilité/résilience interindividuelle nécessaire au développement de stratégies thérapeutiques personnalisées chez les patients humains où la pénétrance de la maladie est incomplète. Pour cela, l'utilisation de paradigmes éthologiquement pertinents pour étudier les différences de vulnérabilité parmi les souris modèles Df(h22q11)/+ paraît nécessaire.

AMÉLIORER LES MODÈLES ANIMAUX

Introduction

Dans cette dernière étude, nous nous sommes intéressés au développement d'un protocole permettant une étude approfondie des comportements chez le rat de laboratoire et des différences interindividuelles de vulnérabilité/résilience. Ces deux aspects semblent primordiaux pour l'amélioration des recherches précliniques en psychiatrie, particulièrement pour la schizophrénie. Dans cette étude, nous nous sommes éloignés de cette maladie pour travailler sur un modèle plus reconnu et standardisé : un protocole d'extinction d'une peur conditionnée. Cela a par ailleurs permis de s'intéresser aux différences de vulnérabilité des animaux à un stress environnemental, facteur de risque pour la schizophrénie. Nous avons développé un protocole innovant, éthologiquement pertinent, permettant d'étudier des comportements variés chez des rats soumis à un protocole d'extinction d'une peur conditionnée (Demars *et al.* 2022). Les paradigmes de conditionnement à la peur et d'extinction sont très utilisés pour l'étude de la physiopathologie du traitement des souvenirs émotionnels négatifs ou traumatiques (Maren *et al.* 2013). Les protocoles d'extinction d'une peur conditionnée permettent notamment de modéliser les thérapies basées sur l'exposition utilisées dans le traitement de troubles anxieux tel que le syndrome de stress post-traumatique (Milad *et al.* 2009 ; Jovanovic et Ress-

ler 2010 ; Goode et Maren 2014). Ces traitements sont parfois insuffisants et de nombreux patients souffrent de rechutes, surtout en dehors de l'environnement de soin (Cusack *et al.* 2016). En effet, l'extinction de la peur, chez l'être humain et l'animal, est étroitement liée à l'environnement dans lequel se déroule le processus d'extinction : les réponses associées à la peur peuvent réapparaître lorsque l'individu se trouve dans un contexte différent de celui où s'est déroulée l'extinction. Malgré les avancées réalisées, la transposition à l'être humain des résultats obtenus chez l'animal reste insatisfaisante. Pour y remédier, une piste est de réaliser des expériences plus pertinentes d'un point de vue éthologique et d'étudier les différences interindividuelles dans les réponses comportementales et biologiques des animaux (Mobbs et Kim 2015 ; Paré et Quirk 2017).

Méthode

Après un protocole standard de conditionnement à la peur associant la présentation d'un son (stimulus conditionnel ou

CS) à un léger choc électrique, les rats mâles (n=18) ont réalisé une procédure d'extinction où le son était présenté seul, sans association avec un stimulus aversif. L'extinction a eu lieu dans une large arène contenant des objets et de la nourriture permettant l'expression de nombreux comportements. À l'issue de l'extinction, la réaction des animaux a été testée dans une cage similaire à celle où a eu lieu le conditionnement afin de tester la vulnérabilité des animaux à un renouvellement des symptômes de peur dans un contexte différent de celui de l'extinction (Figure 2A). Une classification automatique des comportements a été développée à partir de l'analyse de la position de l'animal et des mouvements de sa tête enregistrés par un instrument sans fil miniaturisé fixé sur le crâne des animaux pendant les sessions (Figure 2B). Six comportements ont été définis : immobilité (« freezing »), locomotion rapide (« darting »), toilettage, exploration d'objet, exploration de l'environnement (« rearing »), autres comportements de recherches de nourriture et d'exploration.

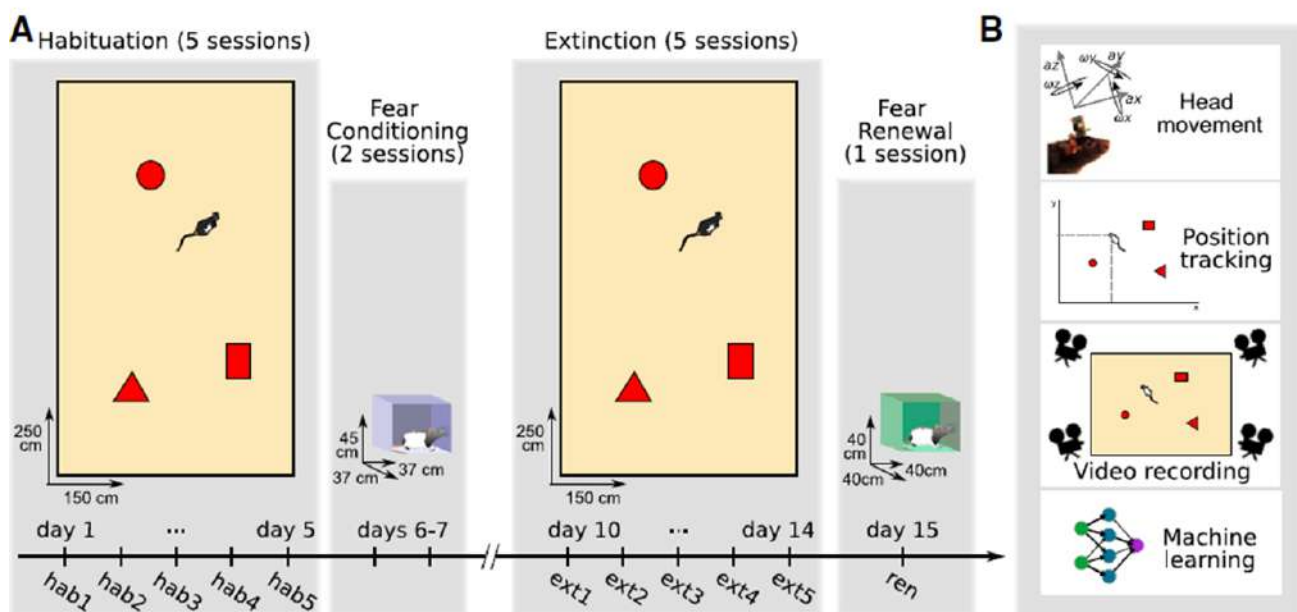


Figure 2 : Paradigme éthologiquement pertinent d'une procédure d'extinction d'une peur conditionnée (Source : Demars *et al.* 2022)

(A) Protocole comportemental. Les rats ont été habitués à chercher de la nourriture dans l'arène contenant des objets de grandes tailles pouvant être considérés comme des abris (formes rouges) pendant 5 jours (hab1-hab5). Une procédure de conditionnement à la peur dans une boîte standard a été réalisée, suivie de 5 jours d'extinction (ext1-ext5) dans l'arène, puis du test de renouvellement de la peur (ren) dans une nouvelle boîte.

(B) Une évaluation multidimensionnelle précise des comportements des animaux dans l'arène a pu être réalisée grâce à une analyse automatique des mouvements de la tête de l'animal (mesurés par des capteurs inertiels miniaturisés) et de sa position.

Résultats

Différents profils de réponses comportementales post-conditionnement ont pu être identifiés : suite à la présentation du stimulus conditionnel (CS) lors de la première session d'extinc-

tion, certains animaux présentaient un profil caractérisé par une grande immobilité (« freezing ») alors que d'autres effectuaient des mouvements rapides (« darting »), comme s'ils fuyaient un danger (Figure 3A-B). Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, la tendance d'un animal à présenter une réponse active

ou passive était respectivement associée à un renouvellement de la peur plus fort ou plus faible (Figure 3C-D). Cette différence de vulnérabilité était associée à des différences dans l'expression de gènes du cortex préfrontal des animaux dont des gènes impliqués dans les voies de signalisation du GABA, ainsi

que dans la régulation du potentiel membranaire et de l'organisation protéique de la membrane (Figure 3E-F). Certains de ces gènes avaient déjà été impliqués dans les troubles liés à l'anxiété et aux traumatismes.

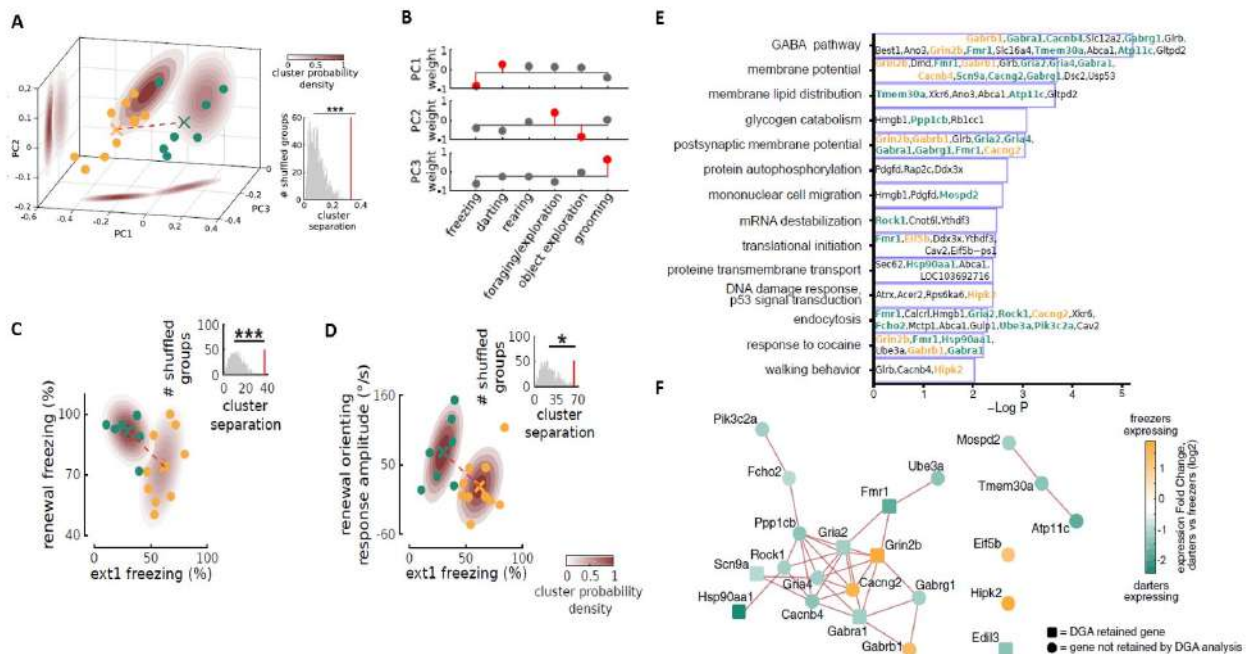


Figure 3 : Les différences interindividuelles des réponses comportementales des animaux après le conditionnement sont associées à différents niveaux de vulnérabilité de rechute des comportements de défense lors du test de renouvellement (Source : Demars et al. 2022)

(A) L'analyse en composantes principales (PCs) des comportements des animaux pendant les périodes de CS lors de la première session d'extinction, après le conditionnement, a révélé l'existence de différences interindividuelles et a permis d'identifier deux groupes d'animaux. Chaque point représente les valeurs de PCs d'un animal. La couleur identifie les deux groupes séparés par k-means.

Ligne rouge pointillée : distance euclidienne entre les centres de masse des clusters (X).

Zones ombrées rouge : projections des lignes de contour des estimations de densité du modèle gaussien.

Encadré : distribution des distances inter-groupes obtenues pour 1 000 mélanges aléatoires des identités d'appartenance à un groupe ou un autre des animaux (ligne rouge : séparation inter-groupes observées dans l'expérience).

*** $p < 0,001$.

(B) Contributions des 6 différents types de comportements mesurés dans les trois premières composantes principales de l'analyse présentée en A. Rouge : contributions significatives.

Les deux groupes d'animaux identifiés se différencient principalement par la quantité d'immobilité (« freezing ») vs une réponse locomotrice active (« darting ») pendant les CS de la première session d'extinction.

(C-D) Intensité des comportements de défense lors du test de renouvellement de la peur mesurée par la quantité d'immobilité (« freezing ») (C) et par l'intensité du réflexe de sursaut (D) lors du premier CS, par rapport aux valeurs de la quantité d'immobilité lors de la première session d'extinction (ext1). Les valeurs obtenues pour les animaux présentant une réponse active à la présentation du CS après le conditionnement sont de couleur verte alors que celles des animaux présentant une réponse passive sont de couleur jaune sur l'ensemble de la figure 3.

(E) Processus biologiques associés aux gènes différemment exprimés dans le cortex préfrontal des animaux des deux groupes, obtenus par analyse d'enrichissement des termes GO (Gene Ontology).

Jaune/vert : gènes surexprimés chez les animaux ayant présenté une réponse passive/active lors de la présentation du CS durant la première session d'extinction.

(F) Résumé des 34 gènes différemment exprimés entre les deux groupes d'animaux et retenus comme étant les plus susceptibles d'être associés à la physiologie sous-jacente.

Intensité de la couleur: expression relative des gènes chez les animaux présentant une réponse active à la présentation du CS après le conditionnement (vert) par rapport à ceux présentant une réponse passive (jaune).

Les traits symbolisent les interactions connues entre les protéines codées par les gènes reliés.

Discussion

Grâce à un nouveau protocole plus éthologique, nous avons donc isolé des marqueurs comportementaux de la susceptibilité interindividuelle de rechute de la peur suite à son extinction et identifié des voies moléculaires associées. Ces résultats nécessitent d'être répliqués et étendus sur des cohortes d'animaux de plus grande taille et des deux sexes. Une des perspectives les plus pertinentes de ce travail pourrait être son application à l'étude des différences interindividuelles de réponse à un événement traumatique, en vue de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux réponses pathologiques *versus* physiologiques à un tel stress. Cela pourrait améliorer considérablement notre compréhension de la physiopathologie de maladies telles que les troubles du stress post-traumatique et déboucher sur des applications cliniques en matière de prévention et de traitements. L'adaptation de ce type de protocole associée à une réflexion sur la pertinence du modèle, des comportements mesurés, et la recherche de vulnérabilité interindividuelle semble très prometteur pour d'autres domaines, notamment pour les recherches précliniques sur des rongeurs de laboratoires pour des pathologies telle que la schizophrénie.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail a utilisé des approches translationnelles avec l'objectif de mieux comprendre la physiopathologie du développement de la schizophrénie et de la vulnérabilité au stress. Plusieurs limites ont été identifiées dans ces études. Cela inclut la petite taille des cohortes, l'absence d'intégration de multiples niveaux de régulations génomiques et épigénomiques, et l'analyse de données provenant d'échantillons de sang périphérique. Les points forts de ces travaux sont la réalisation d'une étude longitudinale sur une cohorte de patients à risque, c'est-à-dire à un stade précoce du développement de la maladie, l'étude comparée chez l'animal et chez des patients porteurs d'une délétion 22q11.2 ainsi que l'étude des différences interindividuelles de réponse des animaux dans un protocole éthologiquement pertinent. En complément des éléments de discussion spécifiques à chacune des études réalisées présentés ci-dessus, ces travaux ont mené à une discussion élargie autour de deux éléments principaux : les pistes d'amélioration des modèles animaux utilisés dans la recherche sur les maladies psychiatriques, ainsi que les limites et perspectives des études autour des biomarqueurs épigénétiques en psychiatrie.

Améliorer les modèles animaux pour les maladies psychiatriques

Plus de la moitié des résultats publiés dans le cadre de la recherche préclinique aux États-Unis semble non reproductible, ce qui coûte environ 28 milliards US\$/an et entraîne la réalisation d'études de suivi qui s'avèrent inutiles, chronophages, et pouvant nuire aux animaux et aux patients inscrits dans les essais cliniques (Freedman *et al.* 2015). Néanmoins, les modèles animaux offrent un moyen unique pour étudier la

physiopathologie des fonctions cérébrales et nécessitent par conséquent d'être améliorés.

Affiner les mesures comportementales

Si l'utilisation de tâches comportementales simples peut être extrêmement utile, nous avons montré que leur combinaison avec des tâches plus complexes, proches de situations réelles et permettant l'expression des comportements variés, est essentielle. Des tâches non adaptées peuvent entraîner l'étude d'anomalies comportementales s'avérant non pertinentes pour la modélisation d'une pathologie humaine (Krakauer *et al.* 2017 ; Headley *et al.* 2019). Reprenant l'exemple des études sur la peur, l'évaluation de cette émotion chez l'animal est difficile car déduite de comportements. Il existe donc un risque d'interprétation erronée de la corrélation neuronale ou biologique avec un état de peur, parfois mal identifié sur la base d'un seul comportement tel que la présence ou non d'immobilité ou « freezing » alors que divers comportements de défense sont connus, selon l'intensité de la peur mais aussi selon la situation environnementale. D'autres alternatives éthologiquement pertinentes ont été développées récemment (Pellman et Kim 2016 ; Headley *et al.* 2019). Il est aussi important de noter le rôle de l'utilisation des capteurs inertiels dans notre travail : cette méthode objective, précise, et automatique ouvre de nombreuses perspectives pour l'étude de divers comportements, adaptés à des modèles animaux de diverses pathologies dont la schizophrénie (Pasquet *et al.* 2016 ; Demars *et al.* 2022).

Utiliser des environnements moins appauvris pour l'hébergement standard des rongeurs

Les rongeurs sauvages sont exposés à des expériences complexes au cours de leur vie. L'enrichissement de l'environnement dans lequel les rongeurs de laboratoires sont hébergés, de la gestation à l'âge adulte, paraît nécessaire pour permettre l'étude d'animaux dont le cerveau a pu connaître un développement cérébral physiologique approprié, améliorant ainsi une transposition vers les patients humains. L'utilisation d'un environnement enrichi sur une période définie de la vie d'animaux modèles pour la schizophrénie peut modifier les perturbations comportementales et biologiques observées chez ces animaux modèles (Bator *et al.* 2018 ; Zhu et Grace, 2021). Cela montre la sensibilité de ces modèles à des modifications environnementales et souligne la pertinence d'étudier des animaux ayant été exposés de façon prolongée à des environnements enrichis afin de permettre un développement physiologique pertinent, notamment de leur cerveau. En effet, l'étude d'animaux élevés dans les environnements pauvres en stimuli peut induire un biais considérable dans les comportements et dans les processus physiopathologiques étudiés (Hannan 2014 ; Sale *et al.* 2014 ; Kempermann 2019). L'enrichissement environnemental englobe l'activité physique, les interactions sociales et les stimulations cognitives. L'une des contraintes à leur généralisation était la peur qu'ils puissent augmenter la variabilité des phénotypes comportementaux/biologiques des animaux mais des études récentes ont montré que ce n'est pas le cas (André *et al.* 2018 ; Kentner *et al.* 2021).

Différences interindividuelles de vulnérabilité/résilience

Comme présenté précédemment, seules quelques personnes développent des réponses pathologiques après un traumatisme. De même chez l'animal, les différences interindividuelles dans l'acquisition et l'extinction de la peur ont commencé à recevoir d'avantage d'attention (Bush *et al.* 2007 ; Galatzer-Levy *et al.* 2013 ; Reznikov *et al.* 2015). Des corrélations neuronales et biologiques ont ainsi pu être associées à différents phénotypes de réponses de rats à des protocoles de conditionnement et d'extinction de la peur (Cohen et Zohar 2004 ; Peters *et al.* 2010). Ces approches, différentes de l'étude d'animaux d'un groupe « contrôle » *versus* un groupe « test », semblent extrêmement pertinentes pour étudier les réponses pathologiques *versus* les réponses physiologiques des individus face à un même stimulus et ainsi permettre une modélisation de certains processus pathologiques chez l'être humain. Ainsi, plusieurs facteurs de risque, génétiques et environnementaux, ont été identifiés pour la schizophrénie mais les processus biologiques sous-tendant les différences interindividuelles de vulnérabilité face au développement de la maladie suite à la présence de ces facteurs restent inconnus. Étudier la physiopathologie associée aux différences de vulnérabilité des individus de modèles animaux pour la schizophrénie semble donc nécessaire pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie chez l'Homme en étudiant des animaux « malades » et des animaux « résilients » au sein du groupe « modèle ». Cette approche est bien évidemment à envisager en parallèle de l'approche visant à étudier les conséquences biologiques de facteurs de risque en comparant des animaux d'un groupe « modèle » et d'un groupe « contrôle ».

Vers une hétérogénéisation des protocoles

La standardisation en tant qu'homogénéisation des populations étudiées (sexe, génétique, âge, ect.) rend les animaux au sein des expériences très homogènes permettant une réduction de la taille de l'échantillon mais réduisant la généralisation des résultats obtenus (Tannenbaum *et al.* 2019; Voelkl *et al.* 2020). L'homogénéisation du contexte environnemental a également son importance. Il a par exemple été démontré que l'élevage de souris dans des cages à ventilation individuelle par rapport à des cages ouvertes modifie les phénotypes d'animaux modèles pour la schizophrénie (Logge *et al.* 2014 ; Mueller *et al.* 2018). Contrairement à la pratique dogmatique actuelle de haute standardisation, il est donc intéressant de considérer la préconisation d'une hétérogénéisation des protocoles afin d'améliorer la validité et la généralisation des résultats obtenus (Voelkl *et al.* 2020). Si le coût et le nombre d'animaux utilisés par expérience augmenteraient, cela pourrait néanmoins permettre une réduction globale de ces deux variables à moyen terme par l'obtention de résultats plus solides. Malgré ces avantages, identifiés depuis plusieurs années, les pratiques expérimentales évoluent peu. Plusieurs facteurs associés à ces réticences ont été identifiés, permettant une prise de conscience des leviers qui permettraient d'accélérer la modification des pratiques usuelles (Tableau 1, (Voelkl *et al.* 2020)).

L'hétérogénéisation des protocoles peut notamment passer par l'incorporation de sources de variation biologique (animaux (sexe, souche et âge), environnementale (conditions d'hébergement, régimes alimentaires, environnements microbiens), ect.) ou des conditions de tests (horaire, systèmes d'essai alternatifs, multiplication des lots).

Facteurs à l'origine du changement	Crise de la reproductibilité
	Priorité éthique au gain de connaissances par animal
	Efficacité à long terme dans l'utilisation des ressources et du temps
	Réputation de la recherche <i>in vivo</i>
Facteurs de résistance au changement	Système de récompense scientifique favorisant les études uniques à petite échelle
	L'accent éthique mis sur le nombre d'animaux par étude
	Croyance en la valeur de la standardisation
	Coût par expérience
	Complexité de la conception des expériences et de leur analyse
	Culture de la recherche (sens commun des « bonnes pratiques »)
	Solution méconnue concernant la mise en œuvre pratique d'une hétérogénéisation

Tableau 1 : Facteurs impactant les changements de paradigme dans la conception des protocoles expérimentaux utilisant des modèles animaux dans la recherche biomédicale identifiés par Voelkl *et al.* (2020).

Troubles psychiatriques spontanés de l'animal de compagnie

Une autre approche consiste à tirer parti des troubles psychiatriques spontanés des animaux de compagnie. Les maladies canines spontanées sont maintenant reconnues comme d'excellents modèles translationnels, notamment pour les maladies neurodégénératives, l'épilepsie, les phobies et les troubles obsessionnels compulsifs (Hayward *et al.* 2016 ; Ledford 2016). En effet, la variation génétique est réduite, et leur génome, leur métabolisme, leur pharmacocinétique sont plus proches des nôtres que ceux des rongeurs. Il est également possible d'étudier des animaux issus de mêmes portées, partageant les mêmes facteurs pré/péri-nataux. Les animaux de compagnies tels que les chiens et chats partagent par ailleurs une grande partie des facteurs environnementaux de risque/protection de l'être humain ainsi que des étapes de développement, y compris pour le développement et le vieillissement du cerveau (Morell 2009 ; Axelson *et al.* 2013 ; Wang *et al.* 2020). Par conséquent, l'étude des

troubles psychiatriques spontanés chez les animaux de compagnie constitue une voie intéressante, parallèlement à l'amélioration des modèles de rongeurs pour l'étude de certaines maladies psychiatriques chez l'être humain.

Marqueurs épigénétiques et psychiatrie : des limites méthodologiques à l'amélioration de la prise en charge des patients

Les biomarqueurs épigénétiques sont définis comme toute marque épigénétique qui peut être mesurée de manière fiable et qui peut prédire le risque de développement d'une maladie future, le pronostic, la réponse au traitement, ou aider au diagnostic de la maladie (par une détection précoce ou un diagnostic affiné) (Berdasco et Esteller 2019). Ils constituent un substrat moléculaire des interactions entre l'exposome et la génétique de l'individu (être humain ou animal) avec des propriétés à la fois dynamiques et stables dans le temps. Le développement de biomarqueurs fiables utilisables en clinique par les médecins ou les vétérinaires est un processus lent et complexe. En effet, les marques épigénétiques dépendent du type de cellule et du stade de développement. De plus, elles interagissent entre elles, or certaines marques épigénétiques, comme l'organisation 3D de la chromatine par exemple, restent difficiles à étudier. Des limites spécifiques à la psychiatrie s'ajoutent à ces freins : notamment la nécessité d'étudier des échantillons de sang périphérique alors que l'évaluation directe des anomalies de populations de cellules cérébrales ne peut généralement pas être envisagée. Néanmoins, il existe des corrélations entre certains marqueurs épigénétiques mesurés dans le sang et dans le cerveau (Walton *et al.* 2016). De plus, les modifications périphériques des marqueurs épigénétiques pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie des maladies psychiatriques et les études sur échantillons de sang permettent des suivis longitudinaux, particulièrement pertinentes pour l'étude des mécanismes de progression de la maladie. Le développement de biomarqueurs épigénétiques en psychiatrie semble être un domaine de recherche très prometteur pour répondre aux besoins des cliniciens et améliorer les soins aux patients. Ainsi, chez l'être humain, la recherche sur les bio-

marqueurs des premiers stades de la psychose pour améliorer la stratification des patients, le diagnostic et le pronostic est en cours de développement. Un point crucial pour le succès des études futures pourrait résider dans l'intégration de données génomiques et de différents niveaux de régulation épigénétique ainsi que dans l'étude de l'évolution de l'épigénome avant l'apparition de la maladie et pendant un suivi longitudinal. En parallèle, l'édition artificielle de l'épigénome sur des modèles animaux peut aider à comprendre le rôle physiopathologique associé à ces biomarqueurs épigénétiques et à tester leur éventuel rôle causal dans la progression de la maladie, point d'intérêt majeur pour développer de nouvelles thérapies. Chez l'animal malade, l'utilisation de biomarqueurs épigénétiques est tout aussi pertinente que chez l'être humain mais cela sera probablement lent pour les animaux souffrant de troubles pathologiques du comportement en raison du manque de connaissances scientifiques à ce jour sur les mécanismes physiopathologiques mis en jeu ainsi que du prix de ces analyses.

CONCLUSION

Pour conclure, cet article présente un bref aperçu des travaux et théorie développés dans la thèse « Variabilité interindividuelle des réponses comportementales face aux interactions entre gènes et environnement ». Dans cette thèse, nous avons exploré les interactions entre gènes et environnement en utilisant des approches translationnelles afin de mieux comprendre la physiopathologie de la vulnérabilité/résilience interindividuelle aux maladies psychiatriques. Les stratégies de recherche axées sur les traitements préventifs et personnalisés précoces, la découverte de biomarqueurs de pronostic notamment épigénétiques et la physiopathologie de la transition vers la psychose chez les patients à très haut risque apparaissent comme l'un des cadres les plus prometteurs pour améliorer la qualité de vie des patients. En parallèle, le développement de modèles animaux appropriés constitue un pilier de la recherche pour l'accroissement des connaissances de la physiologie et de la physiopathologie du développement du cerveau et de ces maladies, nécessaire au développement de nouvelles thérapies.

REMERCIEMENTS

Je suis très honorée que mon travail ait fait l'objet du Prix de thèse d'Université 2022 de l'Académie vétérinaire de France en partenariat avec Boehringer-Ingelheim. Je remercie le Pr Krebs pour son accompagnement tout au long de ma thèse ainsi que l'ensemble des membres de son équipe et des co-auteurs des publications présentées qui ont permis la réalisation de ce travail. Mon contrat doctoral a été rendu possible par un financement « espoir de la recherche » de la Fondation pour la Recherche Médicale.

CONFLITS D'INTÉRÊTS

Aucun

COMITÉ D'ÉTHIQUE

Toutes les études réalisées dans le cadre de ce travail ont été approuvées par des comités éthiques notamment par le Comité de protection des personnes, Ile-de-France III, Paris, France.

BIBLIOGRAPHIE

- André V, Gau C, Scheideler A, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, Becker L, *et al.* Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* 2018; 16(4): e2005019.
- Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt ML, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, *et al.* The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature.* 2013; 495(7441): 360–4.
- Bator E, Latusz J, Wedzony K, Mackowiak M. Adolescent environmental enrichment prevents the emergence of schizophrenia-like abnormalities in a neurodevelopmental model of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology.* 2018; 28(1): 97–108.
- Berdasco M, Esteller M. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. *Nat Rev Genet.* 2019; 20(2): 109–27.
- Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4(9): 752–62.
- Bush DEA, Sotres-Bayon F, LeDoux JE. Individual differences in fear: Isolating fear reactivity and fear recovery phenotypes. *Journal of Traumatic Stress.* 2007; 20(4): 413–22.
- Cohen H, Zohar J. An Animal Model of Posttraumatic Stress Disorder: The Use of Cut-Off Behavioral Criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004; 1032(1): 167–78.
- Cusack K, Jonas DE, Forneris CA, Wines C, Sonis J, Middleton JC, *et al.* Psychological treatments for adults with posttraumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *Clinical psychology review.* 2016; 43: 128–41.
- Davies C, Segre G, Estradé A, Radua J, De Micheli A, Provenzano U, *et al.* Prenatal and perinatal risk and protective factors for psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry.* 2020; 7(5): 399–410.
- Demars F. Interindividual variability in behavioral responses to gene and environment interactions. 2021. Thèse de doctorat en neurobiologie. Université de Paris.
- Demars F, Kebir O, Marzo A, Iftimovic A, Schramm C, Krebs MO, *et al.* Dysregulation of peripheral expression of the YWHA genes during conversion to psychosis. *Scientific reports.* 2020; 10(1): 1–9.
- Demars F, Todorova R, Makdah G, Forestier A, Krebs MO, Godsil BP, *et al.* Post-trauma behavioral phenotype predicts the degree of vulnerability to fear relapse after extinction in male rats. *Current Biology.* 2022; 32(14): 3180–3188.e4.
- Didriksen M, Fejgin K, Nilsson SR, Birknow MR, Grayton HM, Larsen PH, *et al.* Persistent gating deficit and increased sensitivity to NMDA receptor antagonism after puberty in a new mouse model of the human 22q11.2 microdeletion syndrome: a study in male mice. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN.* 2017; 42(1): 48.
- Foote M, Qiao H, Graham K, Wu Y, Zhou Y. Inhibition of 14-3-3 Proteins Leads to Schizophrenia-Related Behavioral Phenotypes and Synaptic Defects in Mice. *Biol Psychiatry.* 2015; 78(6): 386–95.
- Foote M, Zhou Y. 14-3-3 proteins in neurological disorders. *Int J Biochem Mol Biol.* 2012; 3(2): 152–64.
- Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLOS Biology.* 2015; 13(6): e1002165.
- Fusar-Poli P, Borgwardt S, Bechdolf A, Addington J, Riecher-Rössler A, Schultze-Lutter F, *et al.* The psychosis high-risk state: a comprehensive state-of-the-art review. *JAMA Psychiatry.* 2013; 70(1): 107–20.
- Galatzer-Levy IR, Bonanno GA, Bush DEA, LeDoux JE. Heterogeneity in threat extinction learning: substantive and methodological considerations for identifying individual difference in response to stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 2013; 7.
- Goode TD, Maren S. Animal Models of Fear Relapse. *ILAR Journal.* 1 janv 2014; 55(2): 246–58.
- Hannan AJ. Review: Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2014; 40(1): 13–25.
- Hayward JJ, Castelhana MG, Oliveira KC, Corey E, Balkman C, Baxter TL, *et al.* Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog. *Nature communications.* 2016; 7: 10460.
- Headley DB, Kanta V, Kyriazi P, Paré D. Embracing Complexity in Defensive Networks. *Neuron.* 2019; 189–201.
- Jovanovic T, Ressler KJ. How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *Am J Psychiatry.* 2010; 167(6): 648–62.
- Karayiorgou M, Simon TJ, Gogos JA. 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience.* 2010; 11(6): 402–16.
- Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci.* 2019; 20(4): 235–45.
- Kentner AC, Speno AV, Doucette J, Roderick RC. The Contribution of Environmental Enrichment to Phenotypic Variation in Mice and Rats. *eNeuro.* 2021;8(2).
- Krakauer JW, Ghazanfar AA, Gomez-Marin A, MacIver MA, Poeppel D. Neuroscience Needs Behavior: Correcting a Reductionist Bias. *Neuron.* 2017; 93(3): 480–90.
- Krebs MO, Demars F, Frajerman A, Kebir O, Jay T. Neurodevelopment and Cannabis. *Bulletin de l'académie Nationale de Médecine.* 2020.
- Krebs MO, Magaud E, Willard D, Elkhazen C, Chauchot F, Gut A, *et al.* [Assessment of mental states at risk of psychotic transition: validation of the French version of the CAARMS]. *Encephale.* 2014; 40(6): 447–56.
- Lam M, Chen CY, Li Z, Martin AR, Bryois J, Ma X, *et al.* Comparative genetic architectures of schizophrenia in East Asian and European populations. *Nat Genet.* 2019; 51(12): 1670–8.
- Laurent C, Giannitelli M, Cohen D, Levinson DF. Génétique des schizophrénies : mise en perspective des schizophrénies à début précoce et autres pathologies du développement. *Neuropsychiatrie de l'Enfance et de l'Adolescence.* 2013; 61(5): 317–25.

- Ledford H. Dog DNA probed for clues to human psychiatric ills: project will compare gene data to owners' assessments of how their companions behave. *Nature*. 2016; 529 (7587): 446–8.
- Logge W, Kingham J, Karl T. Do individually ventilated cage systems generate a problem for genetic mouse model research? *Genes, Brain and Behavior*. 2014; 13(7): 713–20.
- Marconi A, Di Forti M, Lewis CM, Murray RM, Vassos E. Meta-analysis of the association between the level of cannabis use and risk of psychosis. *Schizophrenia Bull*. 2016; 42(5): 1262–9.
- Maren S, Phan KL, Liberzon I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013; 14(6): 417–28.
- Marshall CR, Howrigan DP, Merico D, Thiruvahindrapuram B, Wu W, Greer DS, *et al.* Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nat Genet*. 2017; 49(1): 27–35.
- McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JAS, *et al.* 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 19 2015; 1: 15071.
- McGorry PD. Early clinical phenotypes, clinical staging, and strategic biomarker research: building blocks for personalized psychiatry. *Biol Psychiatry*. 2013; 74(6): 394–5.
- Milad MR, Pitman RK, Ellis CB, Gold AL, Shin LM, Lasko NB, *et al.* Neurobiological basis of failure to recall extinction memory in posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*. 2009; 66 (12): 1075–82.
- Mobbs D, Kim JJ. Neuroethological studies of fear, anxiety, and risky decision-making in rodents and humans. *Current Opinion in Behavioral Sciences*. 2015; 5: 8–15.
- Morell V. Going to the Dogs. *Science*. 2009; 325 (5944): 1062–5.
- Mueller FS, Polesel M, Richetto J, Meyer U, Weber-Stadlbauer U. Mouse models of maternal immune activation: Mind your caging system! *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018; 73: 643–60.
- Pardiñas AF, Holmans P, Pocklington AJ, Escott-Price V, Ripke S, Carrera N, *et al.* Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nat Genet*. 2018; 50(3): 381–9.
- Paré D, Quirk GJ. When scientific paradigms lead to tunnel vision: lessons from the study of fear. *npj Science of Learning*. 2017; 2(1).
- Pasquet MO, Tihy M, Gourgeon A, Pompili MN, Godsil BP, Léna C, *et al.* Wireless inertial measurement of head kinematics in freely-moving rats. *Sci Rep*. 2016; 6: 35689.
- Pellman BA, Kim JJ. What Can Etho-behavioral Studies Tell Us about the Brain's Fear System? *Trends in Neurosciences*. 2016; 39 (6): 420–31.
- Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ. Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science*. 2010; 328 (5983): 1288–90.
- Qing Y, Sun L, Yang C, Jiang J, Yang X, Hu X, *et al.* Dysregulated 14-3-3 Family in Peripheral Blood Leukocytes of Patients with Schizophrenia. *Scientific Reports*. 2016; 6: 23791.
- Reznikov R, Diwan M, Nobrega JN, Hamani C. Towards a better preclinical model of PTSD: Characterizing animals with weak extinction, maladaptive stress responses and low plasma corticosterone. *Journal of Psychiatric Research*. 2015; 61: 158–65.
- Saito R, Koebis M, Nagai T, Shimizu K, Liao J, Wulaer B, *et al.* Comprehensive analysis of a novel mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome: a model with the most common 3.0-Mb deletion at the human 22q11.2 locus. *Transl Psychiatry*. 2020; 10 (1): 1–13.
- Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and Brain Plasticity: Towards an Endogenous Pharmacotherapy. *Physiological Reviews*. 2014; 94 (1): 189–234.
- Schneider M, Debbané M, Bassett AS, Chow EWC, Fung WLA, van den Bree MBM, *et al.* Psychiatric Disorders From Childhood to Adulthood in 22q11.2 Deletion Syndrome: Results From the International Consortium on Brain and Behavior in 22q11.2 Deletion Syndrome. *AJP*. 2014; 171(6): 627–39.
- Spedding M, Chattarji S, Spedding C, Jay TM. Brain circuits at risk in psychiatric diseases and pharmacological pathways. *Therapies*. 2021; 76 (2): 75–86.
- Tannenbaum C, Ellis RP, Eyssel F, Zou J, Schiebinger L. Sex and gender analysis improves science and engineering. *Nature*. 2019; 575 (7781): 137–46.
- Tripathi A, Spedding M, Schenker E, Didriksen M, Cressant A, Jay TM. Cognition- and circuit-based dysfunction in a mouse model of 22q11.2 microdeletion syndrome: effects of stress. *Translational Psychiatry*. 2020; 10(1): 1–15.
- Voelkl B, Altman NS, Forsman A, Forstmeier W, Gurevitch J, Jaric I, *et al.* Reproducibility of animal research in light of biological variation. *Nat Rev Neurosci*. 2020; 21(7): 384–93.
- Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, *et al.* Correspondence of DNA methylation between blood and brain tissue and its application to schizophrenia research. *Schizophrenia Bull*. 2016; 42(2): 406–14.
- Wang T, Ma J, Hogan AN, Fong S, Licon K, Tsui B, *et al.* Quantitative translation of dog-to-human aging by conserved remodeling of the DNA methylome. *Cell Systems*. 2020; 11(2): 176-185.e6.
- Zhu X, Grace AA. Prepubertal environmental enrichment prevents dopamine dysregulation and hippocampal hyperactivity in MAM schizophrenia model rats. *Biological Psychiatry*. 2021; 89(3): 298–307.