

Université de Montréal

Méthylation de gènes liés au stress à travers différents tissus périphériques humains, et la pertinence pour le fonctionnement cérébral

par Jessica Di Sante

Département de Psychiatrie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade Maître ès Sciences (M. Sc)  
en sciences biomédicales (option psychiatrie)

Juin 2017

© Jessica Di Sante, 2017

## Résumé

Différents facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression génétique via des modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN. Un nombre grandissant d'études épigénétiques psychiatriques font usage de mesures périphériques de méthylation de l'ADN pour la compréhension de la fonction cérébrale et du comportement humain. La méthylation périphérique au niveau de gènes liés au stress a été associée à l'adversité précoce et à la vulnérabilité au développement de troubles de santé mentale. Les échantillons périphériques couramment utilisés sont dérivés du sang, de la salive ou des cellules buccales. Toutefois, nous ne savons toujours pas à quel point les niveaux de méthylation à travers différents tissus périphériques intra-individuels, ainsi que leurs associations respectives avec le fonctionnement cérébral et le comportement, sont comparables. L'objectif de cette étude était d'examiner les associations entre la méthylation périphérique de deux gènes liés au stress, NR3C1 et FKBP5, la connectivité cérébrale au repos et la fonction cérébrale en réponse à des stimuli émotionnels chez 44 adultes en santé. De plus, la force de ces associations a été comparée entre les échantillons de salive et de cellules buccales. Finalement, la stabilité de la méthylation de ces deux gènes à travers différents tissus périphériques, et à travers le temps, a été vérifiée. Les résultats de cette étude démontrent une association positive entre la méthylation salivaire de NR3C1 et la connectivité fronto-lobique au repos, et entre la méthylation de FKBP5 dérivée des cellules buccales et la réponse fronto-médiane bilatérale et parahippocampique gauche à des stimuli de tristesse. Les niveaux de méthylation de FKBP5 dérivés des cellules buccales et de la salive étaient significativement corrélés, des résultats qui n'ont pas été répliqués pour le gène NR3C1. Finalement, les niveaux de méthylation des deux gènes sont demeurés stables pour une période de 2 ans. Nos résultats ouvrent à la possibilité que la stabilité de la méthylation à travers différents tissus périphériques, ainsi que les associations entre la méthylation périphérique et différents processus mentaux, pourraient être spécifiques aux gènes étudiés et aux types de cellules périphériques utilisés.

**Mots-clés** : Stress, Épigénétique, Méthylation de l'ADN, NR3C1, FKBP5, Imagerie cérébrale

## **Abstract**

Early environmental factors influence gene expression via epigenetic modifications such as DNA methylation. Peripheral DNA methylation of stress-related genes has been associated with early adversity and vulnerability to different mental health outcomes. Commonly used peripheral samples are derived from blood, saliva or buccal cells. However, it is still not known whether peripherally derived DNA methylation in a specific cell type is most strongly associated with human brain processes and behavior. The aim of the present study was to investigate the association between peripherally derived NR3C1 and FKBP5 methylation, frontal-limbic brain function and resting-state functional connectivity in healthy adults, and to compare the strength of these associations across different peripheral tissue samples. Additionally, cross-tissue convergence and two-year stability of DNA methylation were assessed for both genes. Saliva derived NR3C1 methylation was associated with greater fronto-limbic resting-state connectivity, whereas buccal cell-derived FKBP5 methylation was positively associated with bilateral middle frontal and left parahippocampal response to sad emotional stimuli. Saliva- and buccal cell-derived FKBP5 methylation levels were significantly correlated to one another, and methylation in both genes remained stable for two years. Results regarding cross-tissue convergence and were not replicated for NR3C1. These findings suggest that methylation in different genes and in different peripheral tissues might differently capture brain processes, and that DNA methylation tissue specificity and time stability might in turn be gene specific.

**Key-words:** Stress, Epigenetics, DNA methylation, NR3C1, FKBP5, Brain Imaging

## Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	vii

## CHAPITRE 1

<b>Avant-propos.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 L’adversité précoce et la vulnérabilité aux troubles de santé mentale .....</b>	<b>8</b>
1.1.1 La réponse physiologique de stress et l’axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (HPS).....	9
<b>1.2 Les altérations de la réponse au stress : Les procédés épigénétiques.....</b>	<b>10</b>
1.2.2 La méthylation de l’ADN et la vulnérabilité aux troubles de santé mentale .....	11
1.2.3 Le gène du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1) .....	12
1.2.4 Le gène FK506 Binding Protein 51 (FKBP5).....	13
<b>1.3 L’épigénétique et l’imagerie cérébrale.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Problématique en épigénétique : la spécificité de la méthylation périphérique.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Les objectifs et hypothèses .....</b>	<b>17</b>

## CHAPITRE 2

<b>2. Article scientifique en voie de soumission.....</b>	<b>19</b>
---	-----------

## CHAPITRE 3

<b>3. Discussion .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Les corrélats neuronaux de la méthylation de l'ADN.....</b>	<b>39</b>
3.1.1 La connectivité au repos .....	39
3.1.2 La fonction cérébrale en réponse à la tristesse.....	40
<b>3.2 La méthylation à travers différents échantillons périphériques et sa stabilité temporelle .....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 Les associations entre la méthylation et la réactivité au stress quotidien.....</b>	<b>43</b>
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Forces et limites.....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Directions futures.....</b>	<b>45</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>47</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>52</b>

**Liste des tableaux**

**Table 1.....51**

Sample characteristics

**Table 2.....52**

Findings from fMRI multiple regression analyses

**Table 3.....54**

DNA methylation cross-tissue correlations

**Liste des figures**

**Figure 1** .....9

L'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien, ses glandes et leurs hormones régulatrices respectives

**Figure 2** .....11

Illustration simplifiée de la méthylation de l'ADN.

**Figure 3** .....53

Positive correlations between medial prefrontal cortex (mPFC) and fronto-limbic regions seed-to-voxel resting-state connectivity and saliva-derived NR3C1 methylation.

**Figure 4** .....30

Positive associations between buccal cell-derived FKBP5 mean methylation (CpG 6-7) and bilateral middle frontal (top) and left parahippocampal (bottom) activations in response to images of sad faces in an implicit emotional processing task.

**Figure 5** .....32

Associations between buccal cell- and saliva- derived NR3C1 (A) and FKBP5 (B) mean methylation.

## Liste des sigles et abréviations

ACTH: Hormone adrénocorticotrope  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
BDI: Beck Depression Inventory  
CH3+: Groupe méthyl  
CpG : Cytosine-Phosphate-Guanine  
CRH: Facteur de libération de corticotropine  
DLS: Daily Life Stress  
DMN: Default Mode Network  
EPQ: Eysenck Personality Questionnaire  
FKBP5: Gène FK506 Binding Protein 51  
fMRI: Functional Magnetic Resonance Imaging  
FWE: Family Wise Error  
HPA: Hypothalamo-Pituitary-Adrenal  
HPS: Hypothalamo-Pituitaire-Surrénalien  
LLP: Left lateral parietal  
MLES : Montreal Longitudinal Experimental Study  
MPFC: Medial prefrontal cortex  
NR3C1: Gène du récepteur des glucocorticoïdes  
PANAS: Positive and Negative Affect Schedule  
PCC: Posterior cingulate cortex  
PSS: Perceived Stress Scale  
QLSKC: Quebec Longitudinal Study of Kindergarten Children  
RLP: Right lateral parietal  
rsFC: Resting-State Functional Connectivity  
RSQ: Ruminative Response Scale  
SLC6A4 : Gène du transporteur de la sérotonine

# CHAPITRE 1

## Avant-propos

Le présent mémoire est présenté sous forme d'un article scientifique en voie de soumission (en préparation). Celui-ci sera précédé d'une introduction sous forme de revue de littérature et suivi d'une discussion et d'une conclusion. Le but de l'étude présentée était de valider l'utilisation d'échantillons biologiques périphériques non-invasifs dans l'étude du lien entre la méthylation de l'ADN, le fonctionnement cérébral et le comportement humain. La stabilité de la méthylation à travers différents types de tissus périphériques intra-individuels et à travers le temps a également été étudiée. Des telles études sont nécessaires étant donné l'utilisation de plus en plus courante d'échantillons périphériques dans les études épigénétiques s'intéressant aux corrélats neuronaux et phénotypiques de la méthylation de l'ADN au niveau de différents gènes.

## 1. Introduction

### 1.1 L'adversité précoce et la vulnérabilité aux troubles de santé mentale

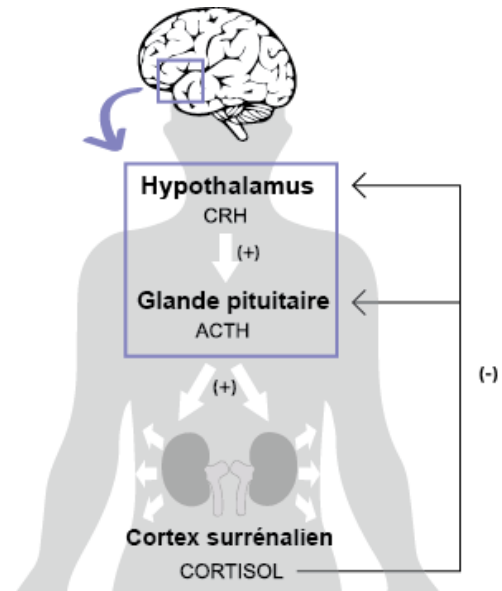
L'adversité précoce, particulièrement dans les premières années de la vie, est reconnue comme un important facteur de risque pour la vulnérabilité au développement de différents troubles neurodéveloppementaux [1, 2]. Bien que plusieurs mécanismes puissent tenir compte de cette association, une hypothèse acceptée est que l'expérience adverse précoce induit des changements structurels, fonctionnels et épigénétiques persistants dans les circuits neuronaux impliqués dans l'intégration du traitement cognitif et émotionnel, ainsi que dans la régulation endocrinienne [3-11]. Ces modifications seraient entre autres induites par des altérations au fonctionnement et à la sensibilité de l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (HPS), principal régulateur de la réponse de stress [3, 5, 7, 10].



### 1.1.1 La réponse physiologique de stress et l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (HPS)

L'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien (HPS) est le principal système neuroendocrinien de réponse au stress, et permet l'adaptation de l'organisme aux changements de demandes de l'environnement [12].

Aussitôt qu'une situation est interprétée, consciemment ou non, comme étant menaçante, une réponse physiologique de stress sera déclenchée. D'abord, suite à l'activation rapide du système nerveux sympathique, de l'adrénaline et de la noradrénaline (appelées *catécholamines*) seront sécrétés par les glandes surrénales. Par la suite et de façon parallèle, l'axe *hypothalamo-pituitaire-surrénalien* (axe HPS) déclenchera une série de réactions qui résultera en une sécrétion de *glucocorticoïdes* par les glandes surrénales (dont le *cortisol*, une importante hormone de stress chez l'humain). D'abord, l'hypothalamus synthétisera le facteur de libération de corticotropine (CRH), qui se liera à la glande pituitaire qui, suite à cette activation, synthétisera l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Celle-ci se propagera à travers le sang pour finalement activer les glandes surrénales au niveau du cortex surrénalien, ce qui mènera finalement au relâchement de cortisol à travers l'organisme [12, 13] (**Figure 1**).



**Figure 1.** L'axe hypothalamo-pituitaire-surrénalien, ses glandes et leurs hormones régulatrices respectives

CRH : facteur de libération de corticotropine  
ACTH : hormone adrénocorticotrope

L'ensemble de ces réactions permettra à l'individu de mobiliser les ressources nécessaires pour faire face à la menace que représente un stresser. Les niveaux circulants de ces hormones régulatrices permettront ultimement le retour à l'homéostasie à l'aide d'un mécanisme de rétroaction négative (partiellement illustré). Ce sont les récepteurs respectifs à chacune de ces hormones, situés sur les cellules-cibles au niveau des glandes régulatrices de l'axe HPS, qui permettront cette rétroaction que l'on nomme le *feedback* négatif. Le mécanisme de rétroaction négative du cortisol est illustré de façon simplifiée dans la **Figure 1**. Suite à la diffusion du cortisol à travers l'organisme et le cerveau, sa liaison aux récepteurs des glucocorticoïdes situés

au niveau de l'hypothalamus et de la glande pituitaire réduira leur activité et la synthèse de leurs hormones respectives, ce qui mènera ultimement à la réduction des niveaux de cortisol.

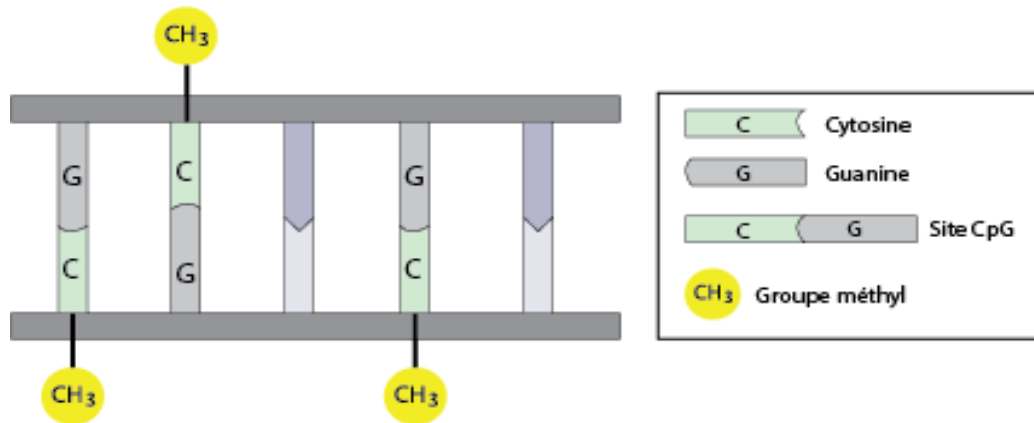
La réponse physiologique de stress est ainsi adaptative et bénéfique à court terme, c'est-à-dire face à un stress aigu. Par contre, l'efficacité de l'axe HPS et de ses composantes dépendra de leur réactivité et de la sensibilité de leurs récepteurs [14]. C'est ainsi qu'une activation chronique de la réponse de stress peut graduellement mener à des altérations au bon fonctionnement de l'axe HPS, soit via une sur-régulation ou une sous-régulation de sa sensibilité, tant au repos que face à un stress aigu [4, 15, 16]. Cette altération serait entre autres due à l'action répétée des glucocorticoïdes et autres hormones reliées sur leurs récepteurs, distribués à travers le corps et le cerveau, ajustant graduellement leur sensibilité aux demandes environnementales chroniques.

Il est ainsi bien accepté que la régulation précoce de l'axe HPS est centrale au développement d'une réponse au stress ultérieure optimale. Cependant, différents mécanismes peuvent soutenir cette association, et leurs fonctionnements précis demeurent peu connus à ce jour. La recherche penche actuellement vers une approche combinant l'influence mutuelle entre les facteurs génétiques et environnementaux dans l'explication de phénomènes complexes comme la vulnérabilité aux troubles de santé mentale. Entre autres, les procédés épigénétiques gagnent en intérêt pour leur rôle potentiel dans cette interaction. L'un des mécanismes potentiels soutenant l'influence du stress sur le développement cérébral et la vulnérabilité à la psychopathologie est la méthylation de l'ADN, un processus épigénétique au cœur de la recherche fondamentale en santé et, plus récemment, en santé mentale [4-8, 11, 17-19].

## **1.2 Les altérations de la réponse au stress : Les procédés épigénétiques**

Les procédés épigénétiques englobent l'ensemble des mécanismes chimiques par lesquels différents facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression génétique, menant subséquentement à l'altération à long terme de différents systèmes régulateurs à travers l'organisme [4, 17]. Alors que la séquence de l'ADN demeure stable à travers tout le corps et pendant toute la vie, l'épigénôme est dynamique en plus d'être spécifique aux différentes cellules du corps [20]. Différents mécanismes épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ou l'acétylation d'histones, permettent aux cellules de réguler l'expression de différents gènes sans

affecter la structure du génome en elle-même. Le processus épigénétique le plus étudié à ce jour demeure la méthylation de l'ADN [21], un procédé chimique qui consiste en l'ajout d'un groupe méthyl ( $\text{CH}_3$ ) sur la cytosine située au niveau de sites spécifiques de la structure de l'ADN, nommés sites Cytosine-Phosphate-Guanine (ou sites CpG). (**Figure 2**).



**Figure 2.** Illustration simplifiée de la méthylation de l'ADN.

Bien que la méthylation de l'ADN soit potentiellement réversible, elle constitue la marque épigénétique la plus stable puisqu'elle fait partie de la structure chimique de l'ADN [20]. Il est généralement accepté que les événements adverses précoces, c'est-à-dire pendant la période périnatale, influencent les niveaux de méthylation sur la structure de certains gènes régulateurs [5, 7, 17]. Cette modification au niveau de l'épigénôme agit typiquement de façon à réduire l'expression génétique, ce qui altère conséquemment le fonctionnement de différents gènes et systèmes régulateurs [4, 5, 17, 20]. La recherche psychiatrique se penche actuellement sur différents procédés épigénétiques au niveau de gènes impliqués dans le développement neuronal et le fonctionnement de l'axe HPS comme mécanisme potentiel sous-jacent à l'influence du stress précoce sur le développement de troubles de santé mentale [6-8, 10, 11, 22].

### 1.2.2 La méthylation de l'ADN et la vulnérabilité aux troubles de santé mentale

Depuis la découverte de modifications épigénétiques au niveau du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1) dans le cerveau de rats ayant reçu de faibles niveaux de soins maternels [23], le rôle des procédés épigénétiques dans la recherche fondamentale en santé mentale a considérablement

gagné en intérêt [11]. Une extension de ces résultats chez l'humain a été observée dans le cerveau post-mortem de victimes de suicide ayant été exposés à l'adversité précoce [24]. Cette étude était la première à démontrer l'impact de l'adversité précoce sur l'expression d'un gène central à la réponse de stress chez l'humain. Depuis, les études soutenant le rôle potentiel des procédés épigénétiques au niveau de gènes candidats en santé mentale se sont multipliées et continuent de susciter l'intérêt en recherche psychiatrique. Parmi d'autres, le gène du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1) et le gène FK506 Binding Protein 51 (FKBP5) sont deux gènes candidats largement étudiés pour leur rôle central dans la réponse de stress et, potentiellement, dans le développement et le maintien de différents troubles de santé mentale [6, 8, 10, 11, 22].

Ainsi, de plus en plus d'études se penchent sur les associations entre ce marqueur épigénétique et le comportement humain. Si nous parvenons à démontrer des associations entre des facteurs psychologiques et comportementaux et la méthylation de l'ADN au niveau de certains gènes candidats, de ce marqueur biologique pourrait devenir pertinent dans la détection de la vulnérabilité à certains troubles de santé mentale liés au stress, comme la dépression, l'anxiété, et trouble de stress post-traumatique.

### 1.2.3 Le gène du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1)

L'un des gènes régulateurs les plus étudiés pour son rôle central dans l'influence de l'adversité précoce sur la santé mentale est le gène du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1). Celui-ci code pour le récepteur des glucocorticoïdes, principal liant du cortisol. En plus d'assurer la régulation de cette hormone de stress et le bon fonctionnement de l'axe HPS, NR3C1 agit comme un facteur de transcription, permettant de réguler l'expression de différents gènes [13, 25]. Une méta-analyse récente a démontré une forte consistance à travers 22 études épigénétiques se penchant sur les effets de l'adversité précoce sur la méthylation du gène NR3C1 chez l'humain et l'animal [10]. Les auteurs suggèrent une association positive entre l'adversité précoce et la méthylation au niveau du promoteur de ce gène, ce qui pourrait sous-tendre la vulnérabilité au développement de psychopathologies liées à une altération au bon fonctionnement de la réponse de stress. Finalement, l'importance de la méthylation de ce gène dans la vulnérabilité au développement ultérieur de troubles de santé mentale liés au stress est

largement acceptée à ce jour [6, 10, 22]. En effet, une revue de littérature a précédemment mis de l'avant le rôle médiateur de la méthylation du gène NR3C1 dans l'influence de l'adversité précoce sur le développement de troubles psychiatriques liés au stress [22].

#### 1.2.4 Le gène FK506 Binding Protein 51 (FKBP5)

Un second gène central dans la réponse au stress est le gène FK506 Binding Protein 51 (FKBP5) qui code pour la protéine de liaison FKBP5. Celle-ci régule la sensibilité du récepteur des glucocorticoïdes (NR3C1) en réduisant son affinité pour le cortisol, diminuant conséquemment sa sensibilité et, à long terme, la régulation optimale de l'axe HPS [26]. Le relâchement de cortisol à travers l'organisme mènera rapidement à une augmentation des niveaux de FKBP5, ce qui permet une rétroaction négative rapide, diminuant la sensibilité de NR3C1 au cortisol. Des études animales ont démontré qu'une exposition chronique à la corticostérone est associée à une réduction des niveaux de méthylation du gène FKBP5 [27, 28], ce qui augmenterait son expression et entraînerait conséquemment une réduction de la sensibilité de l'axe HPS [29]. Une réduction des niveaux de méthylation du gène FKBP5 a également été démontrée chez les personnes atteintes du syndrome de Cushing, une condition caractérisée par des taux de cortisol chroniquement élevés [30]. Ainsi, l'exposition chronique aux glucocorticoïdes peut mener à une diminution des niveaux de méthylation du gène FKBP5, ce qui entraînerait une augmentation de sa transcription et de son expression comme tentative de diminuer la sensibilité de l'axe HPS au cortisol. Comme pour le gène NR3C1, l'association entre les expériences adverses précoces et la méthylation de FKBP5 est de plus en plus acceptée [8, 11, 31, 32].

Finalement, une revue systématique combinant 32 études portant sur l'impact de la méthylation au niveau de différents gènes liés au stress a tout récemment permis d'établir des implications cliniques importantes pour la méthylation au niveau des gènes NR3C1 et FKBP5 [6]. La majorité des études portant sur ces gènes soulignent leur rôle central dans le développement du trouble du stress post traumatique et de la dépression majeure. Entre autres, toutes les études épigénétiques rapportées démontrant une association entre le trouble de stress post-traumatique et la méthylation du gène NR3C1 ont démontré une baisse des niveaux de méthylation à travers différents tissus périphériques. Bien que la direction des niveaux de méthylation du gène FKBP5

et leurs implications ne soit pas aussi clairement définies, le rôle de ce gène et de ses modifications épigénétiques dans le développement du trouble de stress post-traumatique et de la dépression majeure est également de plus en plus reconnu [6, 8].

### **1.3 L'épigénétique et l'imagerie cérébrale**

La combinaison des domaines de l'imagerie cérébrale et de l'épigénétique psychiatrique a récemment mené à une nouvelle approche permettant l'observation plus ou moins directe de l'influence des modifications épigénétiques sur le développement, la structure et le fonctionnement du cerveau. Des études ont notamment démontré des associations entre la méthylation de l'ADN au niveau de différents gènes candidats, la neurotransmission à travers divers systèmes, ainsi que la structure cérébrale et la réponse neuronale à différents stimuli émotionnels [7, 33-35]. Une grande majorité de ces études ont investigué les corrélats neuronaux de la méthylation du gène du transporteur de la sérotonine (SLC6A4) étant donné son rôle central dans différents systèmes régulateurs impliqués dans l'humeur, la réponse au stress et le développement du cerveau [34, 36]. Entre autres, des associations ont été rapportées entre la méthylation de SLC6A4 chez l'humain et la synthèse de sérotonine dans le cerveau [35], la réponse neuronale fronto-limbique à des stimuli négatifs [37], la connectivité fronto-limbique au repos [38], et le volume de l'hippocampe [39]. Cependant, malgré l'intérêt accru pour l'influence de la méthylation au niveau des gènes NR3C1 et FKBP5 sur le risque de développement de psychopathologies, très peu d'études se sont penchées sur les corrélats neuronaux de ces modifications épigénétiques. Les études d'imagerie portant sur les modifications épigénétiques au niveau de FKBP5 ont davantage rapporté des modifications au niveau de la structure cérébrale. Par exemple, la méthylation de FKBP5 a été associée à un plus petit volume hippocampique droit chez des enfants ayant été victimes de traumatisme ([32]) et à un plus grand volume hippocampique chez des individus atteints du syndrome de Cushing ([30]). Aucune étude ne semble avoir rapporté des associations entre la méthylation de NR3C1 et la structure cérébrale à ce jour. Pour ce qui est du fonctionnement cérébral, une récente étude a démontré une association négative entre la méthylation de sites spécifiques du gène FKBP5, la gravité des symptômes dépressifs, et la réponse de l'amygdale à des stimuli positifs chez des patients souffrant de dépression comparativement à des sujets sains [40]. Dans la même étude, la méthylation de FKBP5 était également associée à une plus forte densité de la matière grise au

niveau du cortex orbito-frontal, indépendamment du diagnostic. Une étude sur les corrélats neuronaux de la méthylation de NR3C1 a été conduite auprès de femmes avec un historique de trouble de stress post-traumatique et d'exposition à la violence. Dans cette étude, les participantes étaient exposées à un extrait vidéo inducteur de stress dépeignant une situation de séparation mère-enfant. Une association positive a été observée entre la méthylation du gène NR3C1 et la réponse ventro-médiane, dorso-médiane et dorso-latérale préfrontale à ce stimulus inducteur de stress. Malgré l'importance de la connectivité cérébrale au repos dans la régulation émotionnelle et la réponse au stress [41, 42], aucune étude à ce jour ne s'est penchée sur le lien entre la méthylation au niveau de ces gènes et la connectivité cérébrale au repos. Toutefois, une association a été rapportée entre les variations génotypiques dites 'risquées' des gènes NR3C1 et FKBP5 et la connectivité fronto-limbique chez de jeunes enfants d'âge scolaire [43]. Dans cette étude, l'interaction entre ces profils génétiques et l'exposition à l'adversité précoce était prédictive de cette connectivité fronto-limbique qui, elle, était prédictive de la régulation émotionnelle et de la présence symptômes anxieux ultérieures. Ainsi, étant donné le rôle généralement accepté des gènes NR3C1 et FKBP5 (et de leurs variantes génotypiques) dans la vulnérabilité au développement de psychopathologies, des études sur les corrélats neuronaux de la méthylation au niveau de ces gènes sont nécessaires afin d'obtenir une meilleure compréhension de leurs rôles dans différents processus mentaux comme la régulation émotionnelle.

Les études émergentes combinant l'imagerie cérébrale et la méthylation de l'ADN supportent de plus en plus l'usage de la méthylation périphérique pour la compréhension de différents processus cérébraux [33, 34]. Certaines soulignent cependant l'importance de la spécificité de la méthylation de l'ADN aux différents tissus périphériques intra-individuels, et les limitations encourues par cette spécificité [34]. Alors que les études épigénétiques psychiatriques se multiplient à une vitesse importante, cette considération limite l'interprétation de résultats provenant d'études indépendantes [33, 34, 44].

#### **1.4 Problématique en épigénétique : la spécificité de la méthylation périphérique**

Une importante limitation en recherche épigénétique chez l'humain est la spécificité de la méthylation de l'ADN à travers différents types de prélèvements périphériques. Comme la

méthylation de l'ADN ne peut être directement mesurée dans le cerveau humain vivant, les chercheurs doivent se limiter à l'usage de prélèvements biologiques périphériques comme le sang, la salive et les cellules buccales, pour tenter d'inférer sur les niveaux potentiels de méthylation dans le cerveau. Par contre, nous savons aujourd'hui que les niveaux de méthylation d'un même gène peuvent différer à travers les différents types de prélèvements biologiques issus d'un même individu [33, 44]. Ainsi, les niveaux de méthylation mesurés dans un type de cellule périphérique ne seront pas nécessairement comparables à ceux mesurés dans un autre, ou même à ceux observables dans le cerveau.

Bien que la grande majorité des études épigénétiques fassent usage d'échantillons sanguins pour inférer sur les niveaux potentiels de méthylation au niveau du cerveau, nous en savons encore très peu sur la véritable correspondance entre la méthylation observée au niveau du sang et du cerveau. Certaines études ont démontré de faibles corrélations entre la méthylation issue d'échantillons sanguins et ceux observés dans le cerveau [45, 46], alors que d'autres suggèrent de fortes similarités [27, 47-49]. D'autres soulignent que cette spécificité de la méthylation aux différents tissus périphériques serait plutôt relative au gène à l'étude [44]. Cependant, peu d'études ont investigué les corrélations entre les niveaux de méthylation à travers différents tissus pour plus d'un gène candidat à la fois, ce qui pose un défi pour la comparaison de résultats d'études indépendantes. En ce qui a concerné les gènes candidats de la présente étude, une seule étude à ce jour a démontré une corrélation positive entre les niveaux de méthylation du gène FKBP5 observés dans des échantillons sanguins et ceux au niveau du cerveau animal [27]. Dans cette étude, des rats ont été exposés à différentes doses de glucocorticoïdes pendant quatre semaines, suite auxquelles les modifications de la méthylation de FKBP5 ont été comparées entre les tissus neuronaux et sanguins. Il a été démontré que les modifications des niveaux de méthylation observés dans le sang étaient significativement corrélées à ceux observés au niveau de l'hippocampe. Une autre étude a révélé de faibles corrélations entre les niveaux de méthylation du gène NR3C1 à travers différents tissus périphériques intra-individuels [44]. Dans cette étude, des échantillons sanguins, placentaires et salivaires ont été utilisés. Ceux-ci avaient préalablement été recueillis à la naissance auprès de 27 nouveau-nés dans le cadre d'une étude longitudinale. Une importante variabilité a été rapportée entre les niveaux de méthylation à travers ces différents types de prélèvements biologiques. Finalement, une étude a démontré que



les échantillons salivaires pourraient être davantage informatifs que les échantillons sanguins en ce qui concerne la méthylation observée au niveau du cerveau, et ce, même si les niveaux de méthylation des échantillons salivaires sont davantage hétérogènes que ceux issus d'échantillons sanguin [50]. Les auteurs ajoutent que ce sont les échantillons salivaires comprenant les plus hauts taux de cellules buccales qui seraient les plus significativement associées à la méthylation au niveau du cerveau. Ces résultats sont similaires à ceux démontrés dans une autre étude suggérant que les cellules buccales pourraient être davantage informatives que les cellules sanguines dans l'étude de modifications épigénétiques périphériques [51].

En somme, la spécificité de la méthylation de l'ADN à travers différents tissus périphériques au niveau intra-individuel demeure une limitation importante et une question aux résultats mitigés. Malgré le peu de connaissances actuelles concernant la spécificité de la méthylation de l'ADN à travers différents tissus, de plus en plus d'études supportent la pertinence de l'utilisation de la méthylation périphérique pour l'étude de différents processus mentaux et du comportement [7, 10, 33, 34, 50]. Les tissus périphériques non invasifs facilement accessibles comme salive et les cellules buccales sont de plus en plus utilisés en épigénétique [50]. Cependant, bien que cela permette un échantillonnage plus simple et moins invasif que les prélèvements sanguins, nous ne savons toujours pas à quel point les niveaux de méthylation à travers ces différents tissus sont comparables. De plus, malgré l'utilisation généralisée d'échantillons périphériques, nous ne savons toujours pas s'il existe un type de cellule périphérique particulier qui soit davantage sensible aux associations entre la méthylation de l'ADN, le fonctionnement cérébral, et le comportement humain.

### **1.5 Les objectifs et hypothèses**

Le premier objectif de cette étude est de vérifier les associations entre la méthylation périphérique des gènes NR3C1 et FKBP5, des mesures de fonction cérébrale, et différentes mesures comportementales. Nous croyons que les niveaux de la méthylation périphérique de ces deux gènes candidats seront associés à la réponse fronto-limbique à des stimuli négatifs, à la connectivité cérébrale fronto-limbique au repos. Nous examinerons l'ampleur de ces associations à travers les différents types de prélèvements périphériques recueillis. Nos deux autres objectifs sont d'évaluer la stabilité de la méthylation de l'ADN à travers différents tissus périphériques et à

travers le temps. Nous émettons l'hypothèse que les niveaux de méthylation mesurés au niveau des différents tissus périphériques seront corrélés les uns aux autres et demeureront stables pour une période d'au moins deux ans, une période correspondant au temps écoulé entre les deux collectes de données effectuées pour ce projet. La méthodologie, les analyses statistiques et les résultats de la présente étude sont présentés à travers l'article scientifique en voie de soumission faisant l'objet du prochain chapitre.

## CHAPITRE 2

### 2. Article scientifique en voie de soumission

#### **Peripheral DNA methylation of HPA axis-related genes in humans: neural correlates, tissue specificity and long-term stability.**

Auteurs: Di Sante, J., Ismaylova, E., Nemoda, Z., Yu, W-J., Szyf, M., Gouin, J-P., Vitaro, F., Tremblay, R., Booij, L.

## 1. Introduction

Early life adversity is an important risk factor for the development of various mental health disorders later in life [1, 2], although the exact mechanisms underlying this association remain unclear. An increasingly accepted hypothesis is that early stress can have a long-lasting influence on gene expression through epigenetic modifications, such as DNA methylation, which disrupt developmental trajectories and outcomes by interfering with neurobiological pathways [5, 7, 17, 18]. DNA methylation is an epigenetic mechanism in which a methyl group is added to the cytosine in cytosine-phosphate-guanine dinucleotide sequences of DNA (CpG sites), allowing cells to control and regulate gene expression without modifying the genome itself. When located at the promoter level of the gene, DNA methylation typically acts to repress gene transcription and, thus, gene expression. Though DNA methylation is a dynamic and potentially reversible process, it is one of the most stable epigenetic marks given that it is part of the DNA's chemical structure [20, 21].

Current psychiatric epigenetic research focuses on DNA methylation in genes regulating neuronal development and function as a pivotal molecular mechanism underlying the risk for mental health outcomes [5, 7, 19]. Following the identification of tissue-specific DNA methylation changes in the hippocampal glucocorticoid receptor gene promoter in relation to childhood abuse in humans [24], numerous studies have investigated associations between methylation in stress related genes, early life adversity and psychopathology in living humans. However, as DNA methylation generally cannot be assessed directly in the living human brain, researchers must rely on DNA methylation levels in peripheral tissues such as blood, saliva and buccal cells as a potential proxy for those in the brain.

One of the most widely studied stress related genes in relation to early life adversity and mental health is the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene. NR3C1 codes for the glucocorticoid receptor, which functions as a transcription factor that binds to glucocorticoid response elements in the promoters of glucocorticoid responsive genes to activate their transcription, or as a regulator of other transcription factors [15]. NR3C1 regulation allows for the control of its expression and, ultimately, adaptation to stress exposure by influencing feedback and functioning of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis [15, 52]. Early adversity is

associated with epigenetic changes to the promoter region of the NR3C1 gene, influencing NR3C1 expression, which in turn may alter HPA-axis functioning and responses to stress [10, 11, 53]. A systematic review of human and animal studies on early life adversity and NR3C1 methylation, covering 24 human studies, reported a positive association between peripheral NR3C1 methylation and early life adversity [10]. Although most studies reported using blood derived methylation (20 studies, vs 2 using saliva and 1 using buccal cells), these findings suggest that peripheral NR3C1 methylation constitutes a promising biological marker of consequences of early life adversity in humans and animals. However, whether these associations vary in a tissue-specific manner, or whether NR3C1 methylation remains stable in time is still unclear.

Another widely studied stress-related gene and important in the regulation of the HPA axis is the FK506 Binding Protein 5 gene (FKBP5). This gene codes for the FKBP5 binding protein, which in turn regulates glucocorticoid receptor (NR3C1) sensitivity [52]. FKBP5 protein levels are increased following stress exposure via binding of activated NR3C1 to intronic and promoter NR3C1 response elements. By binding to the NR3C1 complex, the protein reduces the affinity of NR3C1 to cortisol, providing an ultrashort negative feedback for NR3C1 activation [26, 52]. Animal studies have shown that chronic corticosterone exposure is associated with lower FKBP5 methylation levels [27, 28], which in turn increase FKBP5 expression, leading to reduced stress-resiliency [29]. Lower blood-derived FKBP5 methylation has also been shown in individuals with Cushing's syndrome, a condition characterized by chronically elevated cortisol levels [30]. Thus, chronic glucocorticoid exposure may lead to decreased FKBP5 methylation levels in humans and in animals, resulting in an upregulation of FKBP5 transcription and expression as an attempt to decrease NR3C1 sensitivity.

A number of FKBP5 genotype studies have shown links with vulnerability to psychiatric disorders, especially in the presence of early life adversity [26, 31]. Alleles associated with enhanced expression of FKBP5 following NR3C1 activation have been shown to be overrepresented in major depression, bipolar disorder and post-traumatic stress disorder, and to be associated with a faster response to antidepressant treatment [52].

Over the past few years, several human FKBP5 gene methylation studies have been published, focusing on its relation to the experience of trauma and childhood adversity. However, findings are somewhat mixed. For instance, two independent studies found decreased FKBP5 methylation in saliva samples of maltreated children [54], and in whole blood and saliva samples of adult victims of childhood trauma [32], respectively. In contrast, other studies have shown increased rather than decreased methylation of FKBP5 in relation to current and past stress exposure. One reported greater methylation in purified monocytes of children from low socioeconomic environments [55]. Interestingly, increased FKBP5 blood-derived methylation was found in Holocaust survivors in comparison to healthy controls [56], whereas decreased methylation was found in survivor offspring in comparison to control offspring. Further, decreased methylation levels were associated with lower wake-up cortisol levels in survivor offspring, providing additional support for the functional relevance for FKBP5 methylation. Furthermore, there is some evidence that the association between childhood adversity and FKBP5 methylation modifications may be partly moderated by FKBP5 risk alleles [31, 32]. Moreover, a recent review of 32 studies on early life adversity, DNA methylation in several genes and human disease (including 5 studies on FKBP5 and mental health outcomes) further supported the implications of FKBP5 DNA methylation in mental health outcomes such as post-traumatic stress disorder and depression [6]. Although causality in these studies cannot be determined, taken together, these findings may suggest that extreme stressors may lead to altered FKBP5 methylation levels, which, in turn, may lead to a dysregulation of the HPA axis and a greater risk for developing stress-related disorders.

In addition to studies examining links between stress, behavior and peripheral DNA methylation, there is a growing amount of human epigenetic imaging studies aiming to investigate the role of peripheral DNA methylation in brain morphology and function. Most of these studies however focused on the links between brain processes and peripheral methylation in the serotonin transporter gene. Overall these studies showed that greater serotonin transporter methylation as assessed in peripheral cells was associated with lower serotonin synthesis [35] as well as with greater frontal-limbic brain responses to emotional information[37], greater resting state default mode network connectivity [38] and smaller hippocampal volume [39]. Very few studies have specifically investigated neural correlates of NR3C1 and FKBP5 methylation. One study

exposed women with a history of violence exposure and PTSD to a stress-inducing video of mother-child separation [57]. In this study, saliva NR3C1 methylation was positively associated to ventromedial, dorsomedial and dorsolateral prefrontal neural activity in response to the stress-inducing video. A recent study in patients with MDD reported a negative association between whole blood FKBP5 methylation and amygdalar reactivity to positive stimuli, as well as depressive symptom severity [40]. In the same study, blood FKBP5 methylation was also positively associated with grey matter concentration in the inferior frontal orbital gyrus, independent of MDD diagnosis.

Although more studies are needed, these preliminary results may support the relevance of HPA-axis genes' DNA methylation in peripheral cells for the understanding of brain processes involved in stress and emotional regulation. They also raise the question of whether DNA methylation as assessed in peripheral cells could serve as a non-invasive marker for neural sensitivity to stress. However, although such marker would be of interest from a clinical perspective, many important methodological questions have yet to be resolved. For instance, in addition to using blood, studies are increasingly assessing DNA methylation in easily accessible, non-invasive peripheral tissues such as saliva and buccal cells. However, little is known regarding which peripheral tissue's methylation levels correlate best with measures of stress; i.e. is most sensitive to detect individual differences in neural and behavioural stress sensitivity. Therefore, our first goal was to study the association between measures of frontal-limbic human brain processes and behavioral measures of stress reactivity with peripheral candidate genes NR3C1 and FKBP5 DNA methylation derived from commonly used surrogate tissues collected from the same individuals (saliva, buccal cells). We hypothesized that DNA methylation in both candidate genes would be associated with decreased fronto-limbic resting state connectivity, greater frontal-limbic responses to negative stimuli, greater behavioral stress sensitivity, and we explored these associations across peripheral tissue samples. We also assessed DNA methylation stability in the NR3C1 and FKBP5 gene across different peripheral tissues (aim 2), and across time (aim 3). We hypothesized that methylation levels assessed from different tissues would correlate with one another, and would remain stable between both data collections, which were conducted 2 years apart.

## **2. Experimental procedures**

### **2.1 Participants**

51 adults (24 Females and 27 Males,  $M= 36$ ,  $SD= 1.2$ ) were recruited in the Montreal area from two longitudinal cohorts; the Montreal Longitudinal and Experimental Study (MLES), and the Quebec Longitudinal Study of Kindergarten Children (QLSKC). The MLES is a longitudinal cohort from 1984, initially aiming to follow the development of over 1,000 kindergarten boys from 53 schools in the lowest socio-economical areas of Montreal, who were deemed at risk for developing antisocial and aggressive behavior [58]. The QLSKC is a population-based prospective study cohort designed to study the prevalence, development and consequences of behavioral and emotional problems during elementary school [59]. Kindergarten boys and girls attending French-speaking public schools in the Canadian province of Quebec in 1986 and 1987 were included in the cohort.

Of the 51 participants included in the present study, 16 had previously been visited two years earlier, where 3 peripheral DNA samples were collected (saliva, buccal cells and blood), making this recent data collection the second wave of the study, only including more participants. Moreover, 44 had undergone a brain scanning session [38]. For the purpose of the latter study, participants for whom blood methylation data was available were re-contacted and screened for the following exclusion criteria: (1) history and presence of any Axis I disorder, neurological disorder, head injury, or severe medical illness, (2) current medication intake, and (3) presence of any irremovable metals in the body. Following a brief initial phone interview, eligible participants were invited for a face-to-face screening interview. Personal history and presence/absence of Axis I disorders were assessed using the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-IV) [60], whereas brain-imaging exclusion criteria were verified using an in-house questionnaire. The Beck Depression Inventory (61) was used as well, to measure depressive symptoms. The study was approved by the Sainte-Justine Hospital ethics board and written informed consent was obtained from participants.



## **2.2 Epigenetic assessments**

Home visits were scheduled to collect different types of peripheral DNA samples. Participants were first asked to provide 2ml saliva samples by passive drooling into a 15 ml tube. They were subsequently asked to rub the inside of their mouths with six different cotton swabs to collect epithelial cells from the inner cheeks, inner bottom and upper lip, palate, and gums. Saliva and buccal cell samples were kept frozen from collection to analysis. During the first data collection, a certified nurse was present during home visits to collect 6ml blood samples as well.

Whole blood, saliva- and buccal cell-derived NR3C1 and FKBP5 DNA methylation was assessed using our assays that were previously applied and validated in our laboratory, [40, 61, 62]). We targeted CpG sites 6–7 of intron 7, bin 2 for the FKBP5 gene based on previous reports [32, 40], and Exon 1F sites 30-31 and 35-38 for NR3C1, based on a recent meta-analysis demonstrating the increased interest in these specific sites in the past decade [22]. Further, these NR3C1 CpG sites are biologically relevant considering they constitute known and putative binding sites of the NGFI-A binding factor [22, 24]. Site-specific methylation analyses were performed by pyrosequencing using PyroMark Q96 (Qiagen, Venlo, Limburg, Netherlands) at CFI Imaging and Molecular Biology Platform in the Department of Pharmacology and Therapeutics of McGill University. Methylation in each CpG site was analyzed in triplicates and, mean methylation at each CpG site was computed across all replicates. When a sample did not pass quality control, mean methylation was calculated from 2 of the replicates. The statistical analyses for associations with phenotype were conducted using mean methylation levels as well as individual CpG sites. For NR3C1, we used mean and individual methylation levels of CpGs 30, 31, and 35 to 38 (different mean values included 30-31, 35-38 and 30-38). As for FKBP5, we used mean and individual methylation levels of CpGs 6 and 7.

## **2.4 Assessment of stress sensitivity**

During and after the home visits of the second wave of the study, self-reported questionnaires were administered to assess stress sensitivity. The short, 12 item version of the neuroticism subscale of the Eysenck Personality Questionnaire (EPQ) was used to assess anxiety-related personality traits known to predict stress vulnerability [63]. Furthermore, the Perceived Stress Scale, a self-reported questionnaire comprising 14 items was used to assess perceived stress and

chronic demand encountered in the last month (e.g. ‘‘In the last month, how many times have you felt like you couldn’t achieve everything you needed to do?’’) [64].

Next, during the 5 days following the home visit, participants were asked to answer a short online questionnaire, the Daily Life Stress questionnaire (DLS), which was constructed by our team and colleagues based on previously validated and commonly used questionnaires [65-67]. Participants were instructed to report information on their levels of stress and their mood within a 24-hour period for five consecutive days, generating as much as possible a valid measure of reactivity to daily life stress in different spheres of life (e.g., at work, at home). The Daily Life Stress questionnaire comprises four subscales: Rumination, Severity of Stress Exposure, Chronicity of Distress/Psychological Demand, as well as Positive and Negative affect. The Rumination subscale was based on The Ruminative Responses Scale (RSQ), initially including 22 items [68]. Eight of these statements were selected for the DLS questionnaire, including statements related to worry and excessive guilt (e.g. ‘‘I wondered why I always react this way’’). The Severity of Stress Exposure subscale was based on the Daily Inventory of Stressful Event [69] and assesses the occurrence, nature and intensity of stressful events having occurred in the last 24 hours, in different spheres of life such as work, family life, social or marital life, etc. (e.g. In the past 24 hours, have you experienced any situation at work that most people would consider as stressful? If so, how stressful would you qualify this situation?). The Chronicity of Stress/Psychological Demand subscale provides a measure of the chronicity of perceived stress and psychological burden experienced in the last 24 hours. Participants were asked to rank to what extent they had to 1) work hard, 2) work fast and 3) take charge of several tasks at once. Finally, the Positive and Negative affect subscale was based on the Positive And Negative Affect Schedule (PANAS) [70], and assesses the extent to which participants had experienced positive or negative emotions in the past 24 hours (Happy, Enthusiastic, Energetic, Determined, Irritable, Sad, Nervous, Embarrassed).

### **2.3 Neuro-imaging**

All participants were scanned on a 3 Tesla Siemens TIM Trio Scanner ([www.medical.siemens.com](http://www.medical.siemens.com)) located at the Montreal Neurological Institute (MNI) using a 32-channel head-coil. The scan included a brief localizer, followed by a 9-minute-long anatomical

scan (MPRAGE sequence; 176 slices; TR=2300 ms, TE=2.98 ms, FA=9°, FOV=256 mm, matrix=256x256x176, voxel size=1mm x 1mm x 1mm), 6-minute-long functional resting-state scan (gradient EPI sequence; 180 whole-brain volumes; TR=2300 ms, TE=30 ms, FA=30°, FOV=224 mm, matrix=224x224x151, voxel size=3.5 mm x 3.5mm x 3.5 mm,) during which participants were asked to close their eyes, while remaining awake [71]. They also underwent a 15-minute-long functional scan during which an emotion-processing task was performed (gradient EPI sequence; 400 whole-brain volumes; TR=2300 ms, TE=30 ms, FA=30°, FOV=224 mm, matrix=224x224x151, voxel size=3.5mm x 3.5mm x 3.5mm). The emotion-processing task was adjusted from the task used in Canli and colleagues [72, 73] and consisted of series of 120 Ekman faces with different emotions (happy, sad, angry, fearful and neutral) from the Pictures of Facial Affect series [74]. During this task, 18 blocks of emotional facial images were presented, each block consisting of six randomized trials (3 faces of men and 3 faces of women). For each trial, participants had to fixate a cross in the middle of the screen (1 second), followed by an emotional face (2 seconds), after which participants had to choose whether the face was of male or female nature by pressing the corresponding key. For the purpose of this study, we focused on the negative stimuli of sadness and fear.

### **3. Statistical analyses**

#### **3.1 Image analyses**

Statistical Parametric Mapping (SPM12 v6470, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London UK) implemented in MATLAB R2010a (Mathworks, Sherborne, MA) was used for brain imaging analyses.

##### *Resting-state functional connectivity*

The CONN functional connectivity toolbox [version 16.b] was utilized for resting-state functional connectivity analysis [75]. Using CONN toolbox pipeline [75] and based on SPM12, functional images were spatially realigned to correct for interscan movement, while structural images were segmented and normalized to the Montreal Neurological Institute (MNI) reference brain. Functional images were also normalized to the reference brain, followed by the outlier detection (ART-based scrubbing). All the images were then smoothed using an 8-mm FWHM Gaussian kernel. A denoising procedure including the component-based correction method [76] and temporal band-pass filtering of 0.008 Hz-0.09 Hz, followed by the first-level analysis, was

applied to remove motion artifacts and other artefactual effects from the fMRI signal, with ART-detected outliers included as first-level nuisance covariates. Lastly, because the Default Mode Network (DMN) is an important resting-state network [77, 78], seed-to-voxel analyses with four DMN seeds (posterior cingulate cortex [PCC], medial prefrontal cortex [PFC], right lateral parietal [RLP] and left lateral parietal [LLP] areas) were performed. For the connectivity analyses, brain regions were examined at a voxel-wise threshold of  $p < .001$ , with cluster-wise family-wise error correction (FWE)-correction for multiple comparisons [79] threshold set at  $p < .05$ . All peak coordinates are reported in MNI format. We performed multiple regression fMRI analyses with buccal cell- and saliva-derived NR3C1 and FKPB5 methylation as second-level variables. The same variables of interest were implemented to test for voxel-wise correlations with seed-to-voxel resting-state connectivity.

### *Functional fMRI*

Functional data acquired during the emotion-processing task were preprocessed in SPM12: images of all participants were first corrected for slice timing differences in acquisition, realigned to the first image to correct for small head movements, co-registered with their anatomical scan, spatially normalized into an EPI stereotactic Space (MNI template) and smoothed with an 8-mm full width at half maximum (FWHM) Gaussian kernel in order to improve the signal-to-noise ratio and correct for minor heterogeneity in neural anatomy across participants. Next, intra-individual first level analyses were performed to calculate (emotion minus neutral) contrasts for each emotion at each voxel. Then, second-level whole-brain analysis was performed, followed by a region of interest analysis. Masks for the regions of interest (PFC, ACC, insula, hippocampus and amygdala) were obtained from AAL within the Wake Forest University Pick Atlas utility [version 3.0.5] [80, 81]. For the functional analyses, whole-brain regression analyses were performed using SPM12. Brain regions were examined at a voxel-wise threshold of  $p < .001$ , with cluster-wise family-wise error correction (FWE)-correction for multiple comparisons (Shaffer, 1995) threshold set at  $p < .05$ . Only clusters with a spatial extent of at least 10 contiguous voxels were considered (with the exception of the amygdala for which was threshold was set at 5 contiguous voxels considering its smaller volume), and smoothness non-uniformity correction was applied. All peak coordinates are reported in MNI format.

### **3.2 DNA methylation cross-convergence, time stability and associations with self-reported measures**

Simple correlation analyses and paired sample t-tests were conducted using IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) to verify methylation tissue specificity and two-year time stability, respectively. Simple correlation analyses were also conducted to study associations between self-reported questionnaires and DNA methylation. Multi-level modelling using Statistical Analysis Software (SAS) using PROC MIXED was used to study associations between scores on the Daily Life Stress subscales, collected during 5 consecutive days, and DNA methylation. To test whether peripheral DNA methylation was associated with daily life stress reactivity, multilevel modeling was conducted. Multi-level modeling allowed us to control for the dependence of events, as daily life stress ratings are nested within the participant. Secondly, multilevel modeling enables the analysis of an unbalanced number of events, i.e. unequal number of ratings per participant.

The data set had two levels: level 1, the event level, consisted of the daily life stress ratings; level 2, the person level, consisted of the peripheral methylation percentages per participant. Thus, daily life stress ratings were nested within the participants. Cross-level main effects were investigated by regressing the 5 daily life stress subscales (Positive Affect, Negative Affect, Rumination, Stress Severity, Chronic Demand) on peripheral DNA methylation (mean percentage). Separate bivariate linear mixed models were performed for each methylation measure (buccal cell NR3C1 methylation, saliva NR3C1 methylation, buccal cell FKBP5 methylation, saliva FKBP5 methylation).

## 4. Results

### 4.1 Sample description

**Table 1** shows the characteristics of the included sample. Methylation levels are reported as means, however CpG-by-CpG methylation levels are reported in the appendix. BDI-II scores at both study time points were generally considered low compared to normative scores [82].

### 4.2 Aim 1: Associations between DNA methylation and brain processes

#### *Resting-state functional connectivity*

##### NR3C1

*Buccal cells.* No association between NR3C1 buccal cell methylation and resting-state functional connectivity was found.

*Saliva.* Greater saliva-derived NR3C1 mean methylation (CpGs 35-38) was associated with greater resting-state functional connectivity (rsFC) within the medial prefrontal cortex (mPFC), namely between mPFC and bilateral paracingulate gyrus, bilateral frontal pole, and anterior cingulate gyrus ( $k=964$ , cluster  $p_{FWE} < .001$ , voxel  $p < .001$ , peak MNI coordinates: -04, 52, -04). Saliva-derived NR3C1 mean methylation was also associated with greater rsFC between mPFC and right temporal gyrus ( $k=527$ , cluster  $p_{FWE} < .001$ , voxel  $p < .001$ , peak MNI coordinates: 64, -14, -32), right hippocampus ( $k=154$ , cluster  $p_{FWE} = .03$ , voxel  $p < .001$ , peak MNI coordinates: 30, -14, -24), and left occipital gyrus ( $k=170$ , cluster  $p_{FWE} = .02$ , voxel  $p < .001$ , peak MNI coordinates: -48, -68, 40). **Figure 3** illustrates these associations with scatterplots showing how connectivity values in these clusters vary with peripheral NR3C1 saliva methylation.

##### FKBP5

No association between buccal cell- or saliva- derived FKBP5 methylation and resting-state functional connectivity was found.

#### *Neural response to negative emotions*

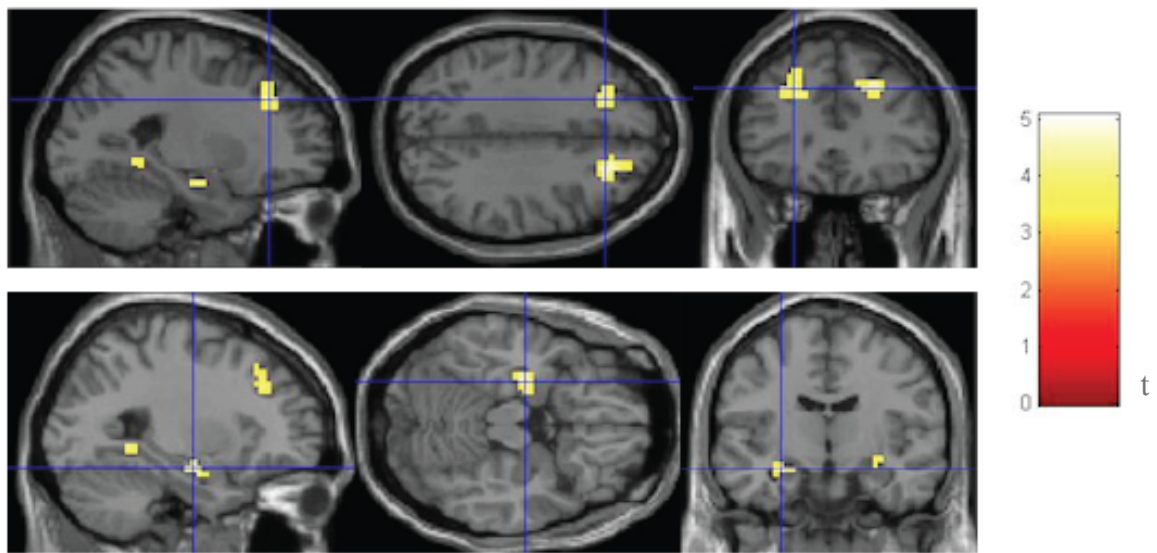
##### NR3C1

Buccal cell and saliva mean NR3C1 methylation levels were not associated with neural responses to negative stimuli. No significant associations were found when using methylation levels from individual CpG sites.

## FKBP5

*Buccal cells.* Results regarding associations between FKBP5 methylation and functional imaging are reported in **Table 2**, with respective MNI coordinates. We found positive associations between buccal cell-derived FKBP5 mean methylation (CpG 6-7), bilateral middle frontal and left para-hippocampal activations in response to stimuli of sadness, although results did not survive correction for multiple comparisons.

*Saliva.* Saliva-derived FKBP5 methylation did not show any significant association with fMRI BOLD signal in response to emotional stimuli.



**Figure 4.** Positive associations between buccal cell-derived FKBP5 mean methylation (CpG 6-7) and bilateral middle frontal (top) and left parahippocampal (bottom) activations in response to images of sad faces in an implicit emotional processing task.

### 4.3 Aim 2: DNA methylation cross-tissue convergence

Cross-tissue correlation analyses were performed between blood, saliva, and buccal cell methylation levels. Since blood samples were only available at the first wave of the study, correlations with blood were conducted with the 16 participants included in the first wave of the study. Correlations between buccal cell and saliva methylation were conducted among the 51 participants included in the second wave.

## NR3C1

No significant correlations were found between mean NR3C1 methylation, regardless of cell type (buccal cells, saliva or blood), at either time points (all  $r$  values  $< |.31|$ , all  $p$  values  $> .28$ ) (all correlations are reported in **Table 3** in appendix). No results were found when using different means (CpGs 30-31 or CpGs 35-38) or CpG sites individually. **Figure 5A** further illustrates low overall correlations between buccal cell- and saliva- derived mean methylation (CpGs 30, 31, 35-38).

## FKBP5

We found significant correlations between buccal cell- and saliva-derived FKBP5 mean methylation levels ( $N=51$ ,  $r = .70$ ,  $p < .0001$ ). Taken individually, methylation in CpG 6 and in CpG 7 also showed cross-tissue correlations between buccal cell and saliva samples ( $N=51$ , all  $r$  values  $> .70$ , all  $p$  values  $< .001$ ) (**Figure 5B**). Blood-derived FKBP5 methylation levels did not correlate with those derived from buccal cells ( $N = 16$ ,  $r = .14$ ,  $p = .60$ ) or saliva ( $N=16$ ,  $r = .33$ ,  $p = .21$ ) at the first wave of the study.

### 4.4 Aim 3: DNA methylation two-year stability

We also aimed to assess test-retest stability of methylation levels in all tissue samples. As blood samples were only collected during the first wave of the study, methylation time stability was assessed for saliva and buccal cell samples.

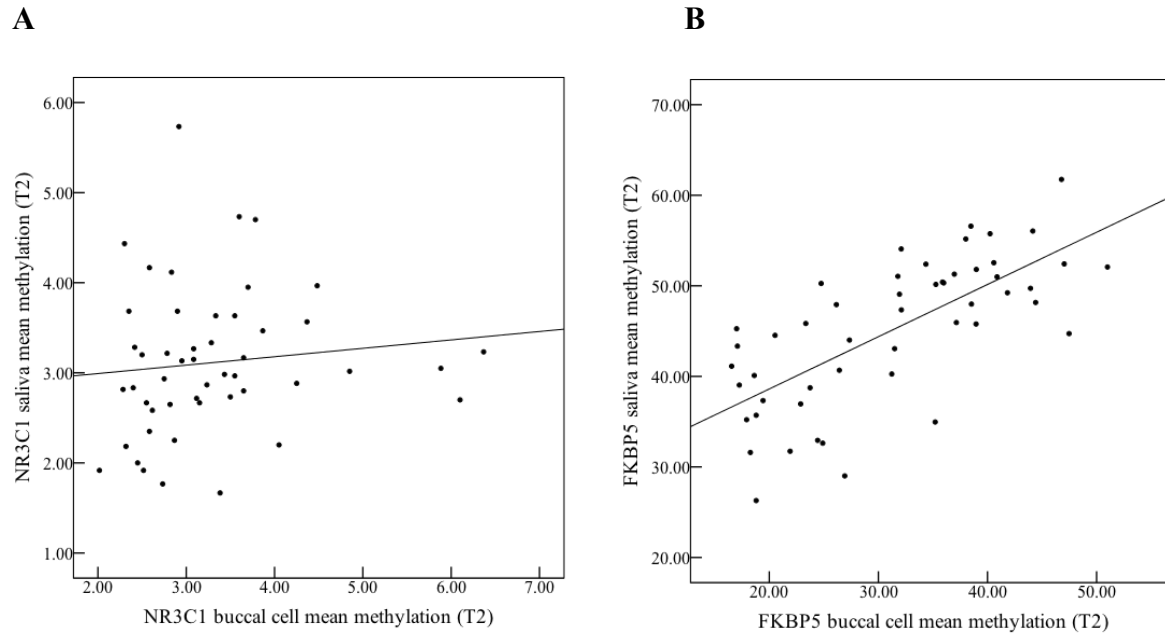
## NR3C1

Paired sample t-tests revealed that mean NR3C1 methylation (CpGs 30, 31, 35-38) derived from both buccal cells ( $t = -1.79$ ,  $p = .10$ ) and saliva ( $t = .45$ ,  $p = .66$ ) were not significantly different between both data collections, which were conducted 2 years apart. Analyses using different means (30-31, 35-38) or individual CpG sites yielded comparable results (all  $p$  values  $> .10$ ).

## FKBP5

Mean FKBP5 methylation levels from both buccal cells ( $t = 1.36$ ,  $p = .20$ ) and saliva ( $t = -1.01$ ,  $p = .33$ ) also did not differ significantly between both study time points. CpG-by-CpG analyses did not change these results (all  $p$  values  $> .10$ ).





**Figure 5.** Associations between buccal cell- and saliva- derived NR3C1 (**A**) and FKBP5 (**B**) mean methylation. (**A**) Mean was calculated with CpGs 30, 31, 35-38 ( $r = .11$ ,  $p = .47$ ). (**B**) Mean was calculated with CpGs 6 and 7 ( $r = .70$ ,  $p < .0001$ ).

#### 4.5 Association between DNA methylation and self-reported questionnaires

Simple Pearson correlations did not yield significant associations between NR3C1 or FKBP5 methylation and either the Neuroticism scale of the Eysenck Personality Questionnaire or the Perceived Stress scale (all  $r$  values  $< |.20|$ , all  $p$  values  $> .16$ ). As for the Daily Life Stress online questionnaire, multilevel modelling analyses revealed significant positive associations between both saliva ( $t = 3.26$ ,  $p = .02$ ) and buccal cell ( $t = 2.61$ ,  $p = .01$ ) mean FKBP5 methylation and scores on Severity of Stress Exposure subscale. In addition, mean NR3C1 (CpG sites 35-38) buccal cell methylation was negatively associated with total scores on the Chronic Distress/Psychological Demand subscale ( $t = -2.13$ ,  $p = .04$ ). No other significant associations were found between DNA methylation and self-reported questionnaires.

## 5. Discussion

The present study aimed to investigate associations between DNA methylation in two extensively studied HPA axis-related genes, NR3C1 and FKBP5, resting state functional

connectivity and fronto-limbic responses to emotional stimuli, as well as to examine these associations across different peripheral cell types.

### 5.1 DNA methylation and resting-state functional connectivity

We found a positive association between saliva-derived NR3C1 methylation and rsFC within the medial prefrontal cortex (mPFC) as well as between mPFC, temporal gyrus, and hippocampus. Greater connectivity between these regions may suggest the presence of stronger neural networks allowing for more effective communication between fronto-limbic brain regions implicated in emotional control and stress regulation. However, the direction of our results raises additional questions. We found that greater NR3C1 methylation, theoretically underlying lower expression and therefore lower levels of the glucocorticoid receptor throughout the body, was associated with greater connectivity between different fronto-limbic regulating regions. These results raise the possibility that NR3C1 down-regulation may be associated with greater fronto-limbic connectivity in healthy adults. Interestingly, another study by our group found similar results regarding peripheral methylation of serotonin transporter gene (SLC6A4). In this study, greater SLC6A4 methylation, perhaps underlying sub-optimal serotonin transmission and emotional regulation [7, 35], was associated with greater frontal-limbic resting state connectivity as well [38]. These findings, in addition to ours, raise the possibility that greater connectivity between frontal-limbic regions may underlie optimized neural and emotional regulation and, consequently, higher resilience to the potential adverse effects of such epigenetic phenotypes in healthy adults. Indeed, our sample, carefully followed for almost three decades did not have any history of psychopathology. To our knowledge, this is the first study to investigate resting-state connectivity correlates of NR3C1 methylation. However, one genotype study previously found opposite results, suggesting associations between NR3C1 genotype “risk” variants (influencing glucocorticoid receptor and cortisol regulation) and weakened fronto-limbic connectivity in school-aged children, an association that was exacerbated by early adversity [43]. It would be imperative to investigate whether such “risk” neural phenotypes remain through adulthood and to what extent changes in neural connectivity might predict resilience for various mental health outcomes. Given these findings and the generally accepted importance of NR3C1 DNA methylation in the risk for stress-related disorders, it would be necessary to verify the presence

and direction of such associations in individuals from clinical populations where epigenetic modifications in this stress related gene might be expected.

## 5.2 DNA methylation and functional imaging

Interestingly, while our resting-state connectivity results suggested statistically significant associations with methylation derived from saliva but not buccal cells, and with NR3C1 but not FKBP5, functional imaging analyses revealed the opposite effect. Positive associations were found between buccal cell-derived FKBP5 methylation and bilateral middle frontal and left parahippocampal response to sad emotional stimuli. However, since these observations did not remain significant after correction for multiple comparisons and considering the small cluster sizes, the relevance of FKBP5 methylation for neural response to emotional stimuli may be questioned. Several epigenetic imaging studies, mostly focusing on the serotonin transporter gene (SLC6A4), have reported significant associations between DNA methylation and neural responses to emotional stimuli [34, 37]. It is possible that stress related genes such as NR3C1 and FKBP5 might play less a role in emotional processing related neural mechanisms and therefore not as relevant for emotional task paradigms. However, noteworthy is the finding that buccal cell- derived FKBP5 methylation captured associations between methylation and neural response to sadness that saliva-derived methylation did not. Although we did not verify associations between blood-derived methylation and brain related processes, these findings are in line with two previous reports. One study found that buccal cells might constitute a more informative source of epigenetic information than blood [51], while another reported that saliva methylation may better capture methylation levels in the brain than blood methylation, especially in saliva samples containing higher levels of buccal epithelial cells [50]. This further supports the relevance of buccal epithelial cells for studying the link between peripheral methylation and brain processes. Considering that buccal epithelial and brain cells are derived from the ectodermal layer during development [50], the use of buccal epithelial cells might constitute a biologically relevant cell type in addition to showing greater associations with brain methylation and brain function than other peripheral tissues, although more studies are needed to confirm these associations.

Albeit functional imaging results were not as strong as the ones for resting-state connectivity, the finding that saliva- and buccal cell- derived methylation levels of NR3C1 and FKBP5 differently captured two putatively related brain processes raises important questions. Though peripheral DNA methylation remains a proxy of that in the brain, our results raise the possibility that methylation in different peripheral tissues - and in different genes- might be distinctively informative of singular brain processes. Additionally, although these findings, their implications and their underlying mechanisms can only be speculated at this state, they raise important considerations for future studies. It would be imperative to use multiple non-invasive peripheral samples when studying DNA methylation and its relevance for- and sensitivity to different brain processes.

### 5.3 DNA methylation tissue-specificity and time-stability

We also studied tissue-specificity and time stability of NR3C1 and FKBP5 methylation. Buccal cell- and saliva-derived FKBP5 methylation levels were correlated to one another but did not correlate with those derived from blood samples. One reason could be that the sample size at the first wave of the study, when blood samples were collected, might not have been large enough to detect significant associations between methylation levels in all three tissues. Interestingly, NR3C1 methylation patterns did not show any cross-tissue correlations. One possible explanation may be related to the low overall NR3C1 methylation levels, as commonly reported in independent epigenetic studies [10, 44]. Although this low cross-tissue convergence may be due to overall limited variance in NR3C1 methylation levels, these findings raise concerns, considering the increasing number of studies focusing on peripheral NR3C1 methylation, its relevance for psychopathology-related brain processes and its use as a marker for therapy response. Whether NR3C1 methylation levels can be considered stable across peripheral tissues despite low statistical correlations requires further investigation, as the functional relevance of minor NR3C1 methylation variations remains unclear. In addition, reviews on NR3C1 methylation similarly argue that one of the main limitations in such reports remains the methodological heterogeneity between studies, such as the use of different peripheral tissues, and the assessment of methylation in different CpG sites [7, 10, 22, 83]. This consequently limits comparison and interpretation of results from independent epigenetic studies. We thus aimed to verify tissue specificity and time stability in the most commonly investigated and biologically

relevant NR3C1 CpG sites. Future studies are needed to replicate our findings as well as to assess these elements in clinical populations, in which altered NR3C1 and HPA-axis functioning might be expected. We also found that NR3C1 and FKBP5 methylation patterns in saliva and buccal cell samples remained stable across a two-year period. Using an epigenome wide approach (using the Illumina 450K assay) in a sample of healthy adolescents, saliva derived DNA methylation time-stability has previously been reported by our group to vary between different candidate genes across the genome during a 3 to 6-month period [84]. Future studies should aim to further investigate short- and long-term DNA methylation stability in various candidate genes to better understand this variability and their implications for mental health outcomes.

#### 5.4 DNA methylation and self-reported behavioral measures

There were no significant correlations with measures of depression or neuroticism or perceived stress. This is not surprising, since variability in these self-reported measures was low. Studies reporting associations between self-reported measures of depression have focused on clinical populations, which might explain the lack of significant results in our healthy sample. However, interestingly, using a more detailed measure of reactivity to stress in daily life measuring stress sensitive over a 5-day period, buccal cell NR3C1 methylation in specific CpG sites was negatively associated with daily stress chronicity and psychological demand, whereas buccal cell- and saliva- derived FKBP5 methylation was positively associated with stress severity. This not only provides further indication that buccal cell methylation might be more sensitive than saliva methylation for investigating associations between FKBP5 and stress-related processes, but also raises the possibility that NR3C1 methylation might represent a better indicator of the chronicity of the stress response, whereas FKBP5 methylation might better capture the effects of day-to-day stressor severity. Further studies are needed to support these hypotheses.

#### 5.5 Strengths and limitations

Some considerations may have limited the interpretation of our results. The smaller sample size during the first wave of the study limits the generalizability of our findings, and did not allow us to verify the association between blood-derived methylation and brain processes. Further, the absence of blood samples in the second wave of the study did not allow the assessment of test-

retest stability of blood derived DNA methylation. Finally, statistical power limitations did not allow control for sex or genotype variations, although the relevance for FKBP5 genotype variants in relation to the risk for psychopathology has previously been reported [11, 32, 54]. Future epigenetic imaging studies should aim to control for this limitation when functional relevance of genotype variants might be expected. Nonetheless, this is the first study, to our knowledge, to verify both cross-tissue convergence and time stability of DNA methylation in HPA axis-related genes within the same individuals, contributing to the understanding of this epigenetic marker. Further, all participants were recruited from a well-documented longitudinal sample followed for more than three decades, allowing access to prospective measures of their history and careful control over non-confounding factors. Moreover, the investigated regions and CpG sites were selected *a priori*, based on previous work. Finally, methylation analyses were conducted in the same laboratory and the same technician, thereby minimizing technical variation.

## **6. Conclusion**

In this study, we found significant associations between FKBP5 methylation levels derived from buccal cells and saliva, as well as a two-year stability of NR3C1 and FKBP5 methylation. These findings further contribute to our understanding of DNA methylation as tissue specific, but also suggest that tissue-specificity might in turn be gene specific. Further, our results regarding neural correlates of DNA methylation in NR3C1 and FKBP5 suggest that methylation levels derived from different genes and peripheral tissues may differently capture measures of neural processes and behavior. However, additional research is needed to replicate and better elucidate these findings. Still very little is known about the validity of the use of peripheral tissue methylation and its association with brain processes and behavior. Accumulating findings from independent psychiatric epigenetic studies stress the importance of assessing these methodological issues in healthy as well as clinical cohorts, especially for commonly studied stress-related genes.

## CHAPITRE 3

### 3. Discussion

Cette étude avait pour but de vérifier les associations entre la méthylation périphérique au niveau de deux gènes liés au stress, NR3C1 et FKBP5, la fonction cérébrale et la connectivité cérébrale au repos. Nous avons également vérifié si ces associations différaient selon le type de prélèvement périphérique utilisé. Parallèlement, nous avons examiné si les niveaux de méthylation observés dans chacun de ces prélèvements étaient corrélés les uns aux autres, et s'ils demeuraient stables dans le temps. À notre connaissance, il s'agit de la première étude vérifiant à la fois les corrélats neuronaux de la méthylation périphérique au niveau de ces gènes et la spécificité de cette association à travers différents prélèvements. Il s'agit également de la première étude comparant les niveaux de méthylation observés à travers différents types de prélèvements biologiques, et vérifiant leur stabilité temporelle. Comme il a été décrit précédemment, les gènes à l'étude sont couramment et de plus en plus étudiés dans le domaine de l'épigénétique psychiatrique. Leurs rôles centraux dans la régulation de la réponse au stress et dans la vulnérabilité aux troubles de santé mentale comme la dépression, l'anxiété et le trouble de stress post-traumatique font de ces gènes des candidats importants dans ce domaine émergent. Cependant, alors que les évidences de telles associations s'accumulent, il demeure que ces études font usage de différents prélèvements périphériques, ce qui limite grandement leur généralisabilité.

#### 3.1 Les corrélats neuronaux de la méthylation de l'ADN

##### 3.1.1 La connectivité au repos

Selon les résultats obtenus, la méthylation de NR3C1 mesurée au niveau de la salive serait associée à une plus grande connectivité fronto-limbique au repos. Puisqu'il s'agit de la première étude à notre connaissance démontrant une association entre la méthylation du gène du récepteur des glucocorticoïdes et la connectivité cérébrale au repos, des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux comprendre la généralisabilité et les implications de nos résultats. Les régions cérébrales impliquées font partie intégrante du système fronto-limbique, principal

régulateur des émotions [36]. Une plus forte connectivité entre ces régions pourrait suggérer la présence de réseaux neuronaux permettant une communication plus efficace entre les différentes régions impliquées, et, conséquemment, une meilleure régulation émotionnelle. Cependant, la direction de nos résultats mène à des questionnements additionnels. Nous avons trouvé qu'une plus grande méthylation de NR3C1, sous-tendant théoriquement une plus faible expression de ce gène et donc de plus faibles niveaux du récepteur des glucocorticoïdes à travers l'organisme, serait associée à une plus forte connectivité entre différentes régions fronto-lobales régulatrices. Nos résultats suggèreraient ainsi qu'une sous-régulation du gène NR3C1 serait associée à une plus forte connectivité fronto-lobale, et possiblement une meilleure régulation émotionnelle, chez des adultes en santé. Une étude dans notre laboratoire a récemment rapporté des résultats similaires en ce qui concerne le gène du transporteur de la sérotonine (SLC6A4) [38]. Dans cette étude, une plus grande méthylation du gène SLC6A4 a été associée à une plus forte connectivité fronto-lobale au repos chez les mêmes individus en santé faisant partie de la présente étude. Les auteurs émettent l'hypothèse que cette plus forte connectivité pourrait sous-tendre une meilleure résilience chez ces individus en santé, mais qui seraient théoriquement plus vulnérables au développement de troubles de santé mentale, étant donné ces altérations au niveau de l'épigénome. Cette hypothèse a également été émise dans une étude d'imagerie fonctionnelle chez des individus en santé, où une association positive a été observée entre la méthylation de SLC6A4 et l'activation de régions cérébrales impliquées dans le contrôle cognitif en réponse à des stimuli émotionnels négatifs [37]. Il serait nécessaire de vérifier la présence et la direction de telles associations entre la méthylation de l'ADN et la connectivité fronto-lobale au repos chez des sujets provenant de populations cliniques, où des modifications épigénétiques au niveau de gènes liés au stress pourraient être attendues.

### 3.1.2 La fonction cérébrale en réponse à la tristesse

Contrairement à ce qui a été observé concernant la connectivité cérébrale, ce sont les niveaux de méthylation au niveau du gène FKBP5, plutôt que NR3C1, qui étaient associés à la connectivité fronto-lobale. Qui plus est, ce sont les échantillons de cellules buccales plutôt que les échantillons salivaires qui ont montré une association entre la méthylation et la fonction cérébrale. Ces résultats suggèrent que, du moins pour ce gène en particulier, les cellules buccales



pourraient être plus sensibles que les échantillons salivaires dans la détection d'associations entre la méthylation de l'ADN et le fonctionnement cérébral. Cependant, les associations observées demeurent faibles et n'ont pas survécu la correction pour comparaisons multiples, ce qui limite l'interprétation des résultats. Les études d'imagerie fonctionnelle faisant usage de telles tâches émotionnelles ont auparavant été utilisées dans le domaine de la génétique et ont plus récemment suscité un intérêt en épigénétique [33, 34]. Cependant, leur pertinence et leur sensibilité dans le domaine émergent de l'épigénétique n'est pas entièrement comprise à ce jour. Des études ont démontré des associations entre la méthylation de certains gènes liés au traitement émotionnel comme le gène du transporteur de la sérotonine et la réponse fronto-lobique à différents stimuli émotionnels [34]. Par contre, il est possible que ce type de tâche ne soit pas aussi sensible, ou même pertinent, dans le cas de modifications épigénétiques au niveau de gènes liés au stress. Ensemble, ces résultats d'imagerie fonctionnelle suggèrent que, même si les associations observées entre la méthylation de FKBP5 et la réponse fronto-lobique aux émotions sont plutôt faibles, les échantillons de cellules buccales pourraient constituer un type de prélèvement périphérique davantage sensible que les échantillons salivaires dans l'étude du lien entre la méthylation de l'ADN et la fonction cérébrale.

Bien qu'il soit difficile de se prononcer sur la portée et les implications de ces résultats à ce stade, ceux-ci soulèvent d'importantes considérations pour de futures études épigénétiques psychiatriques. D'abord, le fait que deux différents gènes - ainsi que deux différents types de cellules périphériques - aient été associés à des mécanismes cérébraux différents suggère une possible spécificité génétique et cellulaire dans les associations entre la méthylation de l'ADN et le fonctionnement cérébral. Ainsi, lors de l'étude du lien entre la méthylation de l'ADN et différents processus mentaux ou phénomènes comportementaux, il serait réfléchi de comparer ces associations entre différents tissus périphériques intra-individuels, comme la salive, le sang, et les cellules buccales. La majorité des études épigénétiques faisant actuellement usage d'échantillons sanguins plus invasifs, une collecte additionnelle de prélèvements non-invasifs de salive et de cellules buccales lors de la collecte d'échantillons biologiques serait relativement simple à effectuer.

### **3.2 La méthylation à travers différents échantillons périphériques et sa stabilité temporelle**

Nos résultats suggèrent que les niveaux de méthylation du gène FKBP5 mesurés dans la salive et les cellules buccales sont corrélés les uns aux autres, mais qu'ils ne seraient pas corrélés à ceux dérivés du sang. De plus, aucune corrélation n'a été observée entre les niveaux de méthylation de NR3C1 à travers les trois différents types de prélèvements. Enfin, les niveaux de méthylation des gènes NR3C1 et FKBP5 dérivés des cellules buccales et de la salive seraient tous demeurés stables durant une période de deux ans. L'absence d'associations entre la méthylation sanguine et celle mesurée au niveau des autres échantillons pourrait, en partie, être expliquée par le plus petit échantillon constituant la première collecte de données, lors de laquelle les échantillons sanguins ont été collectés. Toutefois, significatives ou non, les corrélations observées pour les échantillons sanguins étaient plutôt faibles. Des études supplémentaires à plus grande échelle seront nécessaires pour en connaître davantage sur la spécificité de la méthylation à travers différents tissus périphériques intra-individuels.

Malgré ces limitations, nos résultats contribuent davantage à notre compréhension de la méthylation de l'ADN comme spécifique à différents tissus, mais suggère également que cette spécificité de la méthylation à différents types de cellules pourrait à son tour être spécifique à différents gènes. Cette observation selon laquelle la spécificité de la méthylation aux différents tissus périphériques peut varier selon le gène à l'étude a déjà été rapportée [44]. Dans cette même étude, une faible corrélation entre les niveaux de méthylation de NR3C1 à travers différents tissus périphériques a d'ailleurs été observée, suggérant une forte spécificité cellulaire de la méthylation pour ce gène. Par contre, les faibles niveaux de méthylation fréquemment observés pour le gène NR3C1 [10, 44] pourraient avoir influencé la force de ces corrélations. Il a également été rapporté que la stabilité temporelle de la méthylation de l'ADN pourrait être spécifique aux gènes, celle-ci demeurant plus stable au niveau de certains gènes que d'autres sur une période de 3 à 6 mois [84]. Ensemble, ces résultats suggèrent que la stabilité de la méthylation à travers différents tissus périphériques intra-individuels et à travers le temps pourrait différer selon le gène à l'étude. Des études futures seront nécessaires pour répliquer ces résultats à plus grande échelle et au niveau de différents gènes candidats, notamment ceux suscitant un fort intérêt en épigénétique psychiatrique.

### **3.3 Les associations entre la méthylation et la réactivité au stress quotidien**

Enfin, nos résultats ont démontré une association négative entre la méthylation de NR3C1 au niveau des cellules buccales et les mesures auto-rapportées de stress chronique et de demande psychologique, alors que la méthylation de FKBP5 dérivée de la salive et des cellules buccales était positivement associée à l'intensité du stress quotidien. Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires et que d'autres études seront nécessaires pour étayer ces disparités, celles-ci soulèvent la possibilité que la méthylation de NR3C1 puisse constituer un potentiel indicateur de la chronicité de la réponse au stress, alors que la méthylation de FKBP5 pourrait être davantage associée à son intensité. Il est à noter que plusieurs corrélations ont été conduites à la fois, et qu'une correction pour analyses multiples aurait dû être considérée. Aucune étude à ce jour n'a démontré de telles associations différentielles. Il est possible que différents systèmes neuroendocriniens soient activés de façon respectueuse par la durée et l'intensité de la réponse au stress, ce qui serait traduit par des modifications épigénétiques au niveau des différents gènes régulateurs de cette réponse. Des études supplémentaires seront nécessaires pour investiguer ces associations et permettront de déterminer si les marqueurs épigénétiques au niveau de ces gènes candidats seraient pertinents dans la détection de la vulnérabilité à certains troubles de santé mentale liés au stress. De plus, si la méthylation au niveau de différents gènes sont associés à différentes composantes du stress (chronicité, intensité), il serait ultimement possible de détecter le risque de développer différents troubles de santé mentale, comme le trouble de stress post-traumatique, la dépression, ou même l'épuisement professionnel. En plus de mieux savoir détecter la vulnérabilité au développement de ces troubles, de tels avancements scientifiques pourraient ultimement guider le développement de stratégies thérapeutiques spécifiques visant à réduire l'impact de cette vulnérabilité épigénétique.

### **4. Conclusion**

Pris ensemble, les résultats de la présente étude soulèvent davantage de questions qu'elles n'en répondent. Les études épigénétiques psychiatriques en sont encore à un stade embryonnaire, rendant les études méthodologiques comme celle-ci nécessaires afin de soulever différents défis et des considérations futures. Nous en savons encore très peu sur la pertinence de l'usage de mesures épigénétiques périphériques dans la compréhension de différents processus mentaux et

du comportement humain. Cependant, les études à ce sujet se multipliant rapidement, il demeure important de mettre à l'avant certains défis. D'abord, le choix de sites CpG dans l'étude de la méthylation au niveau d'un gène candidat reste une limitation importante dans la comparaison et l'interprétation d'études épigénétiques indépendantes. Une compréhension approfondie de la pertinence fonctionnelle et empirique de différents sites est de mise avant de déterminer les sites à l'étude. De plus, les techniques de mesure de la méthylation de l'ADN peuvent varier d'une étude à l'autre, ce qui limite également l'interprétation des résultats indépendants. L'usage de ces différentes techniques d'analyse épigénétique dépendra donc des différentes approches méthodologiques. Par exemple, certaines études se pencheront sur la méthylation au niveau de différents gènes candidats alors que d'autres mesureront plutôt la méthylation au niveau du génome en entier, ce qui influence la méthodologie rapportée et, conséquemment, l'interprétation de résultats d'études indépendantes.

Enfin, des études méthodologiques comme celle-ci tirent leur importance du fait qu'elles permettront possiblement l'élaboration d'un potentiel marqueur biologique dans la détection du risque au développement de différents troubles de santé mentale. Ce faisant, l'identification et la meilleure compréhension de cet indice pourrait mener au développement de stratégies thérapeutiques, psychologiques ou médicales, visant à réduire l'impact de ces procédés épigénétiques.

#### **4.1 Forces et limites**

Certaines considérations peuvent avoir limité l'interprétation de nos résultats. D'abord, la plus petite taille d'échantillon lors de la première collecte de données limite la généralisation de nos résultats et n'a pas permis de vérifier l'association entre la méthylation dérivée du sang et les différentes mesures cérébrales et comportementales. Le fait que l'échantillon initial (N=16) était uniquement constitué d'homme limite également l'interprétation des résultats. De plus, l'absence d'échantillons sanguins lors de la deuxième collecte de données n'a pas permis l'évaluation de la stabilité temporelle de la méthylation dérivée du sang. Enfin, le contrôle des variations génotypiques à travers l'échantillon n'était pas possible pour des raisons de pouvoir statistique. Des études futures en neuro-imagerie épigénétique devraient viser à contrôler ce facteur lorsque la pertinence fonctionnelle des variantes génotypiques pourrait être attendue.

Néanmoins, il s'agit de la première étude à notre connaissance vérifiant à la fois la méthylation de l'ADN à travers différents tissus périphériques et sa stabilité temporelle auprès des mêmes individus. Il s'agit également de la première à étudier les corrélats neuronaux fonctionnels de ces deux gènes liés au stress chez la même population. De plus, tous les participants ont été recrutés à partir d'un échantillon longitudinal en santé et bien documenté, suivi depuis plus de trois décennies, permettant l'accès à des mesures prospectives et un contrôle minutieux de facteurs non confondants. Enfin, les erreurs techniques méthodologiques ont été limitées par le fait que toutes les analyses de méthylation ont été menées par la même équipe technique dans le même laboratoire.

#### **4.2 Directions futures**

Nos résultats soulignent l'importance de comparer les associations étudiées entre la méthylation de l'ADN et différents mécanismes ou phénotypes à travers les différents types de cellules périphériques issues d'un même individu. Les études épigénétiques futures bénéficieraient de l'utilisation de multiples prélèvements périphériques dans le but de vérifier leur stabilité et leur sensibilité respective à différentes mesures neuro-fonctionnelles, neuro-anatomiques ou comportementales. De telles études permettraient possiblement l'identification éventuelle d'un type de cellule périphérique davantage sensible à ces différentes mesures, ce qui mènerait à une plus grande homogénéité dans la littérature scientifique émergente en épigénétique, et permettrait ultimement la comparaison de résultats d'études indépendantes. En plus de faire usage de multiples échantillons périphériques, les études futures combinant la neuro-imagerie et l'épigénétique pourraient vérifier les associations respectives de la méthylation de l'ADN et différents processus cérébraux à la fois, comme la fonction, la structure et la connectivité cérébrale au repos. Ces différents processus étant tous recueillis lors d'une même séance d'imagerie, il s'agirait d'un moyen relativement simple permettant d'approfondir les connaissances actuelles sur la pertinence de mesures de méthylation périphérique en neuro-imagerie.

Enfin, afin de mieux définir les rôles respectifs de ces deux gènes dans la vulnérabilité aux troubles de santé mentale liés au stress, des études futures pourraient vérifier les associations

entre différentes mesures d'adversité précoce (durée, intensité, type), la méthylation de NR3C1 et FKBP5, et le fonctionnement fronto-limbique. Elles pourraient vérifier les rôles respectifs de la méthylation au niveau de ces deux gènes dans la relation entre l'adversité précoce et la réponse fronto-limbique à une tâche émotionnelle comme celle utilisée dans cette étude.

## Bibliographie

1. Edwards, V.J., et al., *Relationship between multiple forms of childhood maltreatment and adult mental health in community respondents: results from the adverse childhood experiences study*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(8): p. 1453-60.
2. Kessler, R.C., C.G. Davis, and K.S. Kendler, *Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey*. Psychol Med, 1997. **27**(5): p. 1101-19.
3. Heim, C., et al., *The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(6): p. 693-710.
4. Murgatroyd, C., et al., *Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress*. Nat Neurosci, 2009. **12**(12): p. 1559-66.
5. Murgatroyd, C. and D. Spengler, *Epigenetic programming of the HPA axis: early life decides*. Stress, 2011. **14**(6): p. 581-9.
6. Argentieri, M.A., et al., *Epigenetic Pathways in Human Disease: The Impact of DNA Methylation on Stress-Related Pathogenesis and Current Challenges in Biomarker Development*. EBioMedicine, 2017. **18**: p. 327-350.
7. Booij, L., et al., *Looking beyond the DNA sequence: the relevance of DNA methylation processes for the stress-diathesis model of depression*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2013. **368**(1615): p. 20120251.
8. Klengel, T., et al., *The role of DNA methylation in stress-related psychiatric disorders*. Neuropharmacology, 2014. **80**: p. 115-32.
9. Murgatroyd, C. and D. Spengler, *Epigenetics of early child development*. Front Psychiatry, 2011. **2**: p. 16.
10. Turecki, G. and M.J. Meaney, *Effects of the Social Environment and Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Methylation: A Systematic Review*. Biol Psychiatry, 2016. **79**(2): p. 87-96.
11. Tyrka, A.R., K.K. Ridout, and S.H. Parade, *Childhood adversity and epigenetic regulation of glucocorticoid signaling genes: Associations in children and adults*. Dev Psychopathol, 2016. **28**(4pt2): p. 1319-1331.
12. McEwen, B.S., *Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1032**: p. 1-7.
13. Lupien, S.J., et al., *Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(6): p. 434-45.
14. Spencer, R.L. and T. Deak, *A users guide to HPA axis research*. Physiol Behav, 2016.
15. Herbert, J., et al., *Do corticosteroids damage the brain?* J Neuroendocrinol, 2006. **18**(6): p. 393-411.
16. van Bodegom, M., J.R. Homberg, and M. Henckens, *Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 87.
17. Szyf, M., *Early life, the epigenome and human health*. Acta Paediatr, 2009. **98**(7): p. 1082-4.
18. Szyf, M., *The early life environment and the epigenome*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(9): p. 878-85.
19. Turecki, G., et al., *Early life adversity, genomic plasticity, and psychopathology*. Lancet Psychiatry, 2014. **1**(6): p. 461-6.

20. Szyf, M., *The dynamic epigenome and its implications in toxicology*. Toxicol Sci, 2007. **100**(1): p. 7-23.
21. Jones, P.A. and G. Liang, *Rethinking how DNA methylation patterns are maintained*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(11): p. 805-11.
22. Palma-Gudiel, H., et al., *Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation processes as mediators of early adversity in stress-related disorders causality: A critical review*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. **55**: p. 520-35.
23. Weaver, I.C., et al., *Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1024**: p. 182-212.
24. McGowan, P.O., et al., *Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse*. Nat Neurosci, 2009. **12**(3): p. 342-8.
25. Datson, N.A., et al., *Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression*. Eur J Neurosci, 2001. **14**(4): p. 675-89.
26. Zannas, A.S. and E.B. Binder, *Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism*. Genes Brain Behav, 2014. **13**(1): p. 25-37.
27. Ewald, E.R., et al., *Alterations in DNA methylation of Fkbp5 as a determinant of blood-brain correlation of glucocorticoid exposure*. Psychoneuroendocrinology, 2014. **44**: p. 112-22.
28. Lee, R.S., et al., *Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice*. Endocrinology, 2010. **151**(9): p. 4332-43.
29. Sabbagh, J.J., et al., *Age-associated epigenetic upregulation of the FKBP5 gene selectively impairs stress resiliency*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107241.
30. Resmini, E., et al., *Reduced DNA methylation of FKBP5 in Cushing's syndrome*. Endocrine, 2016. **54**(3): p. 768-777.
31. Klengel, T. and E.B. Binder, *Allele-specific epigenetic modification: a molecular mechanism for gene-environment interactions in stress-related psychiatric disorders?* Epigenomics, 2013. **5**(2): p. 109-12.
32. Klengel, T., et al., *Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions*. Nat Neurosci, 2013. **16**(1): p. 33-41.
33. Nikolova, Y.S. and A.R. Hariri, *Can we observe epigenetic effects on human brain function?* Trends Cogn Sci, 2015. **19**(7): p. 366-73.
34. Nikolova, Y.S., J.R. Swartz, and A.R. Hariri, *Can we identify meaningful epigenetic effects on human brain function and related risk for mental illness?* Epigenomics, 2016. **8**(10): p. 1307-1310.
35. Wang, D., et al., *Peripheral SLC6A4 DNA methylation is associated with in vivo measures of human brain serotonin synthesis and childhood physical aggression*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39501.
36. Booij, L., et al., *Genetic and early environmental influences on the serotonin system: consequences for brain development and risk for psychopathology*. J Psychiatry Neurosci, 2015. **40**(1): p. 5-18.
37. Frodl, T., et al., *DNA methylation of the serotonin transporter gene (SLC6A4) is associated with brain function involved in processing emotional stimuli*. J Psychiatry Neurosci, 2015. **40**(5): p. 296-305.



38. Ismaylova, E., et al., *Serotonin transporter gene promoter methylation in peripheral cells in healthy adults: neural correlates and tissue specificity*. . European Neuropsychopharmacology, submitted., 2017.
39. Booij, L., et al., *DNA methylation of the serotonin transporter gene in peripheral cells and stress-related changes in hippocampal volume: a study in depressed patients and healthy controls*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119061.
40. Tozzi, L., et al., *Structure and function of emotional processing areas correlating with peripheral whole blood FKBP5 DNA methylation in major depressive disorder*. Submitted 2017.
41. Fan, Y., et al., *Early life stress modulates amygdala-prefrontal functional connectivity: implications for oxytocin effects*. Hum Brain Mapp, 2014. **35**(10): p. 5328-39.
42. Hulvershorn, L.A., K. Cullen, and A. Anand, *Toward dysfunctional connectivity: a review of neuroimaging findings in pediatric major depressive disorder*. Brain Imaging Behav, 2011. **5**(4): p. 307-28.
43. Pagliaccio, D., et al., *Amygdala functional connectivity, HPA axis genetic variation, and life stress in children and relations to anxiety and emotion regulation*. J Abnorm Psychol, 2015. **124**(4): p. 817-33.
44. Armstrong, D.A., et al., *Global and gene-specific DNA methylation across multiple tissues in early infancy: implications for children's health research*. FASEB J, 2014. **28**(5): p. 2088-97.
45. Davies, M.N., et al., *Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood*. Genome Biol, 2012. **13**(6): p. R43.
46. Walton, E., et al., *Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research*. Schizophr Bull, 2016. **42**(2): p. 406-14.
47. Horvath, S., et al., *Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue*. Genome Biol, 2012. **13**(10): p. R97.
48. Masliah, E., et al., *Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes*. Epigenetics, 2013. **8**(10): p. 1030-8.
49. Tylee, D.S., D.M. Kawaguchi, and S.J. Glatt, *On the outside, looking in: a review and evaluation of the comparability of blood and brain "-omes"*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2013. **162B**(7): p. 595-603.
50. Smith, A.K., et al., *DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence tissue specificity and relatedness to brain*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2015. **168B**(1): p. 36-44.
51. Lowe, R., et al., *Buccals are likely to be a more informative surrogate tissue than blood for epigenome-wide association studies*. Epigenetics, 2013. **8**(4): p. 445-54.
52. Binder, E.B., *The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34 Suppl 1**: p. S186-95.
53. van der Knaap, L.J., et al., *Methylation of NR3C1 and SLC6A4 and internalizing problems. The TRAILS study*. J Affect Disord, 2015. **180**: p. 97-103.
54. Tyrka, A.R., et al., *Childhood maltreatment and methylation of FK506 binding protein 5 gene (FKBP5)*. Dev Psychopathol, 2015. **27**(4 Pt 2): p. 1637-45.

55. Needham, B.L., et al., *Life course socioeconomic status and DNA methylation in genes related to stress reactivity and inflammation: The multi-ethnic study of atherosclerosis*. Epigenetics, 2015. **10**(10): p. 958-69.
56. Yehuda, R., et al., *Holocaust Exposure Induced Intergenerational Effects on FKBP5 Methylation*. Biol Psychiatry, 2016. **80**(5): p. 372-80.
57. Schechter, D.S., et al., *Methylation of NR3C1 is related to maternal PTSD, parenting stress and maternal medial prefrontal cortical activity in response to child separation among mothers with histories of violence exposure*. Front Psychol, 2015. **6**: p. 690.
58. Tremblay, R.E. and B. Schaal, *Physically aggressive boys from age 6 to 12 years. Their biopsychosocial status at puberty*. Ann N Y Acad Sci, 1996. **794**: p. 192-207.
59. Rouquette, A., et al., *Cohort profile: the Quebec Longitudinal Study of Kindergarten Children (QLSKC)*. Int J Epidemiol, 2014. **43**(1): p. 23-33.
60. First, M.B., et al., *The development of the ICD-11 Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines for Mental and Behavioural Disorders*. World Psychiatry, 2015. **14**(1): p. 82-90.
61. Nemoda, Z., et al., *Controlling for cell composition of peripheral biological samples in candidate gene DNA methylation analyses*. , in *Danube Conference on Epigenetics*. 2016: Hungary.
62. Nemoda, Z., et al., *Should we be stressed about salivary DNA methylation measurements? Obtaining cell composition data in candidate gene methylation analyses*. in preparation.
63. Ormel, J., et al., *Neuroticism and common mental disorders: meaning and utility of a complex relationship*. Clin Psychol Rev, 2013. **33**(5): p. 686-97.
64. Cohen, S., T. Kamarck, and R. Mermelstein, *A global measure of perceived stress*. J Health Soc Behav, 1983. **24**(4): p. 385-96.
65. Gouin, J.P., et al., *High-frequency heart rate variability during worry predicts stress-related increases in sleep disturbances*. Sleep Med, 2015. **16**(5): p. 659-64.
66. de Estrela, M.A., et al., *Daily Parenting Stress and Mood Reactivity: The Role of Sleep Quality* in preparation.
67. Gouin, J.-P., et al., *Respiratory Sinus Arrhythmia Reactivity Moderates Within-Person Associations of Daily Capitalization with Positive Affect and Relationship Quality*. Submitted 2017.
68. Nolen-Hoeksema, S., J. Larson, and C. Grayson, *Explaining the gender difference in depressive symptoms*. J Pers Soc Psychol, 1999. **77**(5): p. 1061-72.
69. Almeida, D.M., E. Wethington, and R.C. Kessler, *The daily inventory of stressful events: an interview-based approach for measuring daily stressors*. Assessment, 2002. **9**(1): p. 41-55.
70. Watson, D., L.A. Clark, and A. Tellegen, *Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales*. J Pers Soc Psychol, 1988. **54**(6): p. 1063-70.
71. Beliveau, V., et al., *Functional connectivity of the dorsal and median raphe nuclei at rest*. Neuroimage, 2015. **116**: p. 187-195.
72. Canli, T., et al., *Amygdala reactivity to emotional faces predicts improvement in major depression*. Neuroreport, 2005. **16**(12): p. 1267-70.

73. Canli, T., et al., *Beyond affect: a role for genetic variation of the serotonin transporter in neural activation during a cognitive attention task*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12224-9.
74. Ekman, P. and W.V. Friesen, *Pictures of Facial Affect*. 1976, Consulting Psychologists Press: Palo Alto, CA.
75. Whitfield-Gabrieli, S. and A. Nieto-Castanon, *Conn: a functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks*. Brain Connect, 2012. **2**(3): p. 125-41.
76. Behzadi, Y., et al., *A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI*. Neuroimage, 2007. **37**(1): p. 90-101.
77. Fransson, P., *Spontaneous low-frequency BOLD signal fluctuations: an fMRI investigation of the resting-state default mode of brain function hypothesis*. Hum Brain Mapp, 2005. **26**(1): p. 15-29.
78. Greicius, M.D., et al., *Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 253-8.
79. Shaffer, J.P., *Multiple hypothesis testing*. . Annu Rev Psychol., 1995. **46**: p. 561-584.
80. Maldjian, J.A., P.J. Laurienti, and J.H. Burdette, *Precentral gyrus discrepancy in electronic versions of the Talairach atlas*. Neuroimage, 2004. **21**(1): p. 450-5.
81. Maldjian, J.A., et al., *An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fMRI data sets*. Neuroimage, 2003. **19**(3): p. 1233-9.
82. Beck, A.T., R.A. Steer, and M.G. Carbin, *Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation*. Clin. Psychol. Rev., 1988. **8**: p. 77-100.
83. Fiori, L.M. and G. Turecki, *Investigating epigenetic consequences of early-life adversity: some methodological considerations*. Eur J Psychotraumatol, 2016. **7**: p. 31593.
84. Levesque, M.L., et al., *Genome-wide DNA methylation variability in adolescent monozygotic twins followed since birth*. Epigenetics, 2014. **9**(10): p. 1410-21.

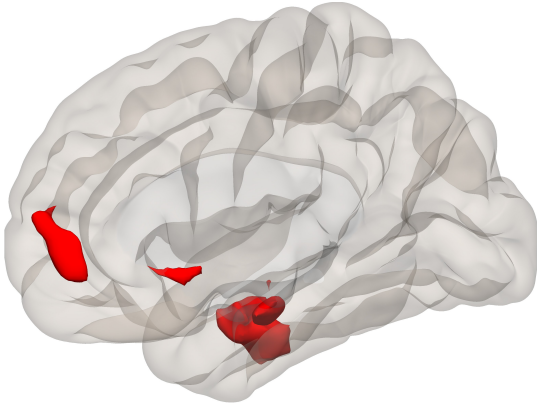
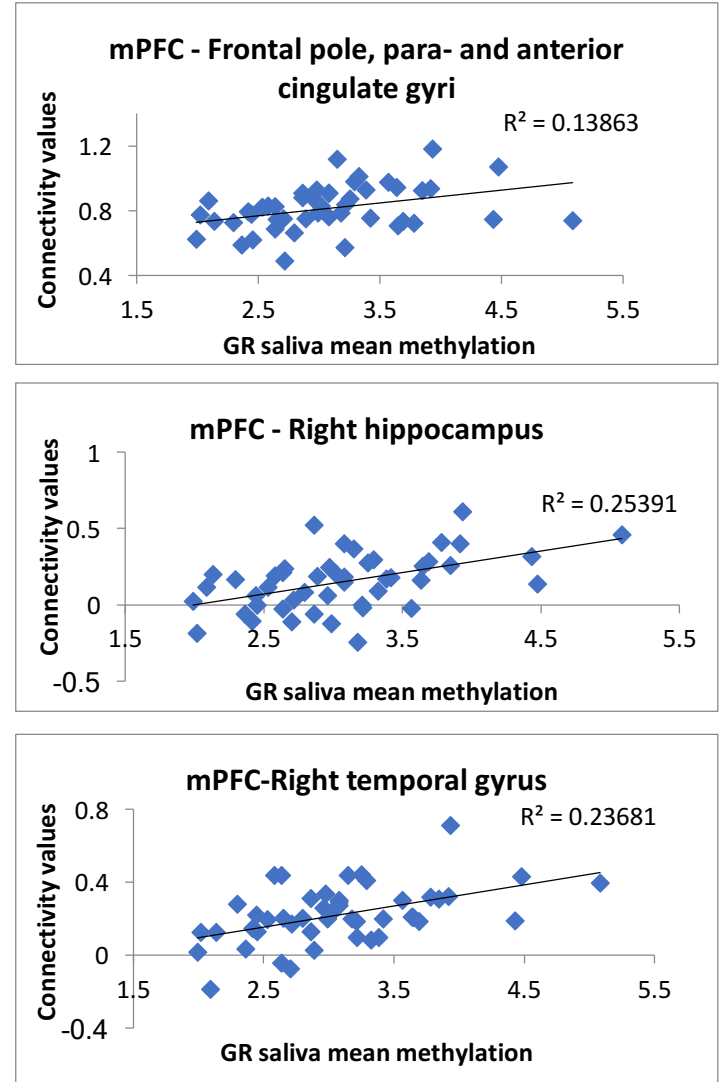
## Annexe

<b>Table 1.</b> Sample characteristics		
	1st wave (N = 16)	2nd wave (N = 51)
Characteristics of the sample	Mean (SD)	Mean (SD)
Sex (Female/Male)	0/16	24/27
fMRI scans	-	44
Age	34 (1.3)	36 (1.2)
Collected samples	Saliva (S) Buccal cells (BC) Whole blood (WB)	Saliva (S) Buccal cells (BC)
NR3C1 mean methylation		
CpGs 30, 31, 35-38	WB: 2.55 (.35) S: 3.04 (.40) BC: 2.57 (.49)	WB: - S: 3.11 (.81) BC: 3.30 (.97)
CpGs 30-31	WB: 2.14 (.96) S: 2.98 (.66) BC: 2.27 (1.18)	WB: - S: 3.21 (1.50) BC: 3.50 (1.63)
CpGs 35-38	WB: 2.75 (.39) S: 3.12 (.45) BC: 2.73 (.41)	WB: - S: 3.07 (.68) BC: 3.20 (.93)
FKBP5 mean methylation (CpGs 6-7)	WB: 60.36 (5.14) S: 40.21 (8.94) BC: 28.88 (7.33)	S: 45.12 (8.06) BC: 31.29 (9.81)
Daily Life Stress questionnaire scores		
Positive Affect (/16)	-	7.8 (2.3)
Negative Affect (/16)	-	2.3 (1.6)
Severity of Stress Exposure (/28)	-	2.1 (1.6)
Chronic Distress/Psychological Demand (/12)	-	4.2 (2.1)
Rumination (/24)	-	2.9 (2.9)
Beck Depression Inventory (/63)	5.3 (5.5)	4.7 (4.6)
Perceived Stress Scale (/56)	-	21.5 (7.1)
Eysenck Neuroticism scale (/12)	-	2.9 (2.8)
SD = standard deviation; CpG = cytosine-phosphate-guanine; NR3C1 = glucocorticoid receptor gene; FKBP5 = FK506 Binding Protein 5 gene; S = saliva; BC = buccal cells; WB = whole blood		

**Table 2.** Significant results of fMRI regression analysis

Contrast: Sad – neutral image	Region	k	Voxel t	Voxel p- value	MNI peak coordinates		
					x	y	z
FKBP5 buccal cell methylation mean	Right middle frontal cortex	49	5.08	<.001	22	35	39
	Left middle frontal cortex	38	4.18	<.001	-24	32	35
	Left parahippocampal gyrus	18	4.52	<.001	-27	-11	-18
FKBP5 buccal cell methylation CpG 6	Right middle frontal cortex	40	5.00	<.001	22	35	39
	Left middle frontal cortex	33	4.12	<.001	-24	28	39
	Right parahippocampal gyrus	12	3.93	<.001	26	-7	-11
	Left parahippocampal gyrus	20	4.69	<.001	-31	-14	-18
FKBP5 buccal cell methylation CpG 7	Right middle frontal cortex	49	4.84	<.001	22	35	39
	Left middle frontal cortex	38	4.16	<.001	-20	28	42
	Left parahippocampal gyrus	11	4.23	<.001	-27	-11	-18

MNI: Montreal Neurological Institute

**A****B**

**Figure 3.** Positive correlations between medial prefrontal cortex (mPFC) and fronto-limbic regions seed-to-voxel resting-state connectivity and saliva-derived NR3C1 mean methylation (CpGs 35-38).

Seed-to-voxel connectivity 3D map presented using CONN toolbox. **(A)** The red clusters depict the mPFC positively coupled with the bilateral frontal poles, bilateral paracingulate gyri, anterior cingulate gyrus, right hippocampus and right temporal gyrus. **(B)** Scatter-plots for visual inspection illustrate the results from extracted mean connectivity values of these clusters.

**Table 3. DNA methylation cross-tissue correlations**

		1 <sup>st</sup> wave (N=16)					2 <sup>nd</sup> wave (N=51)		
		Methylation Mean (SD)			Correlations		Methylation Mean (SD)		Correlations
	CpG site	WB	S	BC	WB & S	WB & BC	S	BC	S & BC
NR3C1	30	2.43 (.73)	3.59 (1.02)	2.83 (1.05)	$r = -.13$ ( $p = .66$ )	$r = -.118$ ( $p = .68$ )	3.28 (1.27)	3.73 (1.79)	$r = .007$ ( $p = .96$ )
	31	1.83 (1.48)	2.36 (.58)	1.71 (2.05)	$r = .23$ ( $p = .43$ )	$r = .34$ ( $p = .22$ )	3.13 (2.22)	3.29 (2.03)	$r = .20$ ( $p = .18$ )
	Mean 30-31	2.14 (.96)	2.98 (.66)	2.27 (1.18)	$r = -.027$ ( $p = .93$ )	$r = .36$ ( $p = .19$ )	3.21 (1.50)	3.50 (1.63)	$r = .20$ ( $p = .17$ )
	35	1.01 (.93)	2.20 (1.27)	1.01 (1.04)	$r = -.11$ ( $p = .69$ )	$r = -.33$ ( $p = .21$ )	1.38 (1.60)	1.77 (1.90)	$r = -.32$ ( $p = .02$ )
	36	1.97 (.51)	2.39 (.62)	1.91 (.63)	$r = -.02$ ( $p = .95$ )	$r = .14$ ( $p = .61$ )	2.85 (1.15)	2.56 (1.31)	$r = -.05$ ( $p = .72$ )
	37	2.72 (.69)	2.77 (.63)	2.87 (.76)	$r = .09$ ( $p = .75$ )	$r = .13$ ( $p = .62$ )	3.20 (1.02)	3.49 (1.16)	$r = -.02$ ( $p = .92$ )
	38	5.31 (.78)	5.14 (.50)	5.11 (.50)	$r = -.46$ ( $p = .08$ )	$r = -.34$ ( $p = .20$ )	4.85 (.91)	4.96 (1.22)	$r = .10$ ( $p = .50$ )
	Mean 35-38	2.75 (.39)	3.12 (.45)	2.73 (.41)	$r = .06$ ( $p = .84$ )	$r = -.11$ ( $p = .72$ )	3.07 (.68)	3.20 (.93)	$r = -.02$ ( $p = .91$ )
	Mean 30-38	2.55 (.35)	3.04 (.40)	2.57 (.49)	$r = -.31$ ( $p = .28$ )	$r = .06$ ( $p = .84$ )	3.11 (.81)	3.30 (.97)	$r = .11$ ( $p = .45$ )
FKBP5	6	60.68 (4.44)	39.09 (9.24)	25.68 (8.12)	$r = .38$ ( $p = .15$ )	$r = .30$ ( $p = .25$ )	43.59 (8.67)	28.54 (9.60)	$r = .66$ ( $p < .0001$ )
	7	60.05 (6.51)	41.32 (8.84)	32.08 (6.98)	$r = .30$ ( $p = .26$ )	$r = -.004$ ( $p = .99$ )	46.65 (8.13)	34.03 (10.43)	$r = .71$ ( $p < .0001$ )
	Mean 6-7	60.36 (5.14)	40.21 (8.94)	28.88 (7.33)	$r = .33$ ( $p = .21$ )	$r = .15$ ( $p = .59$ )	45.12 (8.06)	31.29 (9.81)	$r = .71$ ( $p < .0001$ )

CpG site: cytosine-phosphate-guanine binding site ; SD: standard deviation; WB: whole blood ; S: saliva ; BC: buccal cells