

Université de Montréal

**Impact des polymorphismes 5-HTTLPR et rs4675690 sur  
les corrélats neuronaux de la tristesse chez les enfants**

par

Émilie Fortier

Département de Psychologie

Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en Psychologie – Recherche et Intervention  
option Neuropsychologie clinique

Mai, 2011

© Émilie Fortier, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Impact des polymorphismes 5-HTTLPR et rs4675690 sur les corrélats neuronaux de la  
tristesse chez les enfants

Présentée par :  
Émilie Fortier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....  
Hugo, Théorêt, Président-rapporteur

.....  
Mario Beaugard, Directeur de recherche

.....  
Frédéric Gosselin, Membre du jury

.....  
Christian Joyal, Examineur externe

.....  
Sabin Lessard, Représentant du doyen de la FES

## Résumé

---

Les avancées technologiques rendent maintenant possible d'étudier l'impact de gènes spécifiques sur les corrélats cérébraux des psychopathologies. En rapport avec ce nouveau champ de recherche, la présente thèse décrit l'impact du 5-HTTLPR et du rs4675690 – deux polymorphismes semblant jouer un rôle dans le trouble dépressif majeur - sur les corrélats neuronaux de l'expérience subjective de la tristesse chez les enfants.

Après une mise en contexte (Chapitre 1), les deux études incluses dans cette thèse seront décrites (Chapitre 2 et 3). Ces études d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle visaient à comparer les patrons d'activation – durant un état temporaire de tristesse - chez des enfants de 8 ans porteurs d'allèles différents. La tristesse était induite grâce au visionnement passif d'extraits d'un film triste. Les résultats suggèrent que les deux polymorphismes ont un impact sur les activations cérébrales associées à la tristesse. Spécifiquement, les enfants porteurs des allèles associés à un plus grand risque de développer un trouble dépressif majeur, soit les porteurs de l'allèle court du 5-HTTLPR et les individus homozygotes pour l'allèle T du rs4675690, ont présenté des activations cérébrales altérées dans des régions qui sont impliquées dans la tristesse normale et pathologique. Le Chapitre 4 présente la mise en perspective des résultats dans le cadre de la littérature actuelle.

**Mots-clés :** Dépression, génétique, imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, enfants, 5-HT, CREB

## Abstract

---

Recent technological advances allow us to study the impact of genes on the specific cerebral correlates of psychopathologies. In accordance with this new specific area of research, the present thesis describes the impact of the 5-HTTLPR and the rs4675690 - two polymorphisms who seem to play a role in major depressive disorder - on the neural correlates of the subjective experience of sadness in children.

Following a review of the literature (Chapter 1), the two studies included in this thesis will be described (Chapter 2 and 3). These functional magnetic resonance imaging studies aimed to compare the activation pattern – during a transient state of sadness - in children of 8 years old carriers of different alleles. Sadness was induced by the passive viewing of sad film extracts. The results suggest that both polymorphisms have an impact on the cerebral activation associated with sadness. Specifically, children who were carriers of the allele associated with greater risk to develop major depressive disorder - carriers of the short allele of the 5-HTTLPR and homozygote for the T allele of the rs4675690) - showed altered cerebral activations in regions known to be implicated in normal and pathological sadness. Chapter 4 present an integration of the result to the current literature.

**Keywords** : Depression, genetic, functional magnetic resonance imaging, children, 5-HT, CREB

## Table des matières

---

Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Chapitre 1 – Introduction	7
Chapitre 2 - Article 1	31
<b>Early impact of 5-HTTLPR on the neural correlates of sadness</b>	
Émilie Fortier, Anne Noreau, Franco Lepore, Michel Boivin, Daniel Pérusse, Guy A. Rouleau & Mario Beauregard	
<i>Neuroscience Letters, 485 (2010) 261-265</i>	
Chapitre 3 – Article 2	53
<b>Early influence of the rs4675690 on the neural substrates of sadness</b>	
Émilie Fortier, Anne Noreau, Franco Lepore, Michel Boivin, Daniel Pérusse, Guy A. Rouleau & Mario Beauregard	
<i>En préparation pour Journal of Affective disorders</i>	
Chapitre 4 – Discussion Générale	83
Conclusion	93
Bibliographie	94

## Liste des tableaux

---

### Chapitre 2

*Article 1 – Early impact of 5-HTTLPR on the neural correlates of sadness*

Tableau 1 : fMRI results	51
--------------------------	----

### Chapitre 3

*Article 2 – Early influence of the rs4675690 on the neural substrates of sadness*

Tableau 1 : Demographic characteristics	78
---	----

Tableau 2 : Significant loci of activation during sadness (Sad minus Neutral contrast)	80
--	----

Tableau 3 : Between-group comparison (Sad minus Neutral contrast)	81
---	----

## Liste des figures

---

### Chapitre 2

*Article 1 – Early impact of 5-HTTLPR on the neural correlates of sadness*

Figure 1 : Activation for S group > L group 52

### Chapitre 3

*Article 2 – Early influence of the rs4675690 on the neural substrates of sadness*

Figure 1 : Mean levels of reported sadness 79

Figure 2 : Comparison between groups (Sad minus Neutral contrast) 82

## Remerciements

---

À **Mario Beauregard**, mon directeur de thèse sans qui ce projet n'aurait pas été possible. Merci pour sa persévérance, sa compréhension, son réalisme, son efficacité, sa présence et son support constant à travers les années.

À **Anne Noreau, Franco Lepore, Michel Boivin, Daniel Pérusse, Guy Rouleau**. Merci pour votre apport dans ce projet et votre soutien dans la publication des articles.

À **Stéphanie Sylvain-Roy**, pour son soutien moral, son écoute et son art, ainsi qu'à mes collègues Jacinthe Lacombe, Karine Ferron, Eva-Maria Hahler, Karen Debas. Merci pour tout le support que vous m'avez offert.

À **Véronique Taylor**. Merci pour son aide inestimable pour l'utilisation des logiciels d'analyses.

À **Marie-Claire Audet-Gagnon**. Merci d'être là pour me rappeler d'avoir un équilibre de vie et d'assurer mon divertissement.

À **Jean-Nicolas Choquette**. Merci pour son support inconditionnel et sa patience sans limites.

Finalement, à mes parents, **Murielle Laplante** et **Normand Fortier**, qui ont su m'apporter tout le support dont j'avais besoin à chacun leur manière. Merci pour votre soutien, si différent qu'il soit, mais tellement complémentaire. Merci de m'avoir donné le meilleur de vous-même.



# Chapitre 1

## Introduction

1. Position du problème
2. Fondements théoriques et neurobiologiques de la tristesse
  - 2.a. Le processus émotionnel
  - 2.b. La tristesse
  - 2.c. Induction expérimentale de la tristesse
  - 2.d. Le trouble dépressif majeur
  - 2.e. Régions cérébrales impliquées dans la tristesse
3. L'imagerie génétique
4. Description des gènes candidats
5. Objectifs de recherche et hypothèses spécifiques

## 1. Position du problème

Le trouble dépressif majeur (TDM) est une des maladies les plus fréquentes avec une prévalence de 10% dans la population générale (Ustun et al., 1995). Chez l'enfant et l'adolescent, un trouble de l'humeur a un impact négatif sur la croissance, le développement, les performances scolaires et les relations sociales (Bhatia & Bhatia, 2007). La tristesse étant l'émotion principalement affectée dans le trouble dépressif (APA, 1994), l'étude des corrélats neuronaux associés à cette émotion est primordiale dans la compréhension du TDM.

En vertu des avancements en biologie moléculaire, certains polymorphismes génétiques ont été reliés aux troubles de l'humeur tels que le TDM et aux troubles anxieux. Certaines variations de ces polymorphismes auraient un impact sur les activations cérébrales chez les adultes lors de tâches impliquant les émotions.

Dans ce contexte, cette thèse vise à déterminer si les différents patrons d'activations cérébrales observés chez l'adulte en association à deux polymorphismes, soit le 5-HTTLPR et le rs4675690 (un polymorphisme situé près du gène *CREB1* codant pour le *cAMP response element binding protein* [CREB]), sont présents à l'enfance. L'objectif général de la présente thèse est d'évaluer si des patrons d'activations atypiques durant un état de tristesse sont présents avant le développement du TDM. La présence de tels patrons pourrait indiquer que ces polymorphismes sont des facteurs de susceptibilité au TDM.

## **2. Fondement théoriques et neurobiologiques de la tristesse**

### **2.a. Le processus émotionnel**

Une activation physiologique, une évaluation cognitive (consciente ou inconsciente), une expérience subjective, une expression de l'état affectif (p. ex. modification physiologique) et un comportement dirigé vers un but représentent les composantes majeures d'une émotion (Plutchik, 1984). Classiquement, deux grandes théories ont influencé notre compréhension des émotions, soit la théorie de James et Lange ainsi que la théorie de Cannon et Bard.

Dans la théorie de James et Lange (James, 1981), des modifications physiologiques (tel que dans les viscères), suivant la perception d'un déclencheur, provoquent une émotion. Les changements corporels constituent l'émotion. Donc, « On est triste parce que l'on pleure plutôt que l'on pleure parce que l'on est triste ». Les objections principales à cette théorie s'appuient sur le manque de spécificité des modifications physiologiques. En effet, des modifications similaires (par exemple, transpiration, rythme cardiaque) peuvent être associées à plusieurs émotions différentes (par exemple, la peur et la colère).

Selon la théorie de Cannon et Bard (Cannon, 1927), l'expérience émotionnelle subjective survient simultanément aux réponses physiologiques. Cette théorie stipule que la perception d'un stimulus génère un état affectif et des modifications physiologiques (expression de l'émotion), mais que les changements physiologiques des viscères ne sont pas assez précis

pour fournir l'information complexe qui permettrait les distinctions fines de l'expérience émotionnelle. Certaines critiques sont survenues suite à cette théorie. Principalement, certaines émotions auraient une réponse autonome distincte, par exemple la peur et la colère.

Selon la théorie différentielle des émotions (*differential emotion theory* [DET]), le moi et la vie mentale se basent sur l'établissement de schémas affectifs/cognitifs stables et établis tôt dans le développement. Pour la DET, le développement émotionnel réfère au processus par lequel le système émotionnel atteint une complexité grandissante de liens fonctionnels avec les autres sous-systèmes de l'individu (physiologique, perceptuel, cognitif et le système des actions) (Izard, 1994). Les émotions primaires seraient constituées de trois composantes distinctes; la neuroévaluative, l'expressive et l'expérientielle. La DET stipule que ces trois composantes auraient une base biologique et fonctionnelle établie pratiquement à partir de la naissance (Izard, 1992). Donc, les corrélats neuronaux sous-jacents aux émotions primaires devraient être stables entre l'enfance et la vie adulte (Levesque et al., 2003). Selon le DET, l'expérience émotionnelle résulte directement de la composante neuroévaluative (Izard, 1992).

Les théories des émotions actuelles considèrent que l'expérience subjective d'une émotion est un processus conscient (Lane, 2000) pour lequel une valeur émotionnelle est associée à une situation marquante particulière (Cote et al., 2007). Suite à la présentation d'un

stimulus émotionnel, l'évaluation et l'identification de la valeur émotionnelle de ce stimulus se produisent de façon consciente ou inconsciente (Lazarus, 1991). Les régions associatives hétéromodales du cerveau qui intègrent les différents signaux provenant des modalités sensorielles ont un effet médiateur sur le processus émotionnel. L'évaluation d'une situation chargée émotionnellement implique l'interprétation de stimuli externes (visuels, auditifs, somatosensoriels, etc.) et de sensations internes (changements dans les viscères) causés par la situation marquante. Les inputs provenant de ces stimuli et sensations convergent dans le cortex préfrontal (PFC) (M. N. Mesulam, 2000), où une signification est accordée à la situation marquante. Par la suite, l'expérience subjective de l'émotion survient (Damasio et al., 2000; R. Lane, 2000).

Il existe une grande variabilité interindividuelle dans l'expérience émotionnelle. Davidson et collègues (Davidson, 1998, 2000) ont suggéré le terme « style affectif » afin de décrire ces différences dans les réponses émotionnelles. Ils ont décrit le style affectif en caractéristiques spécifiques de la réactivité émotionnelle et de la réponse affective. Les paramètres spécifiques du style affectif peuvent être mesurés objectivement et incluent : a) le seuil de réponse b) l'ampleur de la réponse, c) le temps nécessaire à l'atteinte du sommet de la réponse, d) la fonction de rétablissement de la réponse et e) la durée de la réponse. Les trois derniers paramètres réfèrent aux différents aspects de la chronométrie affective. Davidson et coll. (Davidson, 1998, 2000) ont proposé que les variables de la chronométrie sont importantes dans la compréhension des différences individuelles qui rendent

vulnérables aux psychopathologies. Certains troubles de l'humeur et troubles anxieux pourraient être spécifiquement associés à un échec à éteindre assez rapidement la réponse émotionnelle ou à un début de réponse anormalement tôt qui résulte en contournement des contraintes régulatrices normales. Les paramètres spécifiques décrits gouvernent un processus complexe qui, en parallèle avec les dispositions de l'humeur et les autres caractéristiques de l'individu, reflètent le style affectif.

### **2.b. La tristesse**

La tristesse peut être définie en terme de caractéristiques qui ont été décrites par Power et Dalglish (Power & Dalglish, 2008);

1. Il y a l'évaluation d'une perte ou d'un échec dans lequel l'objet ou l'objectif perdu varie en importance et en type; il peut s'agir d'une personne, d'un lieu, d'une ambition qui n'a pas été atteinte ou d'un objet ayant une valeur personnelle. Il peut aussi s'agir de la perte d'un idéal ou d'une valeur morale. La focalisation de la tristesse est donc l'évaluation de la perte d'un ou de plusieurs objets/objectifs dans un ou plusieurs domaines.
2. La perte n'est pas nécessairement permanente, elle peut être une séparation temporaire d'un être, d'un objet ou d'un endroit aimé.
3. La perte peut être celle que subit une autre personne significative pour soi (par exemple, lorsque son propre enfant échoue à un examen, est malade ou blessé). La

perte peut être commune plutôt que personnelle, comme la perte d'un chef d'État, d'une vedette ou l'échec de l'équipe nationale de football à la coupe du monde.

4. La fenêtre temporelle de la perte peut varier (i.e., passé, présent ou futur). Quelqu'un peut se remémorer un évènement et se sentir triste à propos de la perte de l'enfance ou des jours d'école, tout comme quelqu'un peut se sentir triste par rapport à une perte actuelle. De plus, la perte peut être imaginaire, ne pas encore s'être produite (par exemple, imaginer la future perte d'un parent) ou se produire seulement dans un rêve. De façon générale, la tristesse est rétrospective comparativement à l'anxiété qui est généralement dirigée vers le futur (prospective).
5. L'expérience phénoménologique de la tristesse diffère considérablement en intensité et en durée. La tristesse peut être légère et durer quelques secondes, (par exemple, lors de la mention d'un nom avec une valence émotionnelle triste dans une conversation) ou elle peut durer plusieurs minutes (par exemple, lorsqu'un héros décède à la fin d'un roman) ou même des heures (par exemple, lors du bris d'un objet décoratif préféré). Elle peut aussi durer toute la vie comme dans le cas de la perte d'un parent ou d'un enfant. L'intensité de la tristesse peut être signalée avec des larmes ou des pleurs (Rottenberg, Gross, Wilhelm, Najmi, & Gotlib, 2002).

La tristesse est une émotion primaire (Plutchik, 1994) qui se produit dans la population normale. Elle peut aussi être distinguée des douleurs associées au deuil (Ekman, 1994).

La tristesse a une fonction sociale étant donné qu'elle permet à l'individu d'émettre des demandes émotionnelles aux autres et donc de renforcer les liens sociaux. Elle mène à l'altruisme par lequel les autres ressentent de la sympathie ou de la pitié (Izard, 1993). La tristesse a aussi une fonction individuelle, car elle permet à l'individu de focaliser sur lui-même pour réévaluer ses priorités et réévaluer les buts et rôles importants en lumière de l'expérience d'une perte ou de la possibilité d'une perte (Power & Dalgleish, 2008).

### **2.c. Induction expérimentale de la tristesse**

Un paradigme d'activation émotionnelle a pour but de produire une altération temporaire de l'humeur en exposant le sujet à un inducteur émotionnel (par exemple, le visionnement d'un extrait de film chargé émotionnellement). L'induction émotionnelle peut aussi se faire en demandant au sujet de se rappeler un événement de vie stocké en mémoire épisodique et relié à l'émotion étudiée (Beauregard et al., 1998).

Les méthodes d'induction auraient un impact sur les différentes régions cérébrales activées. En effet, une induction externe (par exemple, le visionnement d'un extrait de film) et interne (par exemple, le rappel d'un souvenir à valence émotive) d'une même émotion génère des activations cérébrales différentes (Ketter et al., 1993; Reiman et al., 1993). Par contre, une méthode d'induction interne comme le rappel d'un événement personnel à caractère émotionnel, une tâche de reconnaissance ou d'évaluation de l'intensité de l'émotion impliquerait non seulement le système émotionnel, mais ajouterait une



composante cognitive. Le visionnement passif d'un stimulus émotionnel entraînerait une moins grande demande cognitive (Phan, Wager, Taylor, & Liberzon, 2002).

L'induction émotionnelle par le rappel génère fréquemment plus d'une émotion (George et al., 1995). En ce sens, le visionnement passif d'un extrait de film valide représente une méthode plus fiable pour l'induction d'une émotion spécifique.

#### **2.d. Le trouble dépressif majeur**

Selon le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM-IV-TR), le diagnostic d'un épisode dépressif majeur nécessite la présence de cinq symptômes parmi une liste de neuf pour une période d'au moins deux semaines (voir ci-dessous). L'un de ces symptômes doit être une humeur dépressive ou une perte d'intérêt et/ou de plaisir. L'humeur dépressive est décrite comme un sentiment de tristesse ou de vide qui dure toute la journée et qui est vécu à tous les jours.

Le diagnostic de TDM nécessite la présence d'un épisode dépressif majeur qui n'est pas mieux expliqué par un trouble schizo-affectif et n'est pas surajouté à une schizophrénie, un trouble schizophréniforme, un trouble délirant ou un trouble psychotique non-spécifié. De plus, il doit n'y avoir jamais eu d'épisode maniaque, d'épisode mixte ou d'épisode hypomaniaque. Afin de diagnostiquer un TDM récurrent, il doit y avoir la présence d'au moins deux épisodes dépressifs majeurs (DSM-IV-TR).

Les études de neuroimagerie, de pathophysiologies et d'analyse de lésions ont démontré que les circuits impliqués dans la modulation des aspects normaux du comportement émotionnel sont aussi impliqués dans la pathophysiologie des troubles de l'humeur. Ces circuits neuronaux impliquent le cortex préfrontal médian (MPFC), l'amygdale, l'hippocampe et les régions ventro-médiales des noyaux gris centraux (putamen et noyau caudé). Des anomalies dans l'activité neurophysiologique et dans le volume de matière grise ont été observées dans ces régions chez des individus souffrant d'épisodes dépressifs récurrents (Drevets, Price, & Furey, 2008).

Une méta-analyse des études de la connectivité fonctionnelle dans le TDM a mené à l'élaboration d'un modèle (Seminowicz et al., 2004). Ce modèle s'appuie sur des anomalies de connectivité dans l'hippocampe, le MPFC, le cortex orbitofrontal, le cortex cingulaire rostroantérieur (rACC), le cortex cingulaire antérieur subgénéral (sACC), le thalamus antérieur droit et le cortex préfrontal latéral gauche. Cependant, ces anomalies ne peuvent pas être interprétées comme facteurs causaux étant donné que les sujets dans les études répertoriées étaient adultes, qu'ils étaient malades depuis plusieurs années et qu'ils présentaient une prise prolongée d'antidépresseurs (Seminowicz, et al., 2004).

### **2.e. Régions cérébrales impliquées dans la tristesse**

Cette section vise à décrire les régions cérébrales qui ont été associées à la tristesse (ainsi qu'au TDM). Les deux études contenues dans cette thèse utilisent les régions décrites ici

comme régions d'intérêt pour l'investigation des patrons d'activations cérébrales durant un état temporaire de tristesse.

*Cortex préfrontal médian.* Une activation du MPFC a été démontrée dans plusieurs études de neuroimagerie chez des adultes normaux en association avec la tristesse (Beauregard, et al., 1998; Damasio, et al., 2000; George, Ketter, Parekh, Herscovitch, & Post, 1996; George, et al., 1995; R. D. Lane, Reiman, Ahern, Schwartz, & Davidson, 1997a; Reiman et al., 1997). Lévesque et collègues (Levesque, et al., 2003) ont aussi démontré une activation du MPFC chez des fillettes lors d'une tâche passive d'induction externe de tristesse. Beauregard et collègues (Beauregard, et al., 1998) ont démontré une plus grande activation du MPFC chez des sujets dépressifs adultes que chez des sujets normaux lors du visionnement passif d'un extrait de film triste.

Cette région du cortex préfrontal a aussi été associée à d'autres émotions positives (par exemple, la joie) et négatives (par exemple, le dégoût) (George, et al., 1996; Lane, et al., 1997a; Reiman, et al., 1997; Teasdale et al., 1999). Les études chez les primates démontrent des connexions réciproques entre le MPFC et des régions associatives de haut niveau, dont le gyrus cingulaire (Pandya, Van Hoesen, & Mesulam, 1981). Le MPFC est le centre de convergence des inputs limbiques et il participerait à l'intégration de l'émotion avec la cognition (Mesulam, 1985). Supportant l'hypothèse du rôle du MPFC dans la métacognition, Lane et collègues (Lane et al., 1997b) ont trouvé une activation du MPFC

lorsque les sujets devaient porter attention à leur état émotionnel interne, mais pas lorsqu'ils devaient porter attention aux caractéristiques non-affectives d'une photo. Les études d'atteintes sélectives du MPFC suggèrent son implication dans le monitoring conscient de l'état affectif de l'individu (Damasio, et al., 2000). Le MPFC serait donc impliqué dans les aspects cognitifs du processus émotionnel (Drevets & Raichle, 1998).

*Cortex cingulaire antérieur (ACC).* La division dite « affective » de l'ACC a été associée au fonctionnement émotionnel de façon consistante. Cette région de l'ACC, qui est composée du ACC subgenual (BA25, 32) et du ACC pregenual ou rostral (BA24) (Devinsky, Morrell, & Vogt, 1995), possède des connexions étendues avec l'amygdale (Devinsky, et al., 1995; Paus, Koski, Caramanos, & Westbury, 1998).

George et collègues (George, et al., 1995) ont rapporté une activation bilatérale de l'ACC pregenual chez des femmes lors d'une induction interne de tristesse par le rappel. Beauregard et collègues (Beauregard, et al., 1998) ont démontré une augmentation de l'activation du MPFC et de l'ACC subgenual chez des sujets dépressifs par opposition à des sujets normaux. Ils ont suggéré que ces résultats pourraient indiquer la présence d'un fonctionnement anormal de l'activité frontale. Plus précisément, chez les individus dépressifs, les structures limbiques seraient relativement déconnectées des influences préfrontales inhibitrices, résultant en une modulation affective altérée.

Chez le singe, l'ACC serait une région critique dans l'attribution de la signification émotionnelle aux stimuli sensoriels (Gabriel, Orona, Foster, & Lambert, 1982). Tout comme pour le MPFC, il a été postulé que l'ACC subgénéral participe à l'expérience consciente de l'émotion (Reiman, et al., 1997), à la régulation émotionnelle (Reiman, et al., 1997) et qu'il est impliqué dans le circuit neuronal sous-jacent à la pathophysiologie de la dépression unipolaire (Drevets et al., 1992).

*Pôle temporal antérieur (PTA).* Une activation bilatérale du PTA a été observée en association à la tristesse chez les adultes (Damasio, et al., 2000) et chez les adolescentes (Levesque, et al., 2003).

Une activation du PTA a aussi été démontrée chez des adultes normaux pendant de l'anxiété anticipatoire normale (Chua, Krams, Toni, Passingham, & Dolan, 1999; Reiman, Fusselman, Fox, & Raichle, 1989), de la colère et de l'anxiété (Damasio, et al., 2000; Dougherty et al., 1999). Cette région paralimbique reçoit des projections des régions sensorielles unimodales et hétéromodales, ainsi que des régions limbiques. Le PTA serait associé à l'attribution de la valeur émotionnelle à l'expérience subjective de l'individu (Mesulam, 1985). Le PTA aurait aussi un rôle dans l'examen du contenu émotionnel des visages (George et al., 1993).

*Insula.* La tristesse a été associée à une activation de l'insula, lors du rappel d'évènements autobiographiques (Damasio, et al., 2000; George, et al., 1995). Une telle activation a aussi été démontrée dans le cadre d'études de tomographie par émission de positrons (TEP) (Liotti et al., 2000; Mayberg et al., 1999). Eugène et collègues (Eugene et al., 2003) ont démontré une activation de l'insula associée au visionnement d'un extrait de film triste.

L'insula a aussi été impliquée dans l'expérience de la colère, de la peur et du bonheur (Damasio, et al., 2000). L'insula antérieure a été associée à l'anxiété anticipatoire normale (Reiman, et al., 1989) et à la phobie simple (Rauch et al., 1995). Ces résultats suggèrent une implication générale de l'insula dans les émotions.

*Amygdale.* Une augmentation de l'activité de l'amygdale a été associée à la tristesse (R. D. Lane, et al., 1997a). Dans une autre étude, le visionnement d'un extrait de film triste a induit une activation de l'amygdale chez des femmes et des fillettes (Levesque, et al., 2003). Par ailleurs, plusieurs études sur le TDM ont montré une hyperactivation de l'amygdale en réponse à des stimuli chargés émotionnellement (Najib, Lorberbaum, Kose, Bohning, & George, 2004).

Une augmentation de l'activation de l'amygdale a aussi été associée à la peur, à la joie et au dégoût (Beauregard, et al., 1998; Furmark, Fischer, Wik, Larsson, & Fredrikson, 1997;

Lane, et al., 1997a). Cette structure est donc impliquée dans les états émotionnels négatifs et positifs (Eugene, et al., 2003). L'amygdale aurait un rôle dans la reconnaissance et l'induction d'une émotion à partir d'un stimulus visuel (Reiman, et al., 1997; Whalen, 1998). Compte tenu de ses projections avec des régions corticales associées à pratiquement tous les niveaux du processus visuel dans le cortex occipital, l'amygdale est idéalement située pour moduler l'input visuel en fonction de la signification émotionnelle du stimulus. Selon Davis et Whalen (Davis & Whalen, 2001), l'amygdale jouerait un rôle clé dans la modulation de la vigilance et de l'attention pour l'information possédant une valence émotionnelle, et elle serait donc plutôt activée durant la phase d'induction de l'émotion (Buchel, Morris, Dolan, & Friston, 1998; Davidson & Irwin, 1999; Dolan et al., 1996; LaBar, Gatenby, Gore, LeDoux, & Phelps, 1998).

L'amygdale serait aussi impliquée dans la production de l'état émotionnel (Phillips, Drevets, Rauch, & Lane, 2003). À ce sujet, des lésions amygdalaires chez le singe résultent en une baisse des réponses autonomiques durant des situations provoquant de l'anxiété (Bagshaw, Kimble, & Probram, 1965)

*Noyaux gris centraux.* Lane et collègues (Lane, et al., 1997a) ont observé une activation du noyau caudé en association avec la tristesse. Une activation du noyau caudé a été observée chez des individus normaux et dépressifs lors de l'induction de tristesse par le visionnement passif d'un extrait de film (Beauregard, et al., 1998). Les individus dépressifs

montrent une activation anormalement élevée du noyau caudé en réponse à la présentation de visages tristes (Garrett & Maddock, 2001).

Le putamen serait impliqué dans le traitement des stimuli négatifs et des expressions faciales aversives (Phillips, et al., 2003). Une plus grande activation du putamen gauche a été observée chez des sujets dépressifs, comparativement à des sujets normaux, durant le visionnement de visages tristes (Surguladze et al., 2005).

*Cortex orbitofrontal latéral* (LOFC). Cette région du cortex préfrontal serait activée chez des adultes sains durant l'induction de tristesse (Beauregard, et al., 1998; Damasio, et al., 2000; George, et al., 1995). Cette aire corticale a aussi été associée à des pensées tristes et de la tristesse chez des sujets souffrant d'un TDM (Brody, Barsom, Bota, & Saxena, 2001). Il semble donc que cette région soit impliquée dans la tristesse normale et pathologique. Grâce à ses inputs sensoriels et limbiques, le LOFC pourrait jouer un rôle dans l'intégration de l'information viscerosensorielle avec l'information signalant des modifications dans l'état émotionnel du sujet.

### **3. L'imagerie génétique**

Un gène est une unité d'information héréditaire située sur les chromosomes et composé d'acide désoxyribonucléique (ADN). Un polymorphisme génétique constitue les formes possibles d'un gène (allèle) à un locus donné à l'intérieur d'une population. Les deux



études présentées dans cette thèse utilisent un protocole d'imagerie génétique, c'est-à-dire qu'elles examinent les différences au niveau des activations cérébrales selon les différentes formes alléliques d'un polymorphisme donné. Ces études reposent sur une approche d'association par gènes candidats. Dans cette approche, des polymorphismes - qui selon la littérature influenceraient le développement et le fonctionnement émotionnel - sont étudiés afin d'évaluer leur impact fonctionnel sur un endophénotype (i.e., une caractéristique biologique ou comportementale qui reflète un système biologique discret). Un endophénotype valide doit être associé à une pathologie à travers la population générale et être mesurable objectivement (Mitterschiffthaler, Ettinger, Mehta, Mataix-Cols, & Williams, 2006).

Les protocoles d'imagerie génétique offrent une nouvelle perspective pour l'étude des facteurs de vulnérabilité aux troubles mentaux. Étant donné que 70% du génome humain est exprimé dans le cerveau (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), il est probable que plusieurs polymorphismes influencent les processus neuronaux et sont impliqués dans la régulation des comportements affectifs (Viding, Williamson, & Hariri, 2006).

Les études de jumeaux ont révélé des facteurs d'héritabilité de 40 à 70% dans le tempérament, les traits de personnalité et divers comportements (Plomin, Owen, & McGuffin, 1994). Les gènes ne peuvent donc pas expliquer entièrement le comportement humain. Cependant, les variations dans la séquence génétique contribuent certainement à

une importante partie de la variance dans les phénomènes comportementaux complexes. Concernant les troubles psychiatriques, la génétique constitue le seul facteur de risque constant à travers les populations humaines et le facteur de susceptibilité le plus important (Moldin & Gottesman, 1997).

Les protocoles d'imagerie génétique utilisent des techniques d'imagerie cérébrale telles que l'IRMf ou la TEP. Ces techniques permettent d'éviter plusieurs problèmes qui caractérisent les méthodes classiques d'évaluation (évaluation clinique, questionnaire de personnalité et batterie neuropsychologique, test papier-crayon); la grande variabilité interindividuelle dans les comportements associés aux troubles mentaux et la subjectivité dans l'évaluation des comportements qui impliquent que des échantillons de centaines de participants doivent être utilisés (Glatt & Freimer, 2002). De plus, l'effet des gènes ne se situe pas directement au niveau du comportement. Plutôt, les gènes exercent une influence médiatrice sur le comportement par leur effet au niveau neurobiologique (Viding, et al., 2006). L'impact des polymorphismes apparaît plus robuste sur l'activation de régions cérébrales associées aux émotions que sur l'expérience émotionnelle subjective (Hariri & Weinberger, 2003). Les protocoles d'imagerie génétique permettent donc d'étudier la contribution des gènes aux corrélats neurobiologiques des émotions et de mieux comprendre leur impact dans la variabilité des comportements affectifs.

Hariri et Weinberger ont décrit trois principes de base de l'imagerie génétique (Hariri & Weinberger, 2003) :

1-Sélection d'un gène candidat : Idéalement, des études effectuées en parallèle doivent démontrer l'impact du polymorphisme sélectionné sur le comportement, l'affectivité ou la susceptibilité à une pathologie. Afin d'établir un paradigme de recherche pertinent, il est préférable que des études aient démontré les différents effets des allèles au niveau cellulaire, et que leur impact sur les régions cérébrales ait été décrit. Ainsi, les protocoles d'imagerie permettent d'étudier l'impact d'un gène sur le traitement de l'information dans des populations saines et pathologiques. Sans quoi, il faut non seulement être prudent dans le design expérimental, mais aussi dans l'interprétation des résultats.

2-Contrôle des facteurs non-génétiques : Même si l'effet d'un gène unique est plus grand au niveau du fonctionnement cérébral qu'au niveau des phénotypes comportementaux, son impact reste relativement limité. De plus, la variance phénotypique, les facteurs environnementaux (maladie, blessure, etc.), l'âge, le quotient intellectuel et le genre peuvent diminuer de façon importante l'effet potentiel d'un gène. Hariri et Weinberger suggèrent donc d'équilibrer les groupes étudiés en fonction des facteurs confondants.

3-Sélection de la tâche : Dû à l'effet restreint d'un gène unique, il est préférable de choisir un paradigme bien caractérisé dans la littérature qui a démontré une grande efficacité dans

l'activation de régions cérébrales circonscrites ou de circuits neuronaux, et qui produit un signal robuste chez tous les individus (avec une certaine variabilité interindividuelle).

#### **4. Description des gènes candidats**

Le polymorphisme situé dans le promoteur du gène codant pour le transporteur de la 5-HT (5-HTTLPR pour *serotonin-transporter-linked-polymorphic region*, SLC6A4) a eu une grande popularité dans les études d'imagerie génétique. Ce polymorphisme a fait l'objet de plus de 300 études examinant son rôle dans divers troubles psychiatriques et leurs phénotypes (Wendland, 2006). La fonction principale du transporteur de la sérotonine (5-HTT) est de retirer la sérotonine (5-HT) de la synapse et de la retourner dans le neurone présynaptique où elle peut être dégradée ou réutilisée (Karg, Burmeister, Shedden, & Sen, 2011). Il existe typiquement deux variations alléliques du 5-HTTLPR, soit la variation courte (allèle S) comprenant 14 copies de la répétition de 20-23 paires de bases, et la variation longue (allèle L) comprenant 16 copies (Heils et al., 1996; Lesch et al., 1996). Le polymorphisme affecte la vitesse de transcription du gène de façon à ce que l'allèle S ait une transcription du 5-HTT moins efficace que l'allèle L (Karg, et al., 2011). Des anomalies dans le système sérotoninergique ont été observées chez les individus souffrant de troubles de l'humeur et de trouble anxieux. Il est à noter que le traitement de ces pathologies implique une manipulation pharmacologique du système sérotoninergique (Ballenger, 1999; Blier & de Montigny, 1999). Il est important de noter que la présence d'anomalie génétique associées à des déficits du système sérotoninergique ne signifie pas

automatiquement qu'il y aura la présence de trouble de l'humeur. Le 5-HTTLPR est un polymorphisme candidat en tant que facteur génétique influençant la régulation des niveaux de 5-HT. Ce polymorphisme pourrait expliquer, du moins en partie, les différences interindividuelles de tempérament et de vulnérabilité aux troubles de l'humeur (von dem Hagen, Passamonti, Nutland, Sambrook, & Calder, 2011). À travers l'étude des corrélats neuronaux associés à une émotion problématique dans le TDM, le 5-HTTLPR constitue un polymorphisme de choix pour une étude d'imagerie génétique. Par ailleurs, d'autres polymorphisme génétique ont été associé au trouble de l'humeur, tel que le CREB1.

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc ou de l'anglais cAMP) agit en tant qu'intermédiaire dans l'action des hormones et des neurotransmetteurs. CREB (pour *cAMP response element binding protein*) est un facteur de transcription cellulaire qui agit directement sur l'ADN par sa fixation aux éléments de réponses nommés CRE (pour *cAMP response element*) induisant la transcription de certains gènes. Il est un élément de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant le cAMP (Albert, Johnson, Lewis, & Raff, 2004). Les études de clinicopathologie ont rapporté une altération de l'expression du CREB dans le cortex temporal de patients souffrant d'un TDM, dans l'hippocampe et le noyau accumbens dans les modèles animaux du TDM, et dans le cerveau de rongeurs exposés à un traitement chronique d'antidépresseur (Nestler et al., 2002; Rossby & Sulser, 1997).

Plusieurs groupes ont tenté d'étudier le potentiel du CREB1, le gène humain codant pour CREB, dans l'étiologie du TDM. Des polymorphismes qui causerait une altération de l'expression de gène CREB1 ou qui encoderait pour le CREB pourraient influencer le risque de développer un TDM (Zubenko et al., 2002). Le gène CREB1 est donc un autre bon candidat pour étudier l'étiologie et la pathologie du TDM. Notamment, le rs4675690 est un polymorphisme à un seul nucléotide (ou *single nucleotide polymorphism* [SNP]) situé au 5' de CREB, ayant un rôle dans les comportements suicidaires chez des patients TDM (Perlis, Purcell, Fava, et al., 2007). Le rs4675690 est aussi associé à l'expression de la colère (Perlis, Purcell, Fagerness, et al., 2007).

## **5. Objectifs de recherche et hypothèses spécifiques**

*Objectifs de recherche.* Le but général des deux études proposées est d'accroître la compréhension de l'étiologie et de la pathophysiologie du TDM en étudiant comment deux polymorphismes génétiques sont associés à l'activation des corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Globalement, ces études visent à déterminer si les variations génétiques causant une susceptibilité aux troubles de l'humeur sont associées à des patrons d'activation cérébraux différents chez les enfants, tel qu'il l'a été observé chez les adultes. Spécifiquement, le but de la première étude est d'observer si des différences significatives sont présentes au plan des activations cérébrales - lors de l'expérience subjective de la tristesse - entre des sujets porteurs de l'allèle S et des sujets homozygotes pour l'allèle L du 5-HTTLPR. La deuxième étude utilise le même protocole afin de déterminer si des patrons

d'activations cérébrales différents sont observables entre les sujets homozygotes pour chacun des deux allèles (C et T) du RS4675690 un gène codant situé près du CREB1.

*Hypothèses spécifiques.* Basées sur les connaissances des activations cérébrales associées aux différentes variations alléliques chez les adultes lors de protocoles utilisant des stimuli émotionnels, les hypothèses spécifiques suivantes sont proposées:

*Étude 1.* Les activations cérébrales des régions d'intérêts (ROIs) (cortex préfrontal médian, aires de Brodmann [AB] 9, 10, cortex cingulaire antérieur rostro-dorsal [AB 24,32], PTA [AB 21, 28], insula [BA 13, 14], cortex orbitofrontal latéral [BA 47], amygdale, noyau caudé et putamen) lors du visionnement passif d'un extrait de film triste seront plus grandes chez les porteurs de l'allèle S que pour les porteurs homozygotes de l'allèle L du gène 5-HTTLPR.

*Étude 2.* Les activations cérébrales des ROIs (cortex préfrontal médian, aires de Brodmann [AB] 9, 10, cortex cingulaire antérieur rostro-dorsal [AB 24,32], PTA [AB 21, 28], insula [BA 13, 14], cortex orbitofrontal latéral [BA 47], amygdale, noyau caudé et putamen) lors du visionnement passif d'un extrait de film triste seront plus grandes chez les porteurs homozygotes de l'allèle T que pour les porteurs homozygotes de l'allèle C pour le polymorphisme rs4675690.

## Chapitre 2

### Article 1

#### Early impact of 5-HTTLPR polymorphism on the neural correlates of sadness

Émilie Fortier, Anne Noreau, Franco Lepore, Michel Boivin, Daniel Pérusse,  
Guy A. Rouleau & Mario Beauregard

*Neuroscience Letters*, 485 (2010) 261-265



## **Contributions des auteurs**

Émilie Fortier: Élaboration de l'idée de recherche, préparation des données IRMf, analyses statistiques, rédaction de l'article

Anne Noreau: Génotypage et rédaction de la section génotypage

Franco Lepore: Mise en contact des co-auteurs

Michel Boivin: Gestionnaire de la base de données de la cohorte des jumeaux nouveaux-nés du Québec.

Daniel Pérusse: Créateur de la base de données de la cohorte des jumeaux nouveaux-nés du Québec, élaboration de l'idée de recherche

Guy A. Rouleau: Directeur de recherche de Anne Noreau, élaboration de l'idée de recherche

Mario Beauregard: Investigateur principal, élaboration de l'idée de recherche, correction du manuscrit.

### Early impact of 5-HTTLPR polymorphism on the neural correlates of sadness

Émilie Fortier<sup>a</sup>  
 Anne Noreau<sup>b</sup>  
 Franco Lepore<sup>a,c</sup>  
 Michel Boivin<sup>d,e</sup>  
 Daniel Pérusse<sup>a,f</sup>  
 Guy A. Rouleau<sup>b,c</sup>  
 Mario Beauregard<sup>a,g,h,i</sup>

<sup>a</sup>Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Département de Psychologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>b</sup>Centre d'excellence en Neuromique de l'Université de Montréal, Centre de recherche du CHUM and Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>c</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, Montreal, Canada

<sup>d</sup>École de Psychologie, Université Laval, Quebec City, Canada

<sup>e</sup>Groupe de recherche sur l'inadaptation psychosociale chez l'enfant (GRIP), Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>f</sup>Département d'Anthropologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>g</sup>Département de Radiologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>h</sup>Centre de Recherche en Sciences Neurologiques (CRSN), Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>i</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Canada

Correspondence: Dr Mario Beauregard, Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Département de Psychologie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

**Abstract**

Healthy adults carrying the short (S) allele of the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) show increased amygdala activation during visual processing of emotionally negative stimuli compared to healthy adults homozygous for the long (L) allele. To determine whether abnormal brain responses during negative emotion appear early in life in S allele carriers, functional magnetic resonance imaging (fMRI) was used to measure brain activity during a transient state of sadness in children carrying the S allele (S group) or homozygous for the L allele (L group). Blood-oxygen-level dependent (BOLD) signal changes were measured while subjects viewed blocks of neutral film excerpts and sad-film excerpts. During the sad condition (relative to the neutral condition), there was significantly greater activation in the S group compared to the L group in brain regions known to be involved in normal sadness and major depression. Given that the 5-HTTLPR polymorphism has been associated with mood disorders, it is plausible that the abnormal pattern of regional brain activity detected here, in children carrying the S allele in response to the sad stimuli, increases susceptibility to emotional dysregulation and depressive symptoms.

**Keywords:** 5-HTTLPR polymorphism, sadness, children, brain, fMRI

The serotonin (5-HT) transporter (5-HTT) plays a central role in 5-HT neurotransmission by determining the duration and intensity of the 5-HT communication with its pre- and postsynaptic receptors, and anomalies in emotional processing may be linked to 5-HTT dysfunction (Hariri & Holmes, 2006). The fact that drug-free patients with mood and anxiety disorders exhibit significant reductions in brain 5-HTT binding relative to healthy controls (Malison et al., 1998) is consistent with this view.

A relatively common genetic polymorphism in the human 5-HTT gene (*SLC6A4*) located in the transcriptional control region on chromosome 17q11.1-q12 was identified more than a decade ago (Heils et al., 1996). The 5-HTT gene linked polymorphic region (or 5-HTTLPR) is frequently defined by two variable nucleotide tandem repeat elements, a short (S) allele and a long (L) allele. In humans, having one or two copies of the short, 'S,' allelic variant of this polymorphism is associated with significantly lesser 5-HTT binding in brain (Heinz et al., 2000). Moreover, individuals with either one or two copies of the S allele have a higher probability of developing depressive symptoms as compared to those who are homozygous for the L allele (Lau et al., 2009; Schinka, Busch, & Robichaux-Keene, 2004).

In a seminal study (Hariri et al., 2005), functional magnetic resonance imaging (fMRI) was used to evaluate, in a small sample of healthy adult volunteers carrying the S or L allele, neural activation during perceptual processing of fearful and angry human facial expressions. This task consistently engages the amygdala, a brain region crucially involved

in emotional arousal and reactivity. During the task, S allele carriers showed nearly five-fold greater amygdala activity than L homozygotes. This finding was replicated in a larger cohort of healthy adults (Hariri et al., 2002). Along the same lines, healthy adult carriers of the S allele were found to exhibit more robust activation of the amygdala during the presentation of emotionally negative pictures (Heinz, et al., 2000). Additionally, another fMRI study carried out in healthy adults revealed a weaker functional connectivity between the anterior cingulate cortex (ACC) - a prefrontal area playing a pivotal role in various aspects of emotion - and the amygdala in S-allele carriers relative to L-allele homozygotes during presentation of angry and fearful faces (Pezawas et al., 2005).

Collectively, the findings of these neuroimaging studies indicate that relative loss of 5-HTT gene function negatively affects the brain systems mediating emotional processing. A dysfunction of these systems could provide a putative neural substrate for the emotional vulnerability associated with genetic variation in the 5-HTT (Hariri & Holmes, 2006).

In keeping with what has been found in adults, it has been recently demonstrated that that infants insecurely attached to their caregiver and homozygous for the s-variant of the 5-HTTLPR genotype develop a high level of negative emotionality and fear (Pauli-Pott, Friedel, Hinney, & Hebebrand, 2009). Furthermore, healthy adolescents with at least one copy of the S allele show stronger amygdala responses to fearful faces than healthy adolescents without this allele (Lau, et al., 2009). These findings suggests that the abnormal

brain responses to emotionally negative stimuli may appear relatively early in life in S allele carriers.

To tackle this important issue, we used fMRI to measure brain activity, during a transient state of sadness, in children carrying the S allele and children homozygous for the L allele. This primary emotion was selected given that it is the prevailing mood in major depressive disorder (MDD), and that the 5-HTTLPR polymorphism appears to exert a certain effect on susceptibility to depression (Kiyohara & Yoshimasu, 2010). We predicted that the sad state would be correlated with greater activation of brain regions mediating sadness in the S allele carriers relative to the L allele carriers.

Within a prospective twin cohort study (Ouellet-Morin et al., 2008), 438 children of Caucasian ancestry were scanned when they were 8 years and 4 months of age. The study protocol was approved by the ethics review boards of Sainte-Justine Hospital and CHUM-Notre-Dame Hospital. Written informed consent was obtained from parents of all subjects as well as written assent from all subjects. In this cohort, 90 children were genotyped for the 5-HTTLPR polymorphism. They were divided into two equal groups on the basis of their 5-HTTLPR genotype: children homozygous for the L allele (L group, n=24, 14 girls, 10 boys) and children with either one or two copies of the S allele (S group, n=24, S/S=17, S/L=7, 11 girls, 13 boys). Subjects were unrelated (within and between groups). Subjects with head movements greater than 3mm in the MRI scanner were excluded from this study.

Participants were assessed using the *Dominic-R Interactive* (Valla, Bergeron, & Smolla, 2000). This self-answered, computerized, DSM-IV-based instrument designed to measure mental health in children 6-11 years of age has been used in epidemiologic samples in clinical and research settings (Rousseau, Drapeau, Lacroix, Bagilishya, & Heusch, 2005) (see supplementary material). Both groups scored below the clinical cut-off scores on all mental disorders assessed with the *Dominic-R* (depression, separation anxiety, generalized anxiety, specific phobias, attention-deficit hyperactivity disorder, conduct problems, oppositional-defiant disorder). The depression scores were minimal and not statistically different between groups (S group: mean=3.74, SD=2.30; L group: mean=5.35, SD=3.27) ( $p=0.081$ ).

Blood-oxygen-level dependent (BOLD) signal changes were measured while subjects viewed five blocks of neutral film excerpts (Control condition) followed by five blocks of sad-film excerpts (Experimental condition) (see supplementary material). As subjective emotional responses persist on average 32 s after presentation of aversive pictures (Garrett & Maddock, 2001), this design was used to avoid contamination of the neutral stimuli by the sad stimuli. The sad excerpts, depicting a young boy witnessing the tragic death of his father, were extracted from the film *The Champ* (1979), used in several studies of sadness induction (Eugene et al., 2003; Levesque et al., 2003). The neutral excerpts consisted of a news interview. Each block lasted 39 s and was separated by 15-s resting periods during

which subjects viewed a white cross on a black screen. After scanning, subjects identified the primary emotions (happiness, anger, sadness, fear, surprise, disgust) they felt during the sad and neutral excerpts using a visual analog scale. If a subject identified sadness, he/she was asked to rate its degree (sad, very sad, extremely sad, saddest ever). All subjects identified sadness as the primary emotion felt.

Echoplanar images (EPI) were acquired on a 1.5-Tesla system (Magnetom Vision, Siemens Electric, Erlangen, Germany). Twenty-eight slices (5 mm thick) were acquired every 2.65s in an inclined axial plane, aligned with the anterior commissure-posterior axis. These T2\*-weighted functional images were acquired using EPI pulse sequence (time repetition [TR] = 0.8 ms, time-echo [TE] = 54ms, flip = 90°, field of view [FOV] = 215mm, matrix = 64 x 64, voxel size = 3.36 mm x 3,36mm x 5mm). Following functional scanning, high resolution data were acquired via T1-weighted three dimensional volume acquisition obtained using a gradient echo pulse sequence (TR = 9.7 ms, TE=4 ms, flip = 12°, FOV = 250mm, matrix= 256 x 256, voxel size = 0.94 mm<sup>3</sup>).

Data were analyzed using Statistical Parametric Mapping software (SPM5; Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK). Images for all subjects were realigned to correct for artifacts due to small head movements. The images for all subjects were then spatially normalized into an MRI stereotactic space (Montreal Neurological Institute [MNI] template) using this masked mean image. The MNI template was used since Burgund and



colleagues (Burgund et al., 2002) have shown that even if there are some small anatomical differences between the brain's structures and sulci of adults (age range: 18–30) compared with those of children (age range: 7–8), such minimal differences do not compromise the usefulness of an adult stereotactic space for children. Images were also convolved in space with a three-dimensional isotropic gaussian kernel (12 mm full width half maximum [FWHM]) to improve the signal-to-noise ratio and to accommodate for residual variations in functional neuroanatomy.

The time series of the images were convolved with the delayed box-car function which approximates the activation patterns. Effects at each and every voxel were estimated using the general linear model. Voxel values for the contrasts of interest yielded a statistical parametric map of the  $t$  statistic (SPM  $t$ ), subsequently transformed to the unit normal distribution, (SPM  $Z$ ). A “fixed-effects model” was implemented to contrast the brain activity associated with the viewing of the sad film excerpts and that associated with the viewing of the emotionally neutral film excerpts (Sad-Neutral). This “fixed-effects model” produced individual contrast images, which were used as raw data for the implementation of a “random-effects model” used for group analysis. One-sample t-test were performed for both groups to determine brain activity for the sad minus neutral contrast. A two-sample t-test was performed to compare brain activity observed in the S and L groups (Sad minus Neutral contrast). An a priori search strategy was used and a small volume correction was performed in the following brain regions of interest (ROIs): ACC (Brodmann areas [BA]

24 and 32), ventrolateral prefrontal cortex (VLPFC) (BA 47), anterior temporal pole (BA 21 and 38), insula, caudate nucleus, putamen, and amygdala. These regions have been consistently activated in previous neuroimaging studies of sadness (Beauregard, Lévesque, & Paquette, 2004). The search volume corresponding to the ROIs was defined by creating an inclusive mask in the MARINA program (Bender Institute of Neuroimaging) and using the small volume correction and image volume functions in SPM5. For this a priori search, a corrected probability threshold for multiple comparisons of  $P < 0.05$  corrected was used. Only clusters showing a spatial extent of at least 10 contiguous voxels were kept for image analysis.

The viewing of the sad film excerpts induced a transient state of sadness in all subjects. The mean level of reported sadness was not statistically different ( $p=0.236$ ) in the L group (mean: 2.75, S.D.: 1.16; range 1–4) compared to the S group (mean: 3.18, S.D.: 0.95; range 1–4). In addition, the viewing of the sad film excerpts did not produce other significant change of the emotional state than sadness, and the viewing of the neutral film excerpts did not generate any marked alteration of the emotional state.

In the L group, the Sad minus Neutral contrast revealed a significant bilateral activation in the anterior temporal pole (BA 38) (Table 1). In the S group, the Sad minus Neutral contrast produced significant loci of activation in the left putamen, left insula, and anterior temporal pole (BA 38), bilaterally (Table 1).

[Insert Table 1 about here]

Moreover, during the sad condition (relative to the neutral condition), there was significantly greater activation in the S group compared to the L group in the right putamen (effect size = 0.57), right caudate nucleus (effect size = 0.73), right rostro-ventral ACC (BA 32) (effect size = 0.64), left caudate nucleus (effect size = 0.51) and left putamen (effect size = 0.52). No brain region was significantly more activated in the L group than in the S group (Table 1, Figure 1). A whole-brain analysis (using a  $p < 0.001$  threshold) did not reveal significant activation in other brain areas.

[Insert Figure 1 about here]

The present results indicate that transient sadness is mediated by distinct patterns of regional brain activation in children carrying the S allele compared to children homozygous for the L allele. The effect size of the regional activations found in the comparison between groups indicates that the S allele exerts a moderate impact on the neural correlates of sadness during childhood. Our findings also suggest that the 5-HTTLPR S allele results early in life in functional alterations affecting brain regions known to be implicated in the experiential and physiological aspects of emotion in general, and sadness in particular. About this question, clinical and brain imaging data indicate that the rostro-ventral

subdivision of the ACC plays an important role in the interoceptive/exteroceptive detection of emotional signals during sadness (Lane, Fink, Chau, & Dolan, 1997). With regard to the caudate nucleus, this crucial component of the motor systems has been shown to respond to emotionally negative pictures (Carretie et al., 2009). It has been suggested that this structure might be implicated in the linkage between visceromotor and somatomotor activity in the context of emotional arousal (Lane et al., 2009). As for the putamen, there is evidence that this region of the dorsal striatum is implicated in the processing of aversive stimuli and negative facial expressions (Phillips, Drevets, Rauch, & Lane, 2003).

It has been speculated that serotonergic genes are implicated in the pathogenesis of depression via their influence on neural activity during emotion processing (Dannlowski et al., 2007). Regarding this issue, the present findings suggest that the 5-HTTLPR genotype affects the functioning of cerebral structures involved in major depression (Koolschijn, van Haren, Lensvelt-Mulders, Hulshoff Pol, & Kahn, 2009). This hypothesis is supported by various lines of evidence. For instance, attenuation of the rostro-ventral ACC response to sad faces has been reported in individuals with MDD following antidepressant treatment (Fu et al., 2004). Moreover, depressed individuals demonstrated a higher activation in the left putamen during the viewing of sad faces compared to healthy controls (Surguladze et al., 2005). Abnormal caudate activation has also been found in response to presentation of sad facial stimuli (Garrett & Maddock, 2001). Lastly, in a recent [<sup>11</sup>C]DASB positron emission tomography (PET) study measuring brain 5-HTT binding in a group of acutely

depressed patients in comparison to healthy controls, the depressed patients had lowered 5-HTT binding in the caudate nucleus, putamen, and ACC (Liotti et al., 2000).

In children carrying the S allele, enhanced activation of the putamen, caudate nucleus, and rostral ACC in response to sad film excerpts may reflect heightened neuronal excitability leading subsequently to BOLD signal increases in these regions. Such an increase of neuronal excitability may arise from partial desensitization of inhibitory 5-HT<sub>1A</sub> receptors following increased synaptic 5-HT. Alternatively, increased neuronal excitability in these cerebral structures might reflect diminished 5-HTT expression and elevated available synaptic 5-HT acting on excitatory 5-HT receptor subtypes (similar hypotheses have previously been proposed for the enhanced amygdala activation found in healthy adults carrying the S allele (Hariri, et al., 2002)).

Significant loci of activation were also detected in the insula and anterior temporal pole during the sad state. The insula has been reported to be activated, in healthy subjects, during transient sadness (Liotti, et al., 2000). This region contains a topographical representation of inputs from visceral, olfactory, gustatory, visual, auditory and somatosensory areas. It appears to integrate representations of external sensory experience and internal somatic state and support a representation of somatic and visceral responses accessible to consciousness (Critchley, Wiens, Rotshtein, Ohman, & Dolan, 2004). The insular activation noted here may be a neural correlate of the autonomic changes associated

with the subjective experience of sadness. With respect to the anterior temporal pole, activation of this cortical area has been reported, in healthy adults, during normal anticipatory anxiety (Chua, Krams, Toni, Passingham, & Dolan, 1999), script-generated anger and anxiety and memory-driven sadness (Reiman et al., 1997). Anterior tempopolar activation has also been measured in healthy children during the induction of sadness by film excerpts (Levesque, et al., 2003). This paralimbic cortical region receives inputs from unimodal and heteromodal sensory regions as well as limbic inputs. This structure has been suggested to be part of a brain system that modulates visceral emotional responses to emotionally evocative perceptual stimuli (Kondo, Saleem, & Price, 2005). In this context, it is possible that the anterior tempopolar activations seen in this study reflected the modulation of the visceral reactions to the sad film excerpts.

We did not genotype rs25531, which renders the L allele in La and Lg. This is the main limitation of this study since the Lg allele is functionally equivalent to the S allele (Hu et al., 2006; Wendland, Martin, Kruse, Lesch, & Murphy, 2006). Another limitation of this study is the lack of positive emotional stimuli in the fMRI protocol. Given this, we cannot conclude with certitude that the S-allele effect on brain activation to sad films has anything to do with sadness at all, and not with general emotional content.

In summary, the results of this study demonstrate that during a sad state induced by film excerpts, children carrying either one or two copies of the S allele, compared to children

homozygous for the L allele, show increased activations in brain regions (putamen, caudate nucleus, rostro-ventral ACC) known to be associated with normal sadness and major depression. Given that the 5-HTTLPR polymorphism has been associated with mood disorders (Dannlowski, et al., 2007), it is plausible that the abnormal pattern of regional brain activity detected here, in children carrying the S allele in response to the sad stimuli, increases susceptibility to emotional dysregulation and depressive symptoms.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), Ste. Justine Hospital, and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to DP. We thank J. Malo, C. Côté, J. Lévesque, and N. Illick for technical magnetic resonance imaging assistance.

## Références

- Beauregard, M., Lévesque, J., & Paquette, V. (2004). Neural Basis of Conscious and Voluntary Self-Regulation of Emotion. In M. Beauregard (Ed.), *Consciousness, Emotional Self-Regulation and the Brain*. Philadelphia: John Benjamins Publishing.
- Burgund, E. D., Kang, H. C., Kelly, J. E., Buckner, R. L., Snyder, A. Z., Petersen, S. E., et al. (2002). The feasibility of a common stereotactic space for children and adults in fMRI studies of development. *Neuroimage*, *17*(1), 184-200.
- Carretie, L., Rios, M., de la Gandara, B. S., Tapia, M., Albert, J., Lopez-Martin, S., et al. (2009). The striatum beyond reward: caudate responds intensely to unpleasant pictures. *Neuroscience*, *164*(4), 1615-1622.
- Chua, P., Krams, M., Toni, I., Passingham, R., & Dolan, R. (1999). A functional anatomy of anticipatory anxiety. *Neuroimage*, *9*(6 Pt 1), 563-571.
- Critchley, H. D., Wiens, S., Rotshtein, P., Ohman, A., & Dolan, R. J. (2004). Neural systems supporting interoceptive awareness. *Nat Neurosci*, *7*(2), 189-195.
- Dannlowski, U., Ohrmann, P., Bauer, J., Kugel, H., Baune, B. T., Hohoff, C., et al. (2007). Serotonergic genes modulate amygdala activity in major depression. *Genes Brain Behav*, *6*(7), 672-676.
- Eugene, F., Levesque, J., Mensour, B., Leroux, J. M., Beaudoin, G., Bourgouin, P., et al. (2003). The impact of individual differences on the neural circuitry underlying sadness. *Neuroimage*, *19*(2 Pt 1), 354-364.
- Fu, C. H., Williams, S. C., Cleare, A. J., Brammer, M. J., Walsh, N. D., Kim, J., et al. (2004). Attenuation of the neural response to sad faces in major depression by antidepressant treatment: a prospective, event-related functional magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, *61*(9), 877-889.
- Garrett, A. S., & Maddock, R. J. (2001). Time course of the subjective emotional response to aversive pictures: relevance to fMRI studies. *Psychiatry Res*, *108*(1), 39-48.



- Hariri, A. R., Drabant, E. M., Munoz, K. E., Kolachana, B. S., Mattay, V. S., Egan, M. F., et al. (2005). A susceptibility gene for affective disorders and the response of the human amygdala. *Arch Gen Psychiatry*, *62*(2), 146-152.
- Hariri, A. R., & Holmes, A. (2006). Genetics of emotional regulation: the role of the serotonin transporter in neural function. *Trends Cogn Sci*, *10*(4), 182-191.
- Hariri, A. R., Mattay, V. S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., et al. (2002). Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science*, *297*(5580), 400-403.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., et al. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*, *66*(6), 2621-2624.
- Heinz, A., Jones, D. W., Mazzanti, C., Goldman, D., Ragan, P., Hommer, D., et al. (2000). A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. *Biol Psychiatry*, *47*(7), 643-649.
- Hu, X. Z., Lipsky, R. H., Zhu, G., Akhtar, L. A., Taubman, J., Greenberg, B. D., et al. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*, *78*(5), 815-826.
- Kiyohara, C., & Yoshimasu, K. (2010). Association between major depressive disorder and a functional polymorphism of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter gene: a meta-analysis. *Psychiatr Genet*, *20*(2), 49-58.
- Kondo, H., Saleem, K. S., & Price, J. L. (2005). Differential connections of the perirhinal and parahippocampal cortex with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, *493*(4), 479-509.
- Koolschijn, P. C., van Haren, N. E., Lensvelt-Mulders, G. J., Hulshoff Pol, H. E., & Kahn, R. S. (2009). Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp*, *30*(11), 3719-3735.

- Lane, R. D., Fink, G. R., Chau, P. M., & Dolan, R. J. (1997). Neural activation during selective attention to subjective emotional responses. *Neuroreport*, *8*(18), 3969-3972.
- Lane, R. D., McRae, K., Reiman, E. M., Chen, K., Ahern, G. L., & Thayer, J. F. (2009). Neural correlates of heart rate variability during emotion. *Neuroimage*, *44*(1), 213-222.
- Lau, J. Y., Goldman, D., Buzas, B., Fromm, S. J., Guyer, A. E., Hodgkinson, C., et al. (2009). Amygdala function and 5-HTT gene variants in adolescent anxiety and major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, *65*(4), 349-355.
- Levesque, J., Joanette, Y., Mensour, B., Beaudoin, G., Leroux, J. M., Bourgouin, P., et al. (2003). Neural correlates of sad feelings in healthy girls. *Neuroscience*, *121*(3), 545-551.
- Liotti, M., Mayberg, H. S., Brannan, S. K., McGinnis, S., Jerabek, P., & Fox, P. T. (2000). Differential limbic--cortical correlates of sadness and anxiety in healthy subjects: implications for affective disorders. *Biol Psychiatry*, *48*(1), 30-42.
- Malison, R. T., Price, L. H., Berman, R., van Dyck, C. H., Pelton, G. H., Carpenter, L., et al. (1998). Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*, *44*(11), 1090-1098.
- Ouellet-Morin, I., Boivin, M., Dionne, G., Lupien, S. J., Arseneault, L., Barr, R. G., et al. (2008). Variations in heritability of cortisol reactivity to stress as a function of early familial adversity among 19-month-old twins. *Arch Gen Psychiatry*, *65*(2), 211-218.
- Pauli-Pott, U., Friedel, S., Hinney, A., & Hebebrand, J. (2009). Serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR), environmental conditions, and developing negative emotionality and fear in early childhood. *J Neural Transm*, *116*(4), 503-512.
- Pezawas, L., Meyer-Lindenberg, A., Drabant, E. M., Verchinski, B. A., Munoz, K. E., Kolachana, B. S., et al. (2005). 5-HTTLPR polymorphism impacts human

- cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci*, 8(6), 828-834.
- Phillips, M. L., Drevets, W. C., Rauch, S. L., & Lane, R. (2003). Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*, 54(5), 504-514.
- Reiman, E. M., Lane, R. D., Ahern, G. L., Schwartz, G. E., Davidson, R. J., Friston, K. J., et al. (1997). Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am J Psychiatry*, 154(7), 918-925.
- Rousseau, C., Drapeau, A., Lacroix, L., Bagilishya, D., & Heusch, N. (2005). Evaluation of a classroom program of creative expression workshops for refugee and immigrant children. *J Child Psychol Psychiatry*, 46(2), 180-185.
- Schinka, J. A., Busch, R. M., & Robichaux-Keene, N. (2004). A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and trait anxiety. *Mol Psychiatry*, 9(2), 197-202.
- Surguladze, S., Brammer, M. J., Keedwell, P., Giampietro, V., Young, A. W., Travis, M. J., et al. (2005). A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 57(3), 201-209.
- Talairach, J., & Tournoux, P. (1988). *Co-planar stereotaxic atlas of the human brain*. Stuttgart: Thieme Medical.
- Valla, J. P., Bergeron, L., & Smolla, N. (2000). The Dominic-R: a pictorial interview for 6- to 11-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39(1), 85-93.
- Wendland, J. R., Martin, B. J., Kruse, M. R., Lesch, K. P., & Murphy, D. L. (2006). Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry*, 11(3), 224-226.

## Table caption

Group	Region	Brodmann area	Coordinates			Z-statistics	Corrected <i>P</i> value
			x	y	z		
L group	L anterior temporal pole	38	-36	11	-29	4.23	0.001
	R anterior temporal pole	38	51	5	-21	3.89	0.003
S group	R anterior temporal pole	38	48	18	-36	3.83	0.003
	L anterior temporal pole	38	-48	3	-15	3.60	0.008
	L insula		-36	-18	-6	3.47	0.020
	L caudate nucleus		-12	8	5	3.47	0.012
	L putamen		-18	15	0	3.26	0.021
S group minus L group	R putamen		17	8	-5	5.02	0.001
	L caudate nucleus		-10	8	-5	4.11	0.001
	R caudate nucleus		14	17	-2	3.64	0.006
	L putamen		-15	14	-5	3.61	0.007
	R ACC	32	9	46	-1	3.15	0.039

Table 1. Stereotaxic coordinates are derived from the human atlas of Talairach and Tournoux (Talairach & Tournoux, 1988) and refer to medial–lateral position (x) relative to midline (positive\_right), anterior–posterior position (y) relative to the anterior commissure (positive\_anterior), and superior–inferior position (z) relative to the commissural line (positive\_superior). Designation of Brodmann areas for cortical areas is also based on this atlas. L, left; R, right : ACC: anterior cingulate cortex.

### Figure caption

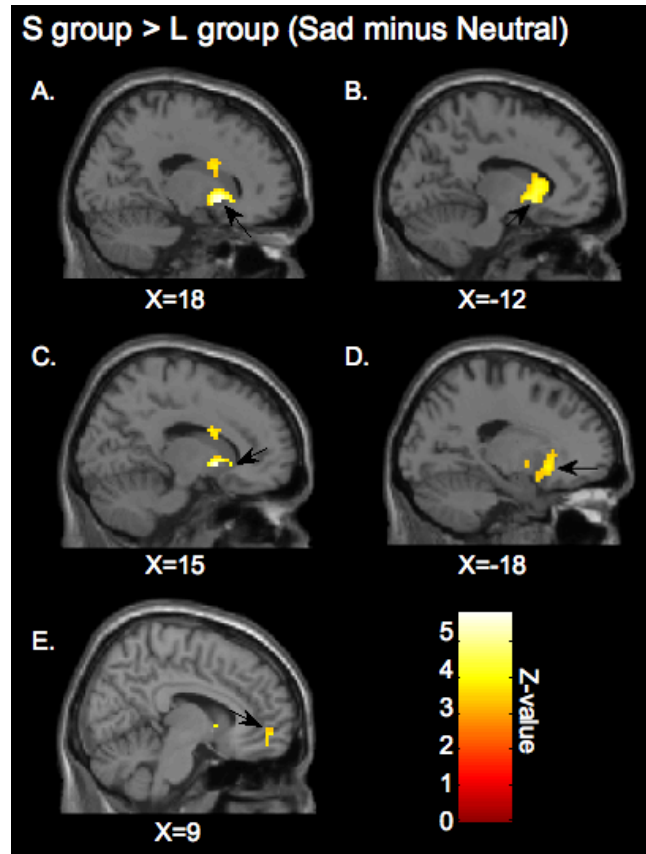


Figure 1. Images are sagittal sections of the greater regional activity in the S group vs. the L group (sad minus neutral). Significant loci of activation were observed in (a) the right putamen, (b) the left caudate nucleus, (c) the right caudate nucleus, (d) the left putamen and (e) the right anterior cingulate cortex.

## Chapitre 3

### Article 2

#### Early influence of the rs4675690 on the Neural Substrates of Sadness

Émilie Fortier, Anne Noreau, Franco Lepore, Michel Boivin, Daniel Pérusse,  
Guy A. Rouleau & Mario Beauregard

*Journal of Affective Disorders, 135(2011), 336-340.*

## **Contributions des auteurs**

Émilie Fortier: Élaboration de l'idée de recherche, préparation des données IRMf, analyses statistiques, rédaction de l'article

Anne Noreau: Génotypage et rédaction de la section génotypage

Franco Lepore: Mise en contact des co-auteurs

Michel Boivin: Gestionnaire de la base de données de la cohorte des jumeaux nouveaux-nés du Québec.

Daniel Pérusse: Créateur de la base de données de la cohorte des jumeaux nouveaux-nés du Québec, élaboration de l'idée de recherche

Guy A. Rouleau: Directeur de recherche de Anne Noreau, élaboration de l'idée de recherche

Mario Beauregard: Investigateur principal, élaboration de l'idée de recherche, correction du manuscrit.

## Early Influence of the rs4675690 on the Neural Substrates of Sadness

Émilie Fortier<sup>a</sup>  
 Anne Noreau<sup>b</sup>  
 Franco Lepore<sup>a,c</sup>  
 Michel Boivin<sup>d,e</sup>  
 Daniel Pérusse<sup>a,f</sup>  
 Guy A. Rouleau<sup>b,c</sup>  
 Mario Beauregard<sup>a,g,h,i</sup>

<sup>a</sup>Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Département de Psychologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>b</sup>Centre d'excellence en Neuromique de l'Université de Montréal, Centre de recherche du CHUM and Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>c</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine, Montreal, Canada

<sup>d</sup>École de Psychologie, Université Laval, Quebec City, Canada

<sup>e</sup>[Groupe de recherche sur l'inadaptation psychosociale chez l'enfant \(GRIP\)](#), Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>f</sup>Département d'Anthropologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>g</sup>Département de Radiologie, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>h</sup>Centre de Recherche en Sciences Neurologiques (CRSN), Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>i</sup>Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, Canada

Correspondence: Dr Mario Beauregard, Centre de Recherche en Neuropsychologie et Cognition (CERNEC), Département de Psychologie, Université de Montréal, CP 6128, succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Phone : (514) 343-7651 ; Fax number : (514) 343-5787.



## **Abstract**

**Background:** CREB1 has previously been implicated in mood disorders, suicide, and antidepressant response. There is some evidence that the T allele in rs4675690, a single-nucleotide polymorphism near the CREB1 gene, is involved in the modulation of neural responses to negative stimuli. It is not known whether differential brain activity during negative mood state appears early in life in T allele carriers.

**Methods:** Functional magnetic resonance imaging (fMRI) was used to measure brain activity, during a transient state of sadness, in children homozygous for the T allele or the C allele. This primary emotion was selected given that it is the prevailing mood in major depressive disorder (MDD). Blood-oxygen-level dependent (BOLD) signal changes were measured while subjects viewed blocks of neutral film excerpts and blocks of sad film excerpts.

**Results:** There was significantly greater BOLD activation in the TT group, compared to the CC group, in the right dorsal anterior cingulate cortex (Brodmann area [BA 24]), right putamen, right caudate nucleus and left anterior temporal pole (BA 21), when the brain activity associated with the viewing of the emotionally neutral film excerpts was subtracted from that associated with the viewing of the sad film excerpts.

**Limitations:** A replication study using larger samples may be required for more definitive conclusions.

**Conclusions:** The different pattern of regional brain activation found here during transient sadness - in children carrying the T allele, compared to those carrying the C allele - might increase later in life susceptibility to emotional dysregulation and depressive symptoms.

**Keywords:** CREB1, rs4675690, sadness, children, brain, fMRI

## **Introduction**

The cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response binding protein (CREB) plays a key role in neuroplastic processes such as differentiation, growth and survival of neurons (Shieh and Ghosh, 1999). Based on the hypothesis that cellular mechanisms involved in synaptic plasticity contribute to the risk of major depressive disorder (MDD), it has been proposed that CREB1, the gene encoding CREB, might influence the risk of developing mood disorders (Manier et al., 2001, Zubenko et al., 2003).

Regarding this issue, chronic antidepressant treatment upregulates the cAMP signal transduction cascade, which in turn enhances expression and function of CREB1, resulting in neuronal sprouting and neurogenesis (Burcescu et al., 2005). In other respects, results of postmortem brain studies have revealed reductions of CREB in the temporal cortex (Dowlatshahi et al., 1998) and orbitofrontal cortex (Yamada et al 2003) of antidepressant-free patients with MDD at the time of death compared to age-matched controls. In addition, another post-mortem investigation has evidenced a reduction of CREB expression in the prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects relative to nonpsychiatric controls (Dwivedi, et al., 2003).

An association between the T allele in rs4675690 - a single-nucleotide polymorphism near the CREB1 gene - and greater effort at anger control has been reported in men with MDD (Perlis et al., 2007a). Furthermore, a recent functional magnetic resonance imaging (fMRI) study (Perlis et al., 2008) has shown that subjects homozygous for the T allele of

rs4675690 displayed higher blood-oxygen-level dependent (BOLD) signal in the insula (bilaterally) for angry and fearful faces compared to subjects carrying the C allele. This finding suggests that the rs4675690 is implicated in the modulation of neural responses to negative stimuli (Perlis et al., 2008).

It is not known whether differential brain activity during negative mood state appears early in life in T allele carriers relative to C allele carriers. To address this question, we used fMRI to measure brain activity, during a transient state of sadness, in children homozygous for the T allele and children homozygous for the C allele. This primary emotion was selected given that it is the prevailing mood in MDD. We predicted that the sad state would be correlated with greater activation of brain regions mediating sadness in the T allele carriers relative to the C allele carriers.

## **Method**

### **Subjects**

Within a prospective twin cohort study (Dubreuil et al., 2003, Ouellet-Morin et al., 2008), 438 children of Caucasian ancestry were scanned when they were 8 years and 4 months of age. The study protocol was approved by the ethics review boards of Sainte-Justine Hospital and Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) – Hôpital Notre-Dame. Written informed consent was obtained from all subjects and their parents. In this cohort, 139 children were genotyped for rs4675690. Distribution of genotype at rs4675690 among children was 27 of 139 (19%) TT and 42 of 139 (30%) CC. Subjects with more than

3mm (or 3°) movement in the scanner were excluded from this study. Since they were only 12 valid TT subjects, 12 subjects of CC subject were randomly selected. All subjects were unrelated within groups and between groups.

### **Mental health evaluation**

Subjects were assessed using the *Dominic-R Interactive* (Valla et al., 2000). This self-answered, computerized, DSM-IV-based instrument designed to measure mental health in children 6-11 years of age has been used in epidemiologic samples in clinical and research settings (Rousseau, Drapeau, Lacroix, Bagilishya, & Heusch, 2005; Valla, Bergeron, Berube, Gaudet, & St-Georges, 1994). The two groups scored below the clinical cut-off scores on all mental disorders assessed with the *Dominic-R* (depression, separation anxiety, generalized anxiety, specific phobias, attention-deficit hyperactivity disorder, conduct problems, oppositional-defiant disorder). The depression scores were minimal and not statistically different between groups (CC group: mean=5.17, SD=3.64, TT group: mean=8.64 SD=5.07) (P=0.07).

### **Genotyping**

The C\_42647845\_10 genotyping kit obtained from Applied Biosystems contained the two flanking primers and the C- and T- specific probes labelled with VIC and FAM fluorescent dyes, respectively. All PCR reaction were carried out using the TaqManR Genotyping Master Mix (ABI, Applied Biosystems) with 10 ng of genomic DNA in a final volume of 10 µl. The PCR reaction begins with an initial denaturation and activation at 95°C for 10

minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Genotyping was performed using 7900HT Fast Real-Time PCR System (ABI, Applied Biosystems) and analysis for the allelic discrimination was performed using SDS2.2.2 software, following the instructions of the suppliers.

### **Experimental procedure**

BOLD signal changes were measured while subjects viewed five blocks of neutral film excerpts (Control condition) followed by five blocks of sad-film excerpts (Experimental condition). The sad excerpts were extracted from the film *The Champ* (1979). Each block lasted 39 s and was separated by 15-s resting periods. After scanning, subjects identified the primary emotions they felt during the sad and neutral excerpts using a visual analog scale. Subjects identified sadness as the primary emotion felt. They were asked to rate its degree (sad, very sad, extremely sad, saddest ever).

### **FMRI acquisition**

Echoplanar images (EPI) were acquired on a 1.5-Tesla system (Magnetom Vision, Siemens Electric, Erlangen, Germany). Twenty-eight slices (5 mm thick) were acquired every 2.65s in an inclined axial plane, aligned with the anterior commissure-posterior axis. These T2\*-weighted functional images were acquired using EPI pulse sequence (time repetition [TR] = 0.8 ms, time-echo [TE] = 54ms, flip = 90°, field of view [FOV] = 215mm, matrix = 64 x 64, voxel size = 3.36 mm x 3,36mm x 5mm). Following functional scanning, high resolution data were acquired via T1-weighted three dimensional volume acquisition

obtained using a gradient echo pulse sequence (TR = 9.7 ms, TE=4 ms, flip = 12°, FOV = 250mm, matrix= 256 x 256, voxel size = 0.94 mm<sup>3</sup>).

### **Image analysis**

Data were analyzed using Statistical Parametric Mapping software (SPM5; Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK). Images for all subjects were realigned to correct for artifacts and spatially normalized into an MRI stereotactic space (Montreal Neurological Institute [MNI] template) using this masked mean image. Images were also convolved in space with a three-dimensional isotropic gaussian kernel (12 mm full width half maximum [FWHM]).

The time series of the images were convolved with the delayed box-car. Effects at each and every voxel were estimated using the general linear model. Voxel values for the contrasts of interest yielded a statistical parametric map of the  $t$  statistic (SPM  $t$ ), subsequently transformed to the unit normal distribution, (SPM  $Z$ ). A “fixed-effects model” was implemented to contrast the brain activity associated with the viewing of the sad film excerpts and that associated with the viewing of the emotionally neutral film excerpts (Sad minus Neutral). Individual contrast images, were used as raw data for the implementation of a “random-effects model” (Friston and Frackowiak, 1997) used for group analysis. A two sample T-test was performed to compare brain activity measured in the two groups. An a priori search strategy was used and a small volume correction was performed in the following brain regions of interest (ROIs): anterior cingulate cortex (ACC) (Brodmann

areas [BA] 24 and 32), medial prefrontal cortex (MPFC, BA 9 and 10), lateral orbitofrontal cortex (LOFC) (BA 47), anterior temporal pole (ATP) (BA 21 and 38), insula, caudate nucleus, putamen, and amygdala. These regions have been consistently activated in previous neuroimaging studies of sadness. The search volumes corresponding to the ROIs were defined by creating an inclusive mask using the MARINA program (Bender Institute of Neuroimaging). For this a priori search, a corrected probability threshold for multiple comparisons of  $P < 0.05$  corrected was used. Only clusters showing a spatial extent of at least 10 contiguous voxels were kept for image analysis.

## **Results**

### **Self-report data**

The viewing of the sad film excerpts induced a transient state of sadness in all subjects. The mean level of reported sadness was not statistically different between groups (CC group: mean=2.27, SD=1.27, TT group: mean=3.00, SD=1.05) ( $F=2.01$ ,  $P=0.172$ ). In addition, the viewing of the sad film excerpts did not produce other significant change of the emotional state than sadness, and the viewing of the neutral film excerpts did not generate any marked alteration of the emotional state.

### **FMRI data**

There was significantly greater BOLD activation in the TT group, compared to the CC group, in the right dorsal ACC (BA 24), right putamen, right caudate nucleus and left ATP (BA 21), when the brain activity associated with the viewing of the emotionally neutral



film excerpts was subtracted from that associated with the viewing of the sad film excerpts (Sad minus Neutral contrast). No brain region was more activated in the CC group compared to the TT group.

[Insert Table 1 about here]

[Insert Figure 1 about here]

## **Discussion**

This study sought to determine whether differential brain activity during negative mood state appear early in life in T allele carriers compared to C allele carriers. To tackle this issue, cerebral activity was measured during a transient state of sadness in children homozygous for the T allele (TT group) and children homozygous for the C allele (CC group). Subjects in the TT group, relative to those in the CC group, displayed greater BOLD activation in the right dorsal ACC (BA 24), left ATP (BA 21), right putamen and right caudate nucleus. These findings suggest that the rs4675690 polymorphism near the CREB1 gene produces early in life functional alterations affecting cerebral structures known to be involved in sadness and MDD.

Using fMRI, Perlis and colleagues recently showed higher BOLD signal in the insula, bilaterally, during the processing of angry and fearful faces (Perlis et al., 2008). These researchers concluded that the CREB1 is implicated in the modulation of the neural

responses to unpleasant stimuli. The present results are consistent with this conclusion. These results indicate that the CREB1 exerts a modulatory effect on neural activity in brain regions involved in the processing of several kinds of emotionally negative stimuli.

An association between the T allele and greater effort at anger control has previously been demonstrated in men suffering from MDD (Perlis et al., 2007a). Furthermore, there is evidence that the T allele influences the risk for antidepressant treatment-emergent suicidality in men with MDD (Perlis et al., 2007b). Given this, it is conceivable that the different pattern of regional brain activation found here during transient sadness - in children carrying the T allele, compared to those carrying the C allele - might increase later in life susceptibility to emotional dysregulation and depressive symptoms.

The dorsal subdivision of the ACC has been implicated in the appraisal and expression of negative emotions in previous functional neuroimaging studies (Etkin et al., 2011). The greater dorsal anterior cingulate activation noted here might have reflected a stronger neural effect of the sad film excerpts in the TT group relative to the CC group.

Activation of the ATP has been reported in healthy children during the induction of a sad state (Lévesque et al., 2003). This paralimbic cortical region receives inputs from unimodal and heteromodal sensory areas as well as limbic inputs. The ATP appears to be part of a brain system involved in visceral responses to emotionally evocative perceptual stimuli (Kondo et al., 2005). In this context, it is plausible that the higher ATP BOLD activation

measured in TT subjects, compared to CC subjects, was related to more intense visceral reactions during the transient state of sadness.

Both the putamen and the caudate nucleus show abnormal activation in individuals with MDD during the viewing of sad faces (Garrett and Maddock, 2001; Surguladze et al., 2005). It has been hypothesized that the caudate nucleus is implicated in the linkage between visceromotor and somatomotor activity in the context of emotional arousal (Lane et al., 2009). In regard to the putamen, there is evidence that this region of the dorsal striatum is involved in the processing of negative stimuli and negative facial expressions (Phillips et al., 2003). The greater loci of activation in the putamen and caudate nucleus support the view that sad stimuli induce abnormally elevated responses in TT allele carriers, relative to CC allele carriers, in cerebral structures playing a role in normal and pathological sadness.

## REFERENCES

- BURCESCU, I., WIGG, K., KING, N., VETRO, A., KISS, E., KATAY, L., KENNEDY, J. L., KOVACS, M. & BARR, C. L. 2005. Association study of CREB1 and childhood-onset mood disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 137B, 45-50.
- DOWLATSHAHI, D., MACQUEEN, G. M., WANG, J. F. & YOUNG. 1998. Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet*, 352, 1754-1755.
- DUBREUIL, E., DITTO, B., DIONNE, G., PIHL, R. O., TREMBLAY, R. E., BOIVIN, M. & PERUSSE, D. 2003. Familiality of heart rate and cardiac-related autonomic activity in five-month-old twins: the Quebec newborn twins study. *Psychophysiology*, 40, 849-62.
- DWIVEDI, Y., RAO, J. S., RIZAVI, H. S., KOTOWSKI, J, CONLEY, R. R., ROBERTS, R. C. et al. 2003. Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, 60, 273-282.
- ETKIN, A., EGNER, T. & Kalisch, R. 2011. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci*, 15, 85-93.
- FRISTON, K. J. & FRACKOWIAK, R. S. 1997. Images of the future: A philosophical coda. In: FRACKOWIAK, R. S., FRISTON, K. J., DOLAN, R. & MAZZIOTTA, J. C. (eds.) *Human Brain Function*. San Diego, CA: Academic Press.
- GARRETT, A. S. & MADDOCK, R. J. 2001. Time course of the subjective emotional response to aversive pictures: relevance to fMRI studies. *Psychiatry Res*, 108, 39-48.
- KONDO, H., SALEEM, K. S. & PRICE, J. L. 2005. Differential connections of the perirhinal and parahippocampal cortex with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, 493, 479-509.
- LANE, R. D., MCRAE, K., REIMAN, E. M., CHEN, K., AHERN, G. L. & THAYER, J. F. 2009. Neural correlates of heart rate variability during emotion. *Neuroimage*, 44, 213-22.
- LEVESQUE, J., JOANETTE, Y., MENSOUR, B., BEAUDOIN, G., LEROUX, J. M., BOURGOUIN, P. & BEAUREGARD, M. 2003. Neural correlates of sad feelings in healthy girls. *Neuroscience*, 121, 545-51.
- MANIER, D. H., SHELTON, R. C. & SULSER, F. 2001. Cross-talk between PKA and PKC in human fibroblasts: what are the pharmacotherapeutic implications? *J Affect Disord*, 65, 275-9.
- OUELLET-MORIN, I., BOIVIN, M., DIONNE, G., LUPIEN, S. J., ARSENEAULT, L., BARR, R. G., PERUSSE, D. & TREMBLAY, R. E. 2008. Variations in heritability of cortisol reactivity to stress as a function of early familial adversity among 19-month-old twins. *Arch Gen Psychiatry*, 65, 211-8.

- PERLIS, R. H., PURCELL, S., FAGERNESS, J., CUSIN, C., YAMAKI, L., FAVA, M. & SMOLLER, J. W. 2007a. Clinical and genetic dissection of anger expression and CREB1 polymorphisms in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 62, 536-40.
- PERLIS, R. H., PURCELL, S., FAVA, M., FAGERNESS, J., RUSH, A. J., TRIVEDI, M. H. & SMOLLER, J. W. 2007b. Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR\*D study. *Arch Gen Psychiatry*, 64, 689-97.
- PERLIS, R. H., HOLT, D. J., SMOLLER, J. W., BLOOD, A. J., LEE, S., KIM, B. W., LEE, M. J., SUN, M., MAKRIS, N., KENNEDY, D. K., ROONEY, K., DOUGHERTY, D. D., HOGE, R., ROSENBAUM, J. F., FAVA, M., GUSELLA, J., GASIC, G. P. & BREITER, H. C. 2008. Association of a polymorphism near CREB1 with differential aversion processing in the insula of healthy participants. *Arch Gen Psychiatry*, 65, 882-92.
- PHILLIPS, M. L., DREVETS, W. C., RAUCH, S. L. & LANE, R. 2003. Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*, 54, 504-14.
- ROUSSEAU, C., DRAPEAU, A., LACROIX, L., BAGILISHYA, B. & HEUSCH N. 2005. Evaluation of a classroom program of creative expression workshops for refugee and immigrant children. *J Child Psychol. Psychiatry*, 46, 180-185.
- SHIEH, P. B. & GHOSH, A. 1999. Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. *J Neurobiol*, 41, 127-34.
- SLOAN, D. M. 2004. Emotion regulation in action: emotional reactivity in experiential avoidance. *Behav Res Ther*, 42, 1257-70.
- SURGULADZE, S., BRAMMER, M. J., KEEDWELL, P., GIAMPIETRO, V., YOUNG, A. W., TRAVIS, M. J., WILLIAMS, S. C. & PHILLIPS, M. L. 2005. A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 57, 201-9.
- TALAIRACH, J. & TOURNOUX, P. J. 1988. Co-planar stereotaxic atlas of the human brain, Stuttgart: Thieme Medical.
- VALLA, J. P., BERGERON, L., BÉRUBÉ, H., GAUDET, N. & ST-GEORGES, M. 1994. A structured pictorial questionnaire to assess DSM-III-R-based diagnoses in children (6-11 years): development, validity, and reliability. *J Abnorm Child Psychol*, 22, 403-423.
- VALLA, J. P., BERGERON, L. & SMOLLA, N. 2000. The Dominic-R: a pictorial interview for 6- to 11-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39, 85-93.
- YAMADA, S., YAMAMOTO, M., OZAWA, H., RIEDERER, P. & SAITO, T. 2003. Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm*, 110, 671-680.

ZUBENKO, G. S., HUGHES, H. B., 3RD, STIFFLER, J. S., BRECHBIEL, A., ZUBENKO, W. N., MAHER, B. S. & MARAZITA, M. L. 2003. Sequence variations in CREB1 cosegregate with depressive disorders in women. *Mol Psychiatry*, 8, 611-8.

## Tables and figures

Characteristic	mean (SD)		P-value
	CC	TT	
Age (years)	8.42(0.08)	8.43(0.10)	0.90
Tendency towards			
Separation anxiety	2.71(2.02)	3.00(2.10)	0.99
Generalized anxiety	5.14(3.63)	6.54(3.33)	0.44
Depression/dysthymia	5.00(3.80)	8.00(4.71)	0.98
Opposition/provocation	2.50(2.68)	3.31(2.72)	0.62
Conduct disorder	1.36(2.73)	1.92(3.80)	0.83
Inattention/hyperactivity/impulsivity	4.71(3.34)	7.38(4.27)	0.73
Inattention	2.71(1.94)	3.46(2.73)	0.34
Hyperactivity	1.29(1.38)	3.08(1.66)	0.49
Impulsivity	0.71(0.99)	0.85(0.99)	0.73
Specific phobia	1.79(1.53)	2.31(2.59)	0.23
Male n(%)	5(42)	4(33)	

Table 1. Mental health evaluation assessed with the Dominic-R. A mean comparison analyses was conducted in SPSS 14.0.

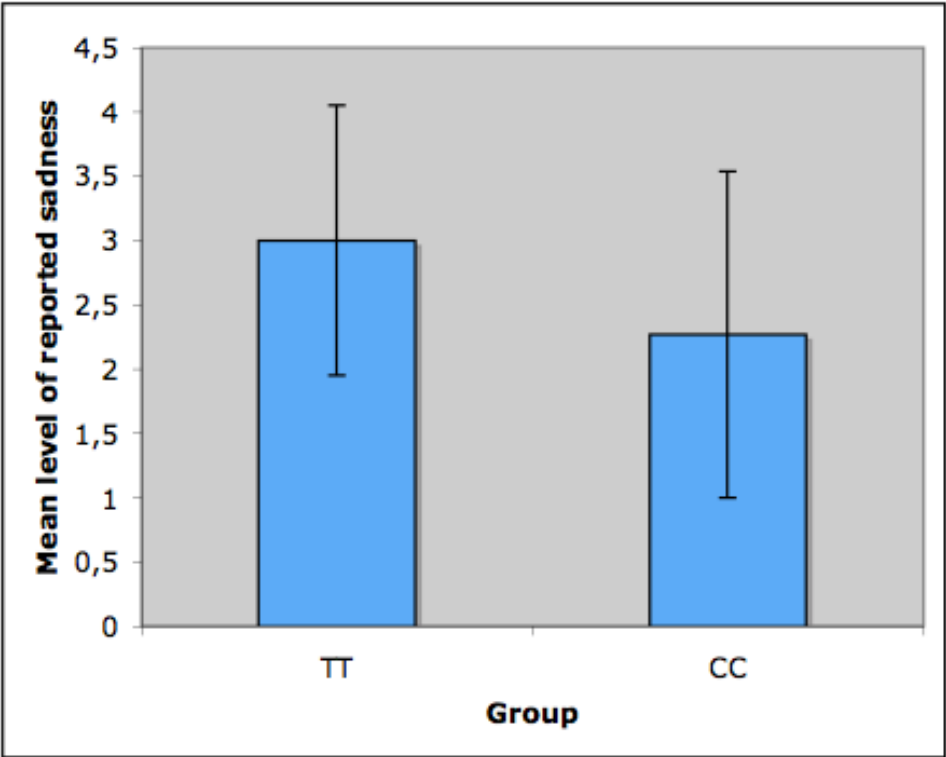


Figure 1. Mean levels of reported sadness



Significant loci of activation during sadness (Sad minus Neutral contrast)								
Group:	Region	Brodmann area	Spatial extent	Coordinates			Z-statistic	Uncorrected P value
				x	y	z		
TT								
	R ACC	24/32	59	3	37	17	2.27	0.012
	L ACC	24/32	76	-2	43	18	2.31	0.010
	L Amygdala		13	-26	-9	-14	1.82	0.035
	R ATP	21/38	92	48	5	-24	3.46	0.000
	L ATP	21/38	171	-44	8	-34	4.08	0.000
	R Insula		17	32	11	-13	1.90	0.026
	L Insula		76	-36	-12	-9	3.16	0.001
	R MPFC	9/10	321	1	52	24	2.91	0.002
	L MPFC	9/10	289	-2	52	24	2.98	0.001
	R LOFC	47	20	40	26	-4	2.58	0.005
	L LOFC	47	126	-44	23	-4	2.96	0.002
	R Putamen		96	19	3	8	2.55	0.005
	L Putamen		38	-18	5	5	2.36	0.009
CC								
	L Insula		15	-28	25	1	2.11	0.017
	L LOFC	47	11	-31	29	-2	1.81	0.035

Table 2. Stereotaxic coordinates are derived from the human atlas of Talairach and Tournoux [35] and refer to medial–lateral position (x) relative to midline (positive\_right), anterior–posterior position (y) relative to the anterior commissure (positive\_anterior), and superior–inferior position (z) relative to the commissural line (positive\_superior). Designation of Brodmann areas for cortical areas is also based on this atlas. L, left; R,

right : ATP: anterior temporal pole (BA 21/38), LOFC: lateral orbitofrontal cortex (BA 47),  
ACC: anterior cingulated cortex (BA 24/32), MPFC: medial prefrontal cortex (BA 9/10).

**Between-group comparisons (Sad minus Neutral contrast)**

Groups	Region	Brodmann area	Spatial extent	Coordinates			Z-statistic	Corrected P value
				x	y	z		
TT mn CC								
	R Putamen		217	22	-6	-1	2.67	0.028
	L ATP	21	127	-44	3	-29	3.01	0.023
	R ACC	24/32	209	1	29	17	3.08	0.049
	R Caudate		135	19	11	14	2.71	0.046

Table 3. Stereotaxic coordinates are derived from the human atlas of Talairach and Tournoux [35] and refer to medial–lateral position (x) relative to midline (positive\_right), anterior–posterior position (y) relative to the anterior commissure (positive\_anterior), and superior–inferior position (z) relative to the commissural line (positive\_superior). Designation of Brodmann areas for cortical areas is also based on this atlas. L, left; R, right : ATP: anterior temporal pole (BA21), ACC: anterior cingulated cortex (BA 24/32).

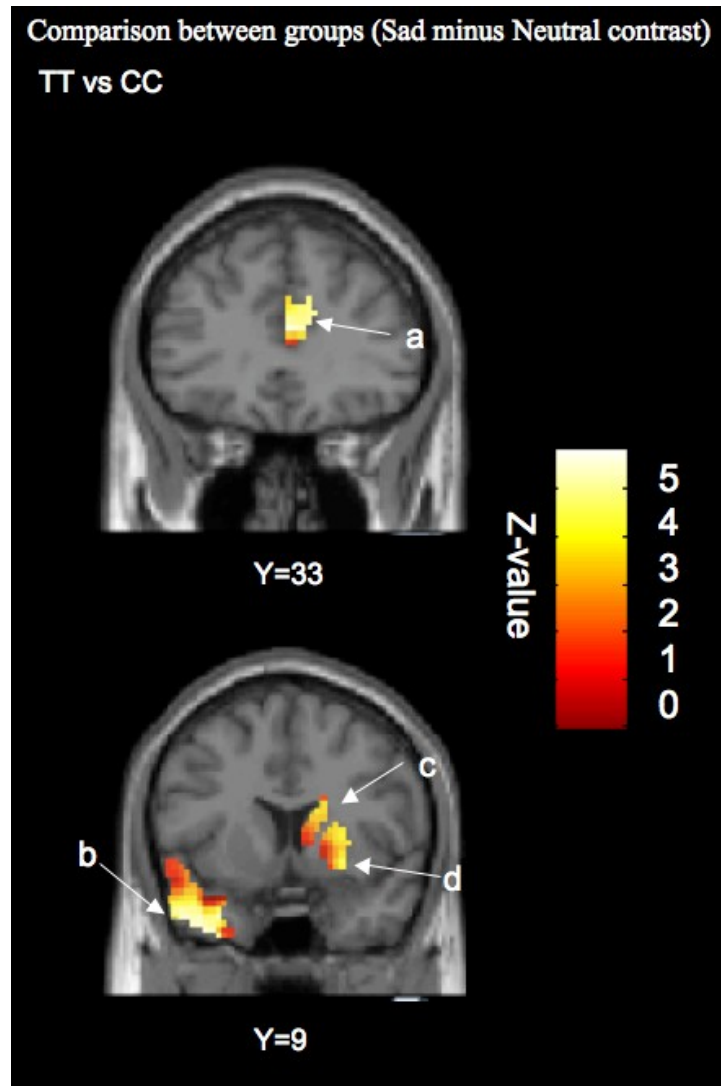


Figure 2. Images are coronal sections of the greater regional activity in the TT group vs. the CC group (sad minus neutral). Significant loci of activation were observed in (a) the right anterior cingulate cortex (BA 24/32), (b) the left anterior temporal pole (BA 21), (c) the right putamen, (d) the right caudate.

## Chapitre 4

# Discussion générale

1. Aperçu des résultats obtenus
2. Mise en perspective des résultats
3. Importance des résultats
4. Avenues futures

## **1. Aperçu des résultats obtenus**

Le but général des deux études proposées est d'accroître la compréhension de l'étiologie et de la pathophysiologie du TDM en étudiant comment deux polymorphismes génétiques sont associés à l'activation des corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Globalement, ces études visent à déterminer si les variations génétiques causant une susceptibilité aux troubles de l'humeur sont associées à des patrons d'activation cérébraux différents chez les enfants, tel qu'il l'a été observé chez les adultes.

Notre première étude montre que la tristesse transitoire est associée un patron d'activation des régions cérébrales différent chez les enfants porteurs de l'allèle court (S) comparativement aux enfants homozygotes pour l'allèle long (L) du 5-HTTLPR. En effet, nos résultats démontrent une augmentation de l'activation du putamen bilatéralement, du noyau caudé bilatéralement et de l'ACC droit chez les enfants porteurs de l'allèle S comparativement aux enfants homozygotes pour l'allèle L. Les tailles de l'effet du lien entre les allèles et activations des régions indiquent que l'allèle S a un impact modéré sur les corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Ces régions ont précédemment été associées à la tristesse normale et pathologique. Les résultats suggèrent donc que l'allèle S est associé à une altération fonctionnelle affectant des régions cérébrales impliquées dans les aspects expérientiel et physiologique des émotions, et plus particulièrement de la tristesse. Par ailleurs, une activation élevée dans ces régions est aussi remarquée chez des sujets dépressifs adultes lors de la présentation de stimuli tristes (Beauregard et al., 1998;

Garrett & Maddock, 2001; Surguladze et al., 2005). Par conséquent, le patron d'activation associé à l'allèle S se rapproche du patron d'activations noté dans le TDM.

Notre deuxième étude montre que le rs4675690, un polymorphisme situé près du gène CREB1, influence les corrélats neuronaux associés à la tristesse transitoire dans l'enfance. Les enfants homozygotes pour l'allèle T démontrent une plus grande activation cérébrale dans le putamen droit, le noyau caudé droit, l'ACC droit et le PTA gauche lors de l'expérience subjective de la tristesse comparativement aux enfants homozygotes pour l'allèle C. L'allèle T est donc associé à un patron d'activations cérébrales altéré dans des régions reconnues comme étant impliquées dans les émotions. Ces régions sont associées à la tristesse normale et pathologique. Notamment, une activation élevée du putamen, du noyau caudé et de l'ACC a été observée chez des adultes souffrant d'un TDM lors de la présentation de stimuli émotionnels (Beauregard, et al., 1998; Garrett & Maddock, 2001; Surguladze, et al., 2005). Les tailles d'effet des diverses régions activées dans la comparaison intergroupe indiquent que la présence de deux allèles T a un impact modéré sur les corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Ces résultats suggèrent que le polymorphisme rs4675690 produit des modifications fonctionnelles à un jeune âge. Ces modifications affectent des structures cérébrales impliquées dans les composantes subjective, cognitive et physiologique de la tristesse et du TDM.

## **2. Mise en perspective des résultats**

Le 5-HTTLPR serait relié à un niveau anormalement élevé d'anxiété (Du, Bakish, & Hrdina, 2000; Lesch et al., 1996; Mazzanti et al., 1998), une perturbation de l'humeur (Caspi et al., 2003; Malison et al., 1998) et à la sévérité de la dépression, de l'anxiété et de troubles psychiatriques variés (Eggers et al., 2003; Heinz et al., 2002; Willeit et al., 2000). Les individus porteurs d'au moins une copie de l'allèle S présentent une capacité réduite à gérer le stress et une plus grande susceptibilité à la dépression dans un contexte d'évènements de vie stressants (Caspi, Hariri, Holmes, Uher, & Moffitt, 2010; Caspi, et al., 2003). Ces observations ne sont pas surprenantes lorsque mises dans le contexte des résultats obtenus dans l'Étude 1. Ces résultats démontrent un patron d'activation altéré dans des régions qui régulent les réactions émotionnelles.

Le rôle du polymorphisme 5-HTTLPR est primordial dans la compréhension du débalancement chimique associé au TDM et dans le mécanisme d'action des agents pharmacologiques.

La force de l'activité de la 5-HT au niveau des récepteurs est inversement proportionnelle au nombre de ses molécules présentes dans l'espace synaptique. Les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (ISRS) bloquent la recapture de la 5-HT - à travers l'action des transporteurs de la 5-HT - et stimulent de façon globale la fonction sérotoninergique. La disponibilité et le potentiel de signalisation de la 5-HT relâchée serait régulés seulement à travers l'action du transporteur de la 5-HT (Sibille & Lewis, 2006). Le 5-HTTLPR est donc

un candidat pertinent pour expliquer les variations dans la réponse aux antidépresseurs. En effet, Murphy et collègues ont observé que les porteurs de l'allèle S ont une réponse plus pauvre aux ISRS (Murphy, Hollander, Rodrigues, Kremer, & Schatzberg, 2004).

Chez le rat, le niveau de transporteur de la 5-HT est à son plus élevé au début de la période périnatale et se stabilise à un niveau moins élevé dans le cerveau adulte (Galineau, Kodas, Guilloteau, Vilar, & Chalon, 2004). La 5-HT semble jouer un rôle critique dans le développement du circuit émotionnel dans le cerveau. Même une altération temporaire de l'homéostasie de la 5-HT durant le développement précoce semble modifier les connexions neuronales impliquées dans les troubles de l'humeur et causer une augmentation des comportements reliés à l'anxiété durant l'âge adulte (Ansorge, Zhou, Lira, Hen, & Gingrich, 2004; Gaspar, Cases, & Maroteaux, 2003; Gross & Hen, 2004).

Il est étonnant que les anomalies observées dans les corrélats neuronaux de la tristesse chez les porteurs de l'allèle S soient associées à une réduction génétique ancrée du fonctionnement du 5-HTT car, paradoxalement, dans un organisme mature l'effet des antidépresseurs ISRS serait aussi généré par une réduction de la fonction du 5-HTT. Ces agents pharmacologiques étant responsables de la diminution de symptômes anxieux et dépressifs, il est surprenant que dans le cas du 5-HTTLPR, une réduction de la fonction 5-HTT soit associée à un risque plus élevé de trouble de l'humeur (Ansorge, et al., 2004). Étant donné que la 5-HT agit comme agent trophique modulateur des processus développementaux tels que la division neuronale, la différenciation, la migration et la



synaptogénèse (Gaspar, et al., 2003), Gingrich et collègues ont émis l'hypothèse que les effets divergents de la pharmacologie adulte et l'inhibition génétique de la fonction du 5-HTT pourrait s'expliquer par des changements apparaissant durant la maturation du cerveau à un très jeune âge (Gingrich, Ansorge, Merker, Weisstaub, & Zhou, 2003). En inhibant temporairement le 5-HTT chez des souris tôt durant le développement, ces chercheurs ont montré que les souris affectées démontraient plus d'anomalies en termes de comportements émotionnels (Gingrich, et al., 2003). L'effet observé imitait le phénotype comportemental de souris génétiquement déficientes en expression 5-HTT. Ces données démontrent l'effet critique de la 5-HT dans la maturation des systèmes cérébraux qui module le fonctionnement émotionnel. Dans cette perspective, l'impact du 5-HTTLPR serait probablement plus important dans notre échantillon que dans la population adulte. Ceci expliquerait pourquoi plusieurs régions limbiques semblent affectées et pourquoi les tailles d'effet sont habituellement plus importantes dans les études chez les enfants.

Les résultats de l'Étude 1 supportent l'hypothèse proposée par Sibille et collègues (Sibille & Lewis, 2006) selon laquelle la susceptibilité au TDM à l'âge l'adulte est la résultante d'une fonction sérotoninergique altérée qui serait causée par un niveau du 5-HTT réduit chez les porteurs de l'allèle S durant un moment critique du développement. Cette altération interférerait avec la maturation normale de certains circuits neuronaux. Des circuits neuronaux altérés auraient un effet médiateur sur la vulnérabilité au TDM à l'âge adulte. Comme les porteurs de l'allèle S démontrent déjà des corrélats neuronaux de la tristesse différents à l'âge de 8 ans, il est possible que ces corrélats atypiques traduisent une

maturation anormale des régions préfrontales et limbiques impliquées dans la tristesse normale et le TDM. Il se peut aussi que le rs4675690 influence le développement de ces régions avant l'âge de 8 ans.

Le CREB aurait aussi un rôle dans l'étiologie et la pharmacothérapie du TDM (pour revue, voir Blendy, 2006; Sulser, 2002). Le CREB joue un rôle central dans la transcription du signal intracellulaire. Un niveau de CREB élevé chez les rongeurs a été associé à des comportements reliés aux antidépresseurs, et des études chez les rongeurs et les humains ont montré que le niveau du CREB est augmenté durant un traitement chronique par antidépresseurs (Blendy, 2006). Des changements dans la fonction CREB ont été associés à la pathophysiologie du TDM (Yamada, Yamamoto, Ozawa, Riederer, & Saito, 2003), le mécanisme de traitement des antidépresseurs (Dowlatshahi, MacQueen, Wang, & Young, 1998) et les comportements suicidaires (Dwivedi et al., 2003). De plus, une étude post-mortem récente a rapporté que les niveaux de CREB sont réduits dans le cortex de patients dépressifs, mais augmentés dans le cortex d'individus dépressifs traités aux antidépresseurs au moment du décès (Dowlatshahi, et al., 1998).

Il est largement accepté que des déséquilibres neurochimiques sous-tendent la pathophysiologie des troubles de l'humeur. Cependant, des études récentes démontrent des altérations structurelles se produisant en réaction au stress chez les individus souffrant du TDM (Duman, Heninger, & Nestler, 1997; Duman, Malberg, Nakagawa, & D'Sa, 2000; Manji, Moore, & Chen, 2000). En particulier, un stress prolongé aurait un impact sur le

nombre et la longueur des connexions dendritiques (Reagan & McEwen, 1997; Woolley, Gould, & McEwen, 1990). Une hypothèse neurotrophique a été formulée en rapport avec la pathophysiologie des troubles de l'humeur. Selon cette hypothèse, le TDM résulterait d'une dysfonction de la plasticité neuronale (Duman, 2002a).

Il est à noter que CREB est impliqué dans cette forme de plasticité (Weeber & Sweatt, 2002). Cette protéine joue probablement le rôle d'intégrateur central du signal pour un certain nombre de stimuli extracellulaires qui influencent la plasticité neuronale (Duman, 2002b). Une altération de la fonction CREB pourrait affecter négativement la plasticité adaptative qui est nécessaire pour répondre aux stress et autres stimuli extérieurs (Duman, 2002b). Le mécanisme d'action précis du rs4675690 étant toujours inconnu, il est difficile de déterminer son rôle exact dans la cascade d'action du CREB. Quoiqu'il en soit, il est concevable que les modifications au niveau des activations cérébrales observées dans l'Étude 2 puissent s'expliquer par un impact du rs4675690 sur la plasticité neuronale.

En 2003, Caspi et ses collègues ont utilisé une étude longitudinale prospective afin d'examiner la relation entre le 5-HTTLPR, le stress et la dépression. Ils ont trouvé une interaction significative entre le 5-HTTLPR et les événements de vie stressants dans le développement de la dépression. Ils ont aussi démontré une interaction avec la maltraitance durant l'enfance. Comme plusieurs études n'avaient pas réussi à démontrer un impact direct du 5-HTTLPR sur le développement d'un trouble de l'humeur, la communauté scientifique a vu un grand potentiel dans l'interaction gène X environnement (Holden, 2003). Les

résultats de deux récentes métaanalyses ne permettent pas de supporter l'hypothèse d'une telle interaction (Munafo, Durrant, Lewis, & Flint, 2009; Risch et al., 2009). Cependant plusieurs auteurs ont critiqué la méthodologie de ces études, notamment due au fait que toutes les études n'ont pas été incluses (5 à 14 études sur un total de 55) et à une surreprésentation des réplifications négatives (Karg, Burmeister, Shedden, & Sen, 2011). Une métaanalyse récente a cependant réussi à démontrer que le 5-HTTLPR a un effet modérateur dans la relation entre le stress et la dépression avec l'allèle S associé à une augmentation de la sensibilité au stress (Karg, et al., 2011). Les résultats des études décrites dans ce projet pourraient expliquer le mécanisme neuronal par lequel cette interaction est produite. Les enfants avec un patron d'activation cérébrale altéré pourraient avoir plus de difficulté à gérer le stress vécu dû à une altération des circuits neuronaux induite par les polymorphismes génétiques étudiés et donc ainsi être plus vulnérable au TDM.

Rutter et collègues ont suggéré qu'une quantité d'adversité environnementale durant le développement est nécessaire pour que l'individu apprenne à gérer les stressés et défis de la vie de tous les jours (Rutter, Kim-Cohen, & Maughan, 2006; Rutter, Moffitt, & Caspi, 2006). Cependant, certaines expériences dépassent la gamme des stressés environnementaux normaux et le fait de continuellement rencontrer ces expériences, à long terme compromet l'habileté d'un individu à répondre aux événements environnementaux de façon adaptée. Il est probable que le génotype d'un individu influence le canevas de comment un individu réagit au stress et détermine sa résilience aux stressés chroniques.

Être victime d'abus à l'enfance est un facteur de risque significatif pour la dépression à travers la vie entière (Charney & Manji, 2004; Heim et al., 2000). Cependant, tous les enfants abusés ne développent pas une dépression au cours de leur vie . La littérature scientifique suggère que la probabilité de développer une dépression suite à un abus serait influencée par des variations génétiques telles que le 5-HTTLPR (Caspi, et al., 2003; Kaufman et al., 2004). Quatre études indépendantes ont démontré une association entre le polymorphisme 5-HTTLPR et un risque de TDM chez des individus ayant été maltraités à l'enfance ou qui ont récemment subi un évènement de vie stressant; chez les enfants (Kaufman, et al., 2004), chez les adolescents (Eley et al., 2004) et chez les jeunes adultes (Cascinu et al., 2003; Kendler, Kuhn, Vittum, Prescott, & Riley, 2005). Les résultats de l'article appuient l'association entre le TDM et le 5-HTTLPR en offrant une compréhension du mécanisme biologique sous-tendant l'effet médiateur de l'adversité environnementale.

Les deux études faisant partie de cette thèse démontrent la pertinence de conduire des études d'imagerie génétique qui évaluent l'impact de polymorphismes spécifiques sur les maladies mentales complexes telles que le TDM. Ces études montrent que des polymorphismes distincts comme le 5-HTTLPR et le rs4675690 – dont les effets sont sous-tendus par des mécanismes biologiques totalement différents - peuvent avoir un impact assez comparable sur la variabilité interindividuelle des activations cérébrales associées à la tristesse, et donc être des facteurs de susceptibilité du TDM.

### **3. Importance des résultats**

Le TDM, qui fait partie des quatre grandes causes de handicap et de fardeau médical à travers le monde, est associé à des conditions médicales sérieuses et à la mortalité durant toutes les phases de la vie (Nemeroff & Owens, 2002; Wong & Licinio, 2001). Les résultats de nos deux études démontrent l'importance d'étudier l'impact des polymorphismes génétiques durant l'enfance.

Un des apports principaux de cette thèse est la démonstration d'un impact génétique sur les corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Jusqu'à présent, nous ignorions si la nature atypique des corrélats neuronaux associés à la tristesse se manifestait avant ou suite à l'apparition des symptômes dépressifs. Nos résultats suggèrent que ce phénomène apparaît durant la jeune enfance. Ces résultats supportent la notion d'un impact précoce des polymorphismes 5-HTTLPR et rs4675690 sur les régions cérébrales impliquées dans la tristesse et le TDM.

### **4. Avenues futures**

Des études récentes ont montré que le 5-HTTLPR contenait non pas deux mais trois allèles (s, La et Lg) (Hu et al., 2006) et que d'un point de vue biologique, l'allèle Lg agissait de façon similaire à l'allèle S (Praschak-Rieder et al., 2007). À ce sujet, Ehli et collègues (Ehli, Hu, Lengyel-Nelson, Hudziak, & Davies, 2011) ont démontré que le polymorphisme du 5-HTTLPR possède plus de variations que ce qui était précédemment décrit dans la littérature. Ehli et collègues ont trouvé trois nouvelles variations dont une plus courte que

l'allèle S (XS11) et deux plus longues que l'allèle L (XL17 et XL 18). L'impact fonctionnel de ces allèles sur le comportement et l'activité cérébrale demeure pour le moment inconnu. Ces questions feront sans doute l'objet d'études au cours des années à venir.

Une autre approche pouvant éclairer l'impact de la génétique sur la susceptibilité au TDM est l'étude d'interactions génétiques impliquant l'effet combiné de plusieurs gènes associés à ce trouble (Holmans et al., 2004; Kendler & Karkowski-Shuman, 1997). Utilisant une telle approche, Kaufman et collègues (Kaufman et al., 2006) ont conduit une étude dans laquelle ils ont étudié l'interaction du 5-HTTLPR et du gène BDNF (un gène associé à la dépression précoce) (Strauss et al., 2004). Ils ont trouvé qu'une interaction triple significative de ces deux gènes avec la maltraitance à l'enfance pouvait prédire le TDM. Les enfants avec l'allèle Met du BDNF et deux copies de l'allèle S avaient les scores les plus élevés de dépression. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet des interactions entre différents polymorphismes impliqués dans le TDM sur les corrélats neuronaux de la tristesse. Étant donné que le rs4675690 et le 5-HTTLPR ont des tailles d'effets modérées sur les différences au niveau des corrélats neuronaux de la tristesse, il est probable que les individus possédant les deux variations génétiques aient un patron d'activation encore plus fortement altéré en réponse à des stimuli tristes.

## **Conclusion**

---

Cette thèse visait à étudier, à l'aide d'un protocole d'imagerie génétique, l'impact de deux polymorphismes génétiques impliqués dans le trouble dépressif majeur (5-HTTLPR et rs4675690) sur les corrélats neuronaux de la tristesse durant l'enfance. Les résultats démontrent que ces deux polymorphismes sont associés, dès l'enfance, à une altération des activations cérébrales corrélées à l'expérience subjective de la tristesse. Ces résultats indiquent que les enfants porteurs des allèles associés à un plus grand risque de développer un TDM (allèle court du 5-HTTLPR, allèle T du rs4675690) ont des activations cérébrales atypiques dans les régions du cerveau sous-tendant la tristesse normale et pathologique.



## Bibliographie – Sources Documentaires

---

La bibliographie rassemble les références aux travaux cités dans l'introduction (Chapitre 1) et la discussion générale (Chapitre 4)

- Albert, B., Johnson, A., Lewis, J., & Raff, M. (2004). *Biologie moléculaire de la cellule* (4e ed.).
- Ansorge, M. S., Zhou, M., Lira, A., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2004). Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science*, *306*(5697), 879-881.
- APA. (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Bagshaw, M., Kimble, D., & Probram, K. (1965). The GSR of monkeys during orienting and habituation and after ablation of the amygdala, hippocampus and inferotemporal cortex. *Neuropsychologia*, *3*, 11-119.
- Ballenger, J. C. (1999). Current treatments of the anxiety disorders in adults. *Biol Psychiatry*, *46*(11), 1579-1594.
- Beauregard, M., Leroux, J. M., Bergman, S., Arzoumanian, Y., Beaudoin, G., Bourgouin, P., et al. (1998). The functional neuroanatomy of major depression: an fMRI study using an emotional activation paradigm. *Neuroreport*, *9*(14), 3253-3258.
- Bhatia, S. K., & Bhatia, S. C. (2007). Childhood and adolescent depression. *Am Fam Physician*, *75*(1), 73-80.
- Blendy, J. A. (2006). The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*, *59*(12), 1144-1150.  
10.1016/j.biopsych.2005.11.003
- Blier, P., & de Montigny, C. (1999). Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology*, *21*(2 Suppl), 91S-98S.
- Brody, A. L., Barsom, M. W., Bota, R. G., & Saxena, S. (2001). Prefrontal-subcortical and limbic circuit mediation of major depressive disorder. *Semin Clin Neuropsychiatry*, *6*(2), 102-112.
- Buchel, C., Morris, J., Dolan, R. J., & Friston, K. J. (1998). Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study. *Neuron*, *20*(5), 947-957.
- Cannon, W. B. (1927). The James-Lange theory of emotions: A critical examination and an alternative theory. *American Journal of Psychology*, *39*, 106-124.
- Cascinu, S., Giordani, P., Agostinelli, R., Gasparini, G., Barni, S., Beretta, G. D., et al. (2003). Pain and its treatment in hospitalized patients with metastatic cancer. *Support Care Cancer*, *11*(9), 587-592.
- Caspi, A., Hariri, A. R., Holmes, A., Uher, R., & Moffitt, T. E. (2010). Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits. *Am J Psychiatry*.

- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., et al. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*(5631), 386-389.
- Charney, D. S., & Manji, H. K. (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, *2004*(225), re5.
- Chua, P., Krams, M., Toni, I., Passingham, R., & Dolan, R. (1999). A functional anatomy of anticipatory anxiety. *Neuroimage*, *9*(6 Pt 1), 563-571.
- Cote, C., Beauregard, M., Girard, A., Mensour, B., Mancini-Marie, A., & Perusse, D. (2007). Individual variation in neural correlates of sadness in children: a twin fMRI study. *Hum Brain Mapp*, *28*(6), 482-487.
- Damasio, A. R., Grabowski, T. J., Bechara, A., Damasio, H., Ponto, L. L., Parvizi, J., et al. (2000). Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nat Neurosci*, *3*(10), 1049-1056.
- Davidson, R. J. (1998). Affective style and affective disorders: Perspective from affective neuroscience. *Cognition and Emotion*, *12*, 307-320.
- Davidson, R. J. (2000). Affective style, psychopathology, and resilience: brain mechanisms and plasticity. *Am Psychol*, *55*(11), 1196-1214.
- Davidson, R. J., & Irwin, W. (1999). The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends Cogn Sci*, *3*(1), 11-21.
- Davis, M., & Whalen, P. J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry*, *6*(1), 13-34.
- Devinsky, O., Morrell, M. J., & Vogt, B. A. (1995). Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain*, *118* (Pt 1), 279-306.
- Dolan, R. J., Fletcher, P., Morris, J., Kapur, N., Deakin, J. F., & Frith, C. D. (1996). Neural activation during covert processing of positive emotional facial expressions. *Neuroimage*, *4*(3 Pt 1), 194-200.
- Dougherty, D. D., Shin, L. M., Alpert, N. M., Pitman, R. K., Orr, S. P., Lasko, M., et al. (1999). Anger in healthy men: a PET study using script-driven imagery. *Biol Psychiatry*, *46*(4), 466-472.
- Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., & Young, L. T. (1998). Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *Lancet*, *352*(9142), 1754-1755.
- Drevets, W. C., Price, J. L., & Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Struct Funct*, *213*(1-2), 93-118.
- Drevets, W. C., & Raichle, M. (1998). Reciprocal suppression of regional cerebral blood flow during emotional versus higher cognitive processes: Implications for interaction between emotion and cognition. *Cogn Emotion*, *12*, 353-385.
- Drevets, W. C., Videen, T. O., Price, J. L., Preskorn, S. H., Carmichael, S. T., & Raichle, M. E. (1992). A functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci*, *12*(9), 3628-3641.

- Du, L., Bakish, D., & Hrdina, P. D. (2000). Gender differences in association between serotonin transporter gene polymorphism and personality traits. *Psychiatr Genet*, *10*(4), 159-164.
- Duman, R. S. (2002a). Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity. *Eur Psychiatry*, *17 Suppl 3*, 306-310.
- Duman, R. S. (2002b). Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry*, *7 Suppl 1*, S29-34.
- Duman, R. S., Heninger, G. R., & Nestler, E. J. (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, *54*(7), 597-606.
- Duman, R. S., Malberg, J., Nakagawa, S., & D'Sa, C. (2000). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry*, *48*(8), 732-739.
- Dwivedi, Y., Rao, J. S., Rizavi, H. S., Kotowski, J., Conley, R. R., Roberts, R. C., et al. (2003). Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*, *60*(3), 273-282.
- Eggers, B., Hermann, W., Barthel, H., Sabri, O., Wagner, A., & Hesse, S. (2003). The degree of depression in Hamilton rating scale is correlated with the density of presynaptic serotonin transporters in 23 patients with Wilson's disease. *J Neurol*, *250*(5), 576-580.
- Ehli, E. A., Hu, Y., Lengyel-Nelson, T., Hudziak, J. J., & Davies, G. E. (2011). Identification and functional characterization of three novel alleles for the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Mol Psychiatry*.
- Eley, T. C., Sugden, K., Corsico, A., Gregory, A. M., Sham, P., McGuffin, P., et al. (2004). Gene-environment interaction analysis of serotonin system markers with adolescent depression. *Mol Psychiatry*, *9*(10), 908-915.
- Ekman, P. (1994). All emotions are basic. In D. R. e. Ekman P. (Ed.), *The Nature of Emotions* (pp. 15-19). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Eugene, F., Levesque, J., Mensour, B., Leroux, J. M., Beaudoin, G., Bourgouin, P., et al. (2003). The impact of individual differences on the neural circuitry underlying sadness. *Neuroimage*, *19*(2 Pt 1), 354-364.
- Furmark, T., Fischer, H., Wik, G., Larsson, M., & Fredrikson, M. (1997). The amygdala and individual differences in human fear conditioning. *Neuroreport*, *8*(18), 3957-3960.
- Gabriel, M., Orona, E., Foster, K., & Lambert, R. (1982). Mechanism and generality of stimulus significance coding in a mammalian model system. *Advances in Behavioral Biology*, *26*, 535-567.
- Galineau, L., Kodas, E., Guilloteau, D., Vilar, M. P., & Chalon, S. (2004). Ontogeny of the dopamine and serotonin transporters in the rat brain: an autoradiographic study. *Neurosci Lett*, *363*(3), 266-271.
- Garrett, A. S., & Maddock, R. J. (2001). Time course of the subjective emotional response to aversive pictures: relevance to fMRI studies. *Psychiatry Res*, *108*(1), 39-48.
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci*, *4*(12), 1002-1012.

- George, M. S., Ketter, T. A., Gill, D. S., Haxby, J. V., Ungerleider, L. G., Herscovitch, P., et al. (1993). Brain regions involved in recognizing facial emotion or identity: an oxygen-15 PET study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 5(4), 384-394.
- George, M. S., Ketter, T. A., Parekh, P. I., Herscovitch, P., & Post, R. M. (1996). Gender differences in regional cerebral blood flow during transient self-induced sadness or happiness. *Biol Psychiatry*, 40(9), 859-871.
- George, M. S., Ketter, T. A., Parekh, P. I., Horwitz, B., Herscovitch, P., & Post, R. M. (1995). Brain activity during transient sadness and happiness in healthy women. *Am J Psychiatry*, 152(3), 341-351.
- Gingrich, J. A., Ansorge, M. S., Merker, R., Weisstaub, N., & Zhou, M. (2003). New lessons from knockout mice: The role of serotonin during development and its possible contribution to the origins of neuropsychiatric disorders. *CNS Spectr*, 8(8), 572-577.
- Glatt, C. E., & Freimer, N. B. (2002). Association analysis of candidate genes for neuropsychiatric disease: the perpetual campaign. *Trends Genet*, 18(6), 307-312.
- Gross, C., & Hen, R. (2004). The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci*, 5(7), 545-552.
- Hariri, A. R., & Weinberger, D. R. (2003). Imaging genomics. *Br Med Bull*, 65, 259-270.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stober, G., Riederer, P., Bengel, D., et al. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*, 66(6), 2621-2624.
- Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R., et al. (2000). Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA*, 284(5), 592-597.
- Heinz, A., Jones, D. W., Bissette, G., Hommer, D., Ragan, P., Knable, M., et al. (2002). Relationship between cortisol and serotonin metabolites and transporters in alcoholism [correction of alcoholism]. *Pharmacopsychiatry*, 35(4), 127-134.
- Holden, C. (2003). Behavioral genetics. Getting the short end of the allele. *Science*, 301(5631), 291-293.
- Holmans, P., Zubenko, G. S., Crowe, R. R., DePaulo, J. R., Jr., Scheftner, W. A., Weissman, M. M., et al. (2004). Genomewide significant linkage to recurrent, early-onset major depressive disorder on chromosome 15q. *Am J Hum Genet*, 74(6), 1154-1167.
- Hu, X. Z., Lipsky, R. H., Zhu, G., Akhtar, L. A., Taubman, J., Greenberg, B. D., et al. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*, 78(5), 815-826.
- Izard, C. (1992). Basic emotions, relations among emotions, and emotion-cognition relations. *Psychol Rev*, 100, 561-565.
- Izard, C. (1994). Intersystem connections. In Ekman P. (Ed.), *The Nature of Emotion: fundamental questions* (p.356-362). New York: Oxford Press.
- Izard, C. E. (1993). Four systems for emotion activation: cognitive and noncognitive processes. *Psychol rev*, 100(1), 68-90.
- James, W. (1981). *The principles of Psychology*. Cambridge: Harvard University Press.

- Karg, K., Burmeister, M., Shedden, K., & Sen, S. (2011). The Serotonin Transporter Promoter Variant (5-HTTLPR), Stress, and Depression Meta-analysis Revisited: Evidence of Genetic Moderation. *Arch Gen Psychiatry*, *68*(5), 444-454.
- Kaufman, J., Yang, B. Z., Douglas-Palumberi, H., Houshyar, S., Lipschitz, D., Krystal, J. H., et al. (2004). Social supports and serotonin transporter gene moderate depression in maltreated children. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(49), 17316-17321.
- Kaufman, J., Yang, B. Z., Douglas-Palumberi, H., Grasso, D., Lipschitz, D., Houshyar, S., et al. (2006). Brain-derived neurotrophic factor-5-HTTLPR gene interactions and environmental modifiers of depression in children. *Biol Psychiatry*, *59*(8), 673-680.
- Kendler, K. S., & Karkowski-Shuman, L. (1997). Stressful life events and genetic liability to major depression: genetic control of exposure to the environment? *Psychol Med*, *27*(3), 539-547.
- Kendler, K. S., Kuhn, J. W., Vittum, J., Prescott, C. A., & Riley, B. (2005). The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry*, *62*(5), 529-535.
- Ketter, T. A., Andreason, P., George, M., Marangell, L., PJ., P., & Post, R. (1993). *Reduced resting frontal lobe CBF in mood disorders (abstract)*. Paper presented at the American Psychiatric Association Annual Meeting.
- LaBar, K. S., Gatenby, J. C., Gore, J. C., LeDoux, J. E., & Phelps, E. A. (1998). Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron*, *20*(5), 937-945.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921.
- Lane, R. (2000). Neural correlates of conscious emotional experience. In R. Lane & L. Nadel (Eds.), *Cognitive Neuroscience of Emotion* (pp. 345-370). New York: Oxford University Press.
- Lane, R. D., Reiman, E. M., Ahern, G. L., Schwartz, G. E., & Davidson, R. J. (1997a). Neuroanatomical correlates of happiness, sadness, and disgust. *Am J Psychiatry*, *154*(7), 926-933.
- Lane, R. D., Reiman, E. M., Bradley, M. M., Lang, P. J., Ahern, G. L., Davidson, R. J., et al. (1997b). Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion. *Neuropsychologia*, *35*(11), 1437-1444.
- Lazarus, R. S. (1991). Cognition and motivation in emotion. *Am Psychol*, *46*(4), 352-367.
- Lesch, K. P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Greenberg, B. D., Petri, S., et al. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, *274*(5292), 1527-1531.
- Levesque, J., Joanette, Y., Mensour, B., Beaudoin, G., Leroux, J. M., Bourgouin, P., et al. (2003). Neural correlates of sad feelings in healthy girls. *Neuroscience*, *121*(3), 545-551.

- Liotti, M., Mayberg, H. S., Brannan, S. K., McGinnis, S., Jerabek, P., & Fox, P. T. (2000). Differential limbic--cortical correlates of sadness and anxiety in healthy subjects: implications for affective disorders. *Biol Psychiatry*, *48*(1), 30-42.
- Malison, R. T., Price, L. H., Berman, R., van Dyck, C. H., Pelton, G. H., Carpenter, L., et al. (1998). Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [123I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)tropine and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry*, *44*(11), 1090-1098.
- Manji, H. K., Moore, G. J., & Chen, G. (2000). Clinical and preclinical evidence for the neurotrophic effects of mood stabilizers: implications for the pathophysiology and treatment of manic-depressive illness. *Biol Psychiatry*, *48*(8), 740-754.
- Mayberg, H. S., Liotti, M., Brannan, S. K., McGinnis, S., Mahurin, R. K., Jerabek, P. A., et al. (1999). Reciprocal limbic-cortical function and negative mood: converging PET findings in depression and normal sadness. *Am J Psychiatry*, *156*(5), 675-682.
- Mazzanti, C. M., Lappalainen, J., Long, J. C., Bengel, D., Naukkarinen, H., Eggert, M., et al. (1998). Role of the serotonin transporter promoter polymorphism in anxiety-related traits. *Arch Gen Psychiatry*, *55*(10), 936-940.
- Mesulam, M. M. (1985). Patterns in behavioural neuroanatomy: association areas, the limbic system, and hemispheric specialization. In M. M. Mesulam, ed. (Ed.), *Principles of behavioral neurology* (pp. 1-70). Philadelphia: F. A. Davis Company.
- Mesulam, M. N. (2000). *Principles of Behavioral and Cognitive Neurology* (2nd ed. ed.). New York: Oxford University Press.
- Mitterschiffthaler, M. T., Ettinger, U., Mehta, M. A., Mataix-Cols, D., & Williams, S. C. (2006). Applications of functional magnetic resonance imaging in psychiatry. *J Magn Reson Imaging*, *23*(6), 851-861.
- Moldin, S. O., & Gottesman, II. (1997). At issue: genes, experience, and chance in schizophrenia--positioning for the 21st century. *Schizophr Bull*, *23*(4), 547-561.
- Munafo, M. R., Durrant, C., Lewis, G., & Flint, J. (2009). Gene X environment interactions at the serotonin transporter locus. *Biol Psychiatry*, *65*(3), 211-219.
- Murphy, G. M., Jr., Hollander, S. B., Rodrigues, H. E., Kremer, C., & Schatzberg, A. F. (2004). Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch Gen Psychiatry*, *61*(11), 1163-1169.
- Najib, A., Lorberbaum, J. P., Kose, S., Bohning, D. E., & George, M. S. (2004). Regional brain activity in women grieving a romantic relationship breakup. *Am J Psychiatry*, *161*(12), 2245-2256.
- Nemeroff, C. B., & Owens, M. J. (2002). Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci*, *5* Suppl, 1068-1070.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, *34*(1), 13-25.
- Pandya, D. N., Van Hoesen, G. W., & Mesulam, M. M. (1981). Efferent connections of the cingulate gyrus in the rhesus monkey. *Exp Brain Res*, *42*(3-4), 319-330.
- Paus, T., Koski, L., Caramanos, Z., & Westbury, C. (1998). Regional differences in the effects of task difficulty and motor output on blood flow response in the human

- anterior cingulate cortex: a review of 107 PET activation studies. *Neuroreport*, 9(9), R37-47.
- Perlis, R. H., Purcell, S., Fagerness, J., Cusin, C., Yamaki, L., Fava, M., et al. (2007). Clinical and genetic dissection of anger expression and CREB1 polymorphisms in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, 62(5), 536-540.
- Perlis, R. H., Purcell, S., Fava, M., Fagerness, J., Rush, A. J., Trivedi, M. H., et al. (2007). Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR\*D study. *Arch Gen Psychiatry*, 64(6), 689-697.
- Phan, K. L., Wager, T., Taylor, S. F., & Liberzon, I. (2002). Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage*, 16(2), 331-348.
- Phillips, M. L., Drevets, W. C., Rauch, S. L., & Lane, R. (2003). Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol Psychiatry*, 54(5), 504-514.
- Plomin, R., Owen, M. J., & McGuffin, P. (1994). The genetic basis of complex human behaviors. *Science*, 264(5166), 1733-1739.
- Plutchik, R. (1984). A general psychoevolutionary theory. In K. Scerer, Ekman, P., editors (Ed.), *Approaches to Emotion* (pp. 197-219). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum.
- Plutchik, R. (1994). *The Psychology and Biology of Emotion*. New York: Harper Collins.
- Power, M., & Dalgleish, T. (2008). *Cognition and emotion: from order to disorder* (2nd ed. ed.). New York: Psychology Press.
- Praschak-Rieder, N., Kennedy, J., Wilson, A. A., Hussey, D., Boovariwala, A., Willeit, M., et al. (2007). Novel 5-HTTLPR allele associates with higher serotonin transporter binding in putamen: a [(11)C] DASB positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*, 62(4), 327-331.
- Rauch, S. L., Savage, C. R., Alpert, N. M., Miguel, E. C., Baer, L., Breiter, H. C., et al. (1995). A positron emission tomographic study of simple phobic symptom provocation. *Arch Gen Psychiatry*, 52(1), 20-28.
- Reagan, L. P., & McEwen, B. S. (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat*, 13(3), 149-167.
- Reiman, E. M., Fusselman, M. J., Fox, P. T., & Raichle, M. E. (1989). Neuroanatomical correlates of anticipatory anxiety. *Science*, 243(4894 Pt 1), 1071-1074.
- Reiman, E. M., Lane, R. D., Ahern, G. L., Schwartz, G. E., Davidson, R. J., Friston, K. J., et al. (1997). Neuroanatomical correlates of externally and internally generated human emotion. *Am J Psychiatry*, 154(7), 918-925.
- Reiman, E. M., RD., L., Ahern, G., Schwartz, G., Davidson, R., & Yun, L. (1993). Neuroanatomical correlates of normal human emotion. *Soc Neurosci Abstr*, 19, 371.
- Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K. Y., Eaves, L., Hoh, J., et al. (2009). Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*, 301(23), 2462-2471.

- Rosby, S., & Sulser, F. (1997). Antidepressant: Events beyond the synapse. . In P. Skolnick (Ed.), *Antidepressant: New pharmacological strategies*. (pp. 195-212). Totowa, NJ: The Humana Press.
- Rutter, M., Kim-Cohen, J., & Maughan, B. (2006). Continuities and discontinuities in psychopathology between childhood and adult life. *J Child Psychol Psychiatry*, *47*(3-4), 276-295.
- Rutter, M., Moffitt, T. E., & Caspi, A. (2006). Gene-environment interplay and psychopathology: multiple varieties but real effects. *J Child Psychol Psychiatry*, *47*(3-4), 226-261.
- Rottenberg, J., Gross, J. J., Wilhelm, F. H., Najmi, S., & Gotlib, I. H. (2002). Crying threshold and intensity in major depressive disorder. *J Abnorm Psychol*, *111*(2), 302-312.
- Seminowicz, D. A., Mayberg, H. S., McIntosh, A. R., Goldapple, K., Kennedy, S., Segal, Z., et al. (2004). Limbic-frontal circuitry in major depression: a path modeling metanalysis. *Neuroimage*, *22*(1), 409-418.
- Sibille, E., & Lewis, D. A. (2006). SERT-ainly involved in depression, but when? *Am J Psychiatry*, *163*(1), 8-11.
- Strauss, J., Barr, C. L., George, C. J., King, N., Shaikh, S., Devlin, B., et al. (2004). Association study of brain-derived neurotrophic factor in adults with a history of childhood onset mood disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *131B*(1), 16-19.
- Sulser, F. (2002). The role of CREB and other transcription factors in the pharmacotherapy and etiology of depression. *Ann Med*, *34*(5), 348-356.
- Surguladze, S., Brammer, M. J., Keedwell, P., Giampietro, V., Young, A. W., Travis, M. J., et al. (2005). A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, *57*(3), 201-209.
- Teasdale, J. D., Howard, R. J., Cox, S. G., Ha, Y., Brammer, M. J., Williams, S. C., et al. (1999). Functional MRI study of the cognitive generation of affect. *Am J Psychiatry*, *156*(2), 209-215.
- Ustun, T. B., Cooper, J. E., van Duuren-Kristen, S., Kennedy, C., Hendershot, G., & Sartorius, N. (1995). Revision of the ICDH: mental health aspects. WHO/MNH Disability Working Group. *Disabil Rehabil*, *17*(3-4), 202-209.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, *291*(5507), 1304-1351.
- Viding, E., Williamson, D. E., & Hariri, A. R. (2006). Developmental imaging genetics: challenges and promises for translational research. *Dev Psychopathol*, *18*(3), 877-892.
- von dem Hagen, E. A., Passamonti, L., Nutland, S., Sambrook, J., & Calder, A. J. (2011). The serotonin transporter gene polymorphism and the effect of baseline on amygdala response to emotional faces. *Neuropsychologia*, *49*(4), 674-680.
- Weeber, E. J., & Sweatt, J. D. (2002). Molecular neurobiology of human cognition. *Neuron*, *33*(6), 845-848.



- Whalen, P. J. (1998). Fear, vigilance, and ambiguity: Initial neuroimaging studies of the human amygdala. *Curr. Directions Psychol. Sci.*, *1*, 177-188.
- Willeit, M., Praschak-Rieder, N., Neumeister, A., Pirker, W., Asenbaum, S., Vitouch, O., et al. (2000). [123I]-beta-CIT SPECT imaging shows reduced brain serotonin transporter availability in drug-free depressed patients with seasonal affective disorder. *Biol Psychiatry*, *47*(6), 482-489.
- Wong, M. L., & Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci*, *2*(5), 343-351.
- Woolley, C. S., Gould, E., & McEwen, B. S. (1990). Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res*, *531*(1-2), 225-231.
- Yamada, S., Yamamoto, M., Ozawa, H., Riederer, P., & Saito, T. (2003). Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *J Neural Transm*, *110*(6), 671-680.
- Zubenko, G. S., Hughes, H. B., 3rd, Maher, B. S., Stiffler, J. S., Zubenko, W. N., & Marazita, M. L. (2002). Genetic linkage of region containing the CREB1 gene to depressive disorders in women from families with recurrent, early-onset, major depression. *Am J Med Genet*, *114*(8), 980-987.

