HAL
open science

Relations entre méthylation de l'ADN et facteurs de risque des pathologies liées au stress, pathologies cardio-vasculaires, infectieuses et mentales : une étude épidémiologique

Estelle Sandt

To cite this version:

Estelle Sandt. Relations entre méthylation de l'ADN et facteurs de risque des pathologies liées au stress, pathologies cardio-vasculaires, infectieuses et mentales : une étude épidémiologique. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01732419

HAL Id: hal-01732419

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732419v1

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 27 octobre 2014, sur un sujet dédié à :

Relations entre méthylation de l'ADN et facteurs de risque des pathologies liées au stress, pathologies cardio-vasculaires, infectieuses et mentales :
une étude épidémiologique

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Estelle SANDT

né(e) le 3 septembre 1986

Membres du Jury

Président :
Madame Nathalie Thilly, Maître de Conférences - Praticien hospitalier, Faculté de Pharmacie de Nancy et CHU de Nancy

Juges :
Co-directeurs de thèse:
Monsieur Jonathan D. Turner, Responsable du groupe Psycho-immunologie – LNSI / CRP-Santé de Luxembourg
Madame Ndeye Coumba Ndiaye, Maître de Conférences – Faculté de Pharmacie de Nancy
Membre invité :
Madame Véronique Gillon, Directeur de la Recherche, Institut de cancérologie de Lorraine

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015

DOYEN
Francine PAULUS
Vice-Doyen
Francine KEDZIEREWICZ
Directeur des Etudes
Virginie PICHON
Président du Conseil de la Pédagogie
Brigitte LEININGER-MULLER
Président de la Commission de la Recherche
Christophe GANTZER
Président de la Commission Prospective Facultaire
Chantal FINANCE
Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle
Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS : Francine KEDZIEREWICZ
Responsable de la filière Officine : Béatrice FAIVRE
Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital : Béatrice DEMORE
Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. : Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. : Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES
Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES
Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES
Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES
Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES
Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	*82*	*Thérapie cellulaire*
Chantal FINANCE	*82*	*Virologie, Immunologie*
Jean-Louis MERLIN	*82*	*Biologie cellulaire*
Alain NICOLAS	*80*	*Chimie analytique et Bromatologie*
Jean-Michel SIMON	*81*	*Economie de la santé, Législation pharmaceutique*

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	*87*	*Santé publique*
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	*86*	*Pharmacologie*
Raphaël DUVAL	*87*	*Microbiologie clinique*
Béatrice FAIVRE	*87*	*Biologie cellulaire, Hématologie*
Luc FERRARI	*86*	*Toxicologie*
Pascale FRIANT-MICHEL	*85*	*Mathématiques, Physique*
Christophe GANTZER	*87*	*Microbiologie*
Frédéric JORAND	*87*	*Environnement et Santé*
Isabelle LARTAUD	*86*	*Pharmacologie*
Dominique LAURAIN-MATTAR	*86*	*Pharmacognosie*
Brigitte LEININGER-MULLER	*87*	*Biochimie*
Pierre LEROY	*85*	*Chimie physique*
Philippe MAINCENT	*85*	*Pharmacie galénique*
Alain MARSURA	*32*	*Chimie organique*
Patrick MENU	*86*	*Physiologie*
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	*86*	*Chimie thérapeutique*
Bertrand RIHN	*87*	*Biochimie, Biologie moléculaire*

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	*81*	*Pharmacie clinique*
Julien PERRIN	*82*	*Hématologie biologique*
Marie SOCHA	*81*	*Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique*
Nathalie THILLY	*81*	*Santé publique*

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	*87*	*Parasitologie*
Xavier BELLANGER	*87*	*Parasitologie, Mycologie médicale*
Emmanuelle BENOIT	*86*	*Communication et Santé*
Isabelle BERTRAND	*87*	*Microbiologie*
Michel BOISBRUN	*86*	*Chimie thérapeutique*
François BONNEAUX	*86*	*Chimie thérapeutique*
Ariane BOUDIER	*85*	*Chimie Physique*
Cédric BOURA	*86*	*Physiologie*
Igor CLAROT	*85*	*Chimie analytique*
Joël COULON	*87*	*Biochimie*
Sébastien DADE	*85*	*Bio-informatique*
Dominique DECOLIN	*85*	*Chimie analytique*
Roudayna DIAB	*85*	*Pharmacie galénique*
Natacha DREUMONT	*87*	*Biochimie générale, Biochimie clinique*
Joël DUCOURNEAU	*85*	*Biophysique, Acoustique*

ENSEIGNANTS (suite)	*Section CNU**	*Discipline d'enseignement*
Florence DUMARCAY	*86*	*Chimie thérapeutique*
François DUPUIS	*86*	*Pharmacologie*
Adil FAIZ	*85*	*Biophysique, Acoustique*
Anthony GANDIN	*87*	*Mycologie, Botanique*
Caroline GAUCHER	*85/86*	*Chimie physique, Pharmacologie*
Stéphane GIBAUD	*86*	*Pharmacie clinique*
Thierry HUMBERT	*86*	*Chimie organique*
Olivier JOUBERT	*86*	*Toxicologie, Hygiène sanitaire*
Francine KEDZIEREWICZ	*85*	*Pharmacie galénique*
Alexandrine LAMBERT	*85*	*Informatique, Biostatistiques*
Julie LEONHARD	*86*	*Droit en Santé*
Faten MERHI-SOUSSI	*87*	*Hématologie*
Christophe MERLIN	*87*	*Microbiologie*
Maxime MOURER	*86*	*Chimie organique*
Coumba NDIAYE	*86*	*Epidémiologie et Santé publique*
Francine PAULUS	*85*	*Informatique*
Caroline PERRIN-SARRADO	*86*	*Pharmacologie*
Virginie PICHON	*85*	*Biophysique*
Sophie PINEL	*85*	*Informatique en Santé (e-santé)*
Anne SAPIN-MINET	*85*	*Pharmacie galénique*
Marie-Paule SAUDER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Rosella SPINA	*86*	*Pharmacognosie*
Gabriel TROCKLE	*86*	*Pharmacologie*
Mihayl VARBANOV	*87*	*Immuno-Virologie*
Marie-Noëlle VAULTIER	*87*	*Mycologie, Botanique*
Emilie VELOT	*86*	*Physiologie-Physiopathologie humaines*
Mohamed ZAIOU	*87*	*Biochimie et Biologie moléculaire*
Colette ZINUTTI	*85*	*Pharmacie galénique*

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	*86*	*Sémiologie*

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	*11*	*Anglais*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Nathalie Thilly** qui a accepté de présider mon jury de thèse pour son soutien et pour ses précieuses explications concernant l'épidémiologie et l'organisation des unités de recherches.

Merci également à **Monsieur le Professeur Claude P. Muller** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet au sein du Laboratoire d'Immunologie du CRP-Santé à Luxembourg.

Je remercie **Monsieur le Docteur Jonathan Turner** pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'intégrant à votre équipe PsychoImmunologie et votre soutien tout au long de ce projet en tant que tuteur de stage puis directeur de thèse.

Merci à **Madame le Docteur Ndeye Coumba Ndiaye** pour votre aide précieuse sur ce projet et pour avoir accepté de co-diriger ma thèse.

Merci à **Madame le Docteur Véronique Gillon** pour m'avoir initié à la recherche clinique durant mon externat de Pharmacie à l'Institut de Cancérologie de Lorraine et d'avoir accepté d'être membre du jury.

Je souhaite également remercier les personnes avec lesquelles j'ai collaboré tout au long de ce projet,

au laboratoire d'Immunologie : Simone Witzmann, Lei Cao, Stéphanie Schmitz, Sophie Mériaux et Sophie Kirschner.

à l'Université de Luxembourg: Claus Vögele et Simone Witzmann.

à l'Université de Trèves : Mauro Larrá y Ramírez et Hartmut Schaechinger.

Pour terminer, je tiens à remercier ma mère pour son soutien tout au long de ce travail.

TABLE DES MATIERES

1 Section 1 : Introduction et situation du sujet 11

1.1 Présentation du CRP-Santé et LNS 11

1.1.1 Le CRP- Santé.....11

1.1.2 Le Département d'Immunologie 11

1.1.3 Le Groupe PsychoImmunologie 13

1.2 Contexte scientifique et rationnel de cette thèse 14

1.2.1 Epigénétique 14

1.2.2 Stress.....19

1.2.3 Early Life Adversity (ELA) 23

1.3 Progression d'une population de volontaires sains à des sujets ayant subi une ELA 27

2 Section 2: Etude Cold Pressor Study 29

1.1. Introduction 29

2.1 Méthodologie 30

2.1.1 Population de l'étude.....30

2.1.2 Protocole du test de stress: cold pressor test" (CPT) 30

2.1.3 Evaluation de la réponse au stress 31

2.1.4 Quantification de la méthylation.....31

2.1.5 Autres covariables mesurées 31

2.1.6 Analyses statistiques et data management 32

2.2 Résultats 33

2.2.1 Caractéristiques de la population de l'étude à baseline.....33

2.2.2 Analyse des données de méthylation 35

2.2.3 Effet du CPT (Réponse au stress) 37

2.2.4 Analyse bivariée 45

2.2.5 Analyse multivariée: 49

2.3 Discussion 54
3 Section 3 : Etude EpiPath 57
3.1 Scientific background - Rationnel, justification de l'étude.....57
3.2 Quels mécanismes pourraient expliquer cette relation? Objectif d'*EpiPath*59
3.3 Comment le montrer? Méthodologie de l'étude EpiPath 59
3.3.1 Design de l'étude 59
3.3.2 Population.....60
3.3.3 Evaluation de l'ELA 63
3.3.4 Analyse statistique 64
3.3.5 Soumissions réglementaires.....65
3.4 Réflexion sur les aspects méthodologiques.....66
3.4.1 Limites et biais.....66
4 Section 4 : Discussion et perspectives.....69
BIBLIOGRAPHIE 73
Annexes.....81

LISTE DE FIGURES

FIGURE 1: METHYLATION DE L'ADN 15
FIGURE 2: METHYLATION DE L'ADN ET MODIFICATION DES HISTONES 15
FIGURE 3 : CONSEQUENCE DE LA METHYLATION DES PROMOTEURS SUR LA TRANSCRIPTION DES GENES CORRESPONDANTS 16
FIGURE 4: ORGANISATION GENOMIQUE DU GENE DU GR 20
FIGURE 5: HYPOTHESE DE MECANISMES RELIANT L'ELA A UNE SUSCEPTIBILITE ACCRUE AUX CAMI 26
FIGURE 6: LIEN ENTRE L'ETUDE EPIPATH ET L'ETUDE CPT 28
FIGURE 7: SCHEMA DES DIFFERENTS TEMPS DE MESURE DE L'ETUDE CPT 30
FIGURE 9: HISTOGRAMMES DE LA VARIABLE 36
FIGURE 8: KERNEL DENSITY PLOTS OF 1F, 1H ET SOMME DE F ET 1H 36
FIGURE 10: LINEPLOTS AVEC INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% DE L'EVOLUTION DE LA PAS. 38
FIGURE 11: LINEPLOTS AVEC INTERVALLES DE CONFIANCE A 95% DE L'EVOLUTION AU COURS DU TEMPS DE LA PAS ET PAD PAR GENRE ET DANS LA POPULATION TOTALE 40
FIGURE 12: LINEPLOTS DE L'EVOLUTION DE PAS AVEC INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% DANS LE GROUPE CPT ET LE GROUPE CONTROLE PAR GENRE 41
FIGURE 13: DIAGRAMME EN BATONS DE L'AUGMENTATION DE PAS ET PAD PAR GROUPE DE RANDOMISATION ET PAR SOUS-GROUPE DE METHYLATION AVEC INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% 42
FIGURE 14: REPRESENTATION GRAPHIQUE D'UNE MATRICE DE CORRELATION ENTRE LES ITEMS DE L'ECHELLE TICS 43
FIGURE 15: VALEURS PROPRES D'UNE MATRICE DE CORRELATION 44
FIGURE 16 : DIAGRAMME DES VALEURS PROPRES DE LA MATRICE DE CORRELATION 45
FIGURE 17: SCATTERPLOT DES CORRELATIONS ENTRE LES COVARIABLES ISSUES DES ECHELLES D'EVALUATION SUBJECTIVE 46
FIGURE 18: SCATTERPLOT DE L'INDEX DE SOMATISATION (SI DSM-IV ET SI ICD-10) EVALUE VIA LES SYSTEMES DE CLASSIFICATION DSM-IV ET ICD 10, SOMATOFORM AUTONOMIC DYSFUNCTION (SAD) ET COMPLAINT INDEX (BI SOMA) 46
FIGURE 19: ACP FOCALISE DES TROUBLES SOMATOFORMES : LA VARIABLE VP.SI_ICD_10 CORRESPOND A L'INDEX DE SOMATISATION DANS LE SYSTEME DE CLASSIFICATION ICD10, LA VARIABLE VP.SAD_ICD_10 CORRESPOND A SOMATOFORM AUTONOMIC DYSFUNCTION , LA VARIABLE VP.BI_SOMA AU COMPLAINT INDEX ET LA VARIABLE VP.SI_DSM_IV A L'INDEX DE SOMATISATION DANS LE SYSTEME DE CLASSIFICATION DSM IV 47
FIGURE 20: CORRELATION ENTRE PAS (GAUCHE) ET PAD (DROITE) ET LE NIVEAU DE METHYLATION 48
FIGURE 21: REPRESENTATION DES RESIDUS DU MODELE MIXTE POUR LA PAS 54

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION, DONNEES EXPRIMEES PAR LEURS MOYENNES 34
TABLEAU II : CARACTERISTIQUES A BASELINE, MOYENNE, SD ET P VALUE DES T-TEST POUR LES VARIABLES QUANTITATIVES ET EFFECTIFS ET POURCENTAGES ET P VALUE DES TESTS DE PEARSON'S CHI-SQUARED POUR LA COMPARAISON DES VARIABLES CATEGORIELLES ENTRE LE GROUPE CPT ET LE GROUPE CONTROLE 34
TABLEAU III: REPARTITION SELON LE SEXE PAR GROUPE DE METHYLATION ET PAR GROUPE DE RANDOMISATION 36
TABLEAU IV: DIFFERENCES A BASELINE, AU NIVEAU DES EVALUATIONS SUBJECTIVES SELON LES GROUPES DE METHYLATION 37
TABLEAU V: PRESSION ARTERIELLE A BASELINE (PAS AND PAD) ET RYTHME CARDIAQUE (HR) DANS LES DEUX GROUPES CPT ET CONTROLE 38
TABLEAU VI: OSCILLATIONS MOYENNES DE PAS ET PAD ENTRE LES PERIODES DE REPOS ET LA PERIODE DE STRESS D'UNE PART ET ENTRE LA PERIODE DE STRESS ET LA PERIODE DE RECUPERATION D'AUTRE PART 39
TABLEAU VII: SCORES DES ECHELLES SUBJECTIVES DANS LE GROUPE TEST 42
TABLEAU VIII: CHANGEMENT DANS LES SCORES DES ECHELLES SUBJECTIVES APRES VERSUS AVANT LE CPT 43
TABLEAU IX : DISTRIBUTION DU SCORE GLOBAL BDI 44
TABLEAU X: COEFFICIENTS DE CORRELATION DE PEARSON ET P-VALUES DES T-TESTS ET TESTS DE CORRELATION 48
TABLEAU XI: ANOVA DE L'AUGMENTATION DE LA PAS DE LA PERIODE DE REPOS INITIALE (BASELINE) AU PIC DURANT LE CPT. 50
TABLEAU XII: ANOVA DE LA DIMINUTION DE PAS DU PIC ATTEINT DURANT LE CPT A LA VALEUR MOYENNE AU COURS DE LA PERIODE DE RECUPERATION 50
TABLEAU XIII: ANOVA SUR MESURES REPETEES POUR PAS; P VALUES SONT AJUSTEES APRES TEST POST HOC TUKEY 51
TABLEAU XIV: ANOVA SUR MESURES REPETEES POUR PAD, P VALUES AJUSTEES APRES TEST POST HOC DE TUKEY 52
TABLEAU XV: RESULTATS DU MODELE MIXTE POUR LA VARIABLE DEPENDANTE PAS 53
TABLEAU XVI: RESULTATS DU MODELE MIXTE POUR VARIABLE DEPENDANTE PAD 53
TABLEAU XVII: ASSOCIATIONS ADOPTION AGREEES AU LUXEMBOURG 61

RESUME

L'expression des gènes est régulée en partie par de nombreux mécanismes endogènes, mais également par des facteurs environnementaux. Les modifications épigénétiques représentent la principale interface entre le génome et l'environnement (Fraga, M 2005)(Szyf, M 2011a)(Szyf, M 2011b). La méthylation de l'ADN constitue sans doute le mécanisme épigénétique le mieux connu. Le profil de méthylation de l'ADN d'un individu est susceptible de subir des modifications induites par des facteurs environnementaux tout au long de la vie.

Compte tenu de son implication dans la régulation de la transcription et l'inactivation des gènes (Bird, A 2007), la méthylation de l'ADN pourrait jouer un rôle clé dans l'apparition de différentes maladies, incluant les maladies liées au stress.

Le Département d'Immunologie du Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) de Luxembourg a acquis une expérience considérable dans le domaine de l'épigénétique, en particulier concernant les gènes impliqués dans la réponse au stress ainsi que dans la conduite d'études cliniques. Mon stage de Master 2 au sein de ce Département, m'a permis de travailler sur deux études portant sur le niveau de méthylation de l'ADN.

L'étude "Cold Pressor Test" a montré un lien entre la réponse à un stress induit par un test validé - le Cold Pressor Test - et la méthylation du gène du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Durant mon stage, je me suis chargée de l'analyse des données de cette étude.
Ces résultats ainsi que ceux d'études précédentes menées par le groupe PsychoImmunologie du CRP-Santé ont conduit à l'élaboration du protocole de l'étude "Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity" (EpiPath). EpiPath analysera l'impact des maltraitances subies durant la petite enfance, ou "Early Life Adversity" (ELA) sur les facteurs de risque de problèmes de santé publiques majeurs: maladies cardiovasculaires, mentales, du système immunitaire et altération de la réponse au stress. Ces pathologies sont multifactorielles, c'est-à-dire que leur développement est sous l'influence de facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux et aussi certainement des interactions entre ces différents facteurs. Le lien entre des antécédents d'ELA et la survenue de ces pathologies ayant déjà été mis en évidence, l'objectif de cette étude est de fournir une meilleure compréhension de l'impact de l'ELA sur la méthylation de l'ADN et les conséquences cliniques.

Mots clés: épigénétique, réponse au stress, étude clinique exploratoire, analyse de données, dossiers de soumission

ABSTRACT

Gene expression is regulated by a wide range of mechanisms including endogenic mechanisms and external environmental factors. Epigenetic factors are considered to be the principal interface between the genome and the environment (Fraga, M 2005) (Szyf, M 2011a) (Szyf, M 2011b). Among these mechanisms DNA methylation is probably the best understood. Moreover the DNA methylation pattern is susceptible to modifications induced by environmental factors

Taking into account its implication in the regulation of gene transcription and silencing (Bird, A 2007), DNA methylation may also play a critical role in the development of various diseases including stress related disorders..

The Department of Immunology of the "Centre de Recherche Public de la Santé" (CRP-Santé) in Luxembourg has gained considerable experience in clinical studies as well as in epigenetics, especially concerning stress response genes. I had the opportunity to pursue my Master internship in this Department working on two academic exploratory studies projects related to the link between DNA methylation and stress response.

First, I was responsible for the data analysis of the "Cold Pressor Test" study. This study demonstrated the association between the stress response induced by a validated stress test: the Cold Pressor Test, and the methylation of the glucocorticoid receptor (GR) gene.

These results, together with previous non clinical studies lead the PsychoImmunology team to design the "Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity" (EpiPath) study. EpiPath will examine the impact of Early Life Adversity (ELA) on the potential risk factors of major public health problems: cardiovascular, mental, immune system diseases and stress response alterations. These are multifactorial diseases meaning that these conditions development depends on the presence of genetics, epigenetics and environmental factors. The link between ELA and those pathologies in adulthood is already settled and the aim of this present study is to provide a better understanding of the impact of ELA on epigenetic methylation and on its clinic consequences.

Keywords: epigenetic, stress response, clinical exploratory study, data analysis, regulatory submission

LISTE DES ABREVIATIONS

BDI	Beck Depression Inventory
CAMI	CArdiovascular-Mental health-Immune
CNER	Comité National d'Ethique de Recherche
CNPD	Commission nationale pour la protection des données
CPT	Cold Pressor Test
CRP	Centre de Recherche Public
CTQ	Childhood Trauma Questionnaire
PAD	Diastolic Blood Pressure
DMR	Differentially Methylated Regions
DNMT	DNA Methyltransferase
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
ELA	Early Life Adversity
EpiPath	Long term epigenetic and physiological effets of early life adversity
EWAS	Epigenom wide association studies
GC	Glucocorticoid
GR	Glucocorticoid receptor
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HR	Heart Rate
ICD	International Classification of Diseases
IMC	Indice de Masse Corporelle
MAP	Mean Arterial Pressure
MeDIP-Seq	Methyl-DNA Immunoprecipitation-Sequencing
PAS	Pression Artérielle Systolique
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
RC	Rythme Cardiaque
SAD	Somatoform Autonomic Dysfunction
SECPT	Socially Evaluated Cold Pressor Test
SI	Somatisation Index
SLST	Standardised Laboratory Stress Test
SNA	Système Nerveux Autonome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TICS	Trier Inventory for Chronic Stress
UID	identifiant unique attribué à chaque participant
URTI	Upper Respiratory Tract Infections
VIF	Variance inflation factor

INDEX

CPT: test standardisé et validé permettant d'évaluer la réponse au stress, par l'intermédiaire d'un facteur de stress physique (Lovallo 1975) (McRae 2006) (Porcelli 2014). Il consiste en l'immersion de la main d'une personne dans de l'eau glacée.

ELA : Les maltraitances subies durant l'enfance ou "Early Life Adversity" regroupent l'ensemble des conditions délétères subies durant les premières années de vie. Cinq types de maltraitances sont généralement décrits: abus d'ordre émotionnel, physique, abus sexuel, négligences d'ordre émotionnel ou physique (Spitzer, C 2013)

EWAS : ce type d'étude porte sur le profil épigénétique d'une population et évalue le degré d'association entre les modifications épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN, et un caractère ou une maladie.

GWAS : Genome-wide association studies : étude d'association pangénomique visant à identifier les variants fréquents qui pourraient avoir un effet sur le risque de maladie. Ces études reposent sur le principe suivant: criblage de l'ensemble du génome de personnes malades afin d'identifier des marqueurs de variation génétique (SNPs) puis compaaison de leur génome à celui de population contrôle. L'étude peut rélèver une association ou permettre d'identifier un gène de susceptibilité, de protection ou une séquence régulatrice, si un allèle est plus fréquemment retrouvé dans la population malade que dans la population saine.
La limite de ces études est lié au problème du test multiple, dans la mesure où de nombreux tests sont réalisés. Il faut en tenir compte dans le choix du seuil de signification pour rejeter l'hypothèse nulle de non association. (Spitzer, C 2013)

AVANT PROPOS

A l'issue de mon cursus de Pharmacie et dans le cadre du Master 2 en méthodologie et statistiques appliqués à la recherche biomédicale que j'ai suivi au cours de l'année scolaire 2012/2013, j'ai eu l'opportunité de rejoindre le Département d'Immunologie du Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) de Luxembourg pour un stage de 7 mois.
Les deux projets qui m'ont été confiés au cours de ce stage, ont servi de base de réflexion à cette thèse de Pharmacie. Il s'agit de deux études exploratoires, portant sur les relations existant entre l'une des principales modifications épigénétiques régulant l'expression des gènes : la méthylation et la survenue de différentes pathologies. On s'est intéressé exclusivement, d'une part aux maladies liées au stress et d'autre part aux maladies cardiovasculaires, maladies mentales et infections du tractus respiratoire supérieur et immunocompétence réduite regroupées sous l'appellation "CAMI". Etant donné que ces études étaient à des stades d'avancement très différents, j'ai eu l'opportunité de participer aux principaux aspects de la gestion de projet, en m'intéressant à :

- l'analyse des données brutes de la première étude : "Cold Pressor Test",
- la finalisation du protocole, les préparations des demandes d'autorisations réglementaires et la rédaction de procédures de la seconde étude: "EpiPath".

Les données de méthylation de l'ADN ainsi que les données reflétant la réponse au stress sont mesurées de façon similaire dans ces deux études. Ainsi, la méthode utilisée pour la première étude a contribué en grande partie à la rédaction du plan d'analyse statistique de la seconde.
L'hypothèse sur laquelle reposent ces deux études est la suivante: le niveau de méthylation de l'ADN du gène du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) pour la première, et le niveau global de méthylation pour la seconde étude, seraient associés à une modification de la réaction de l'organisme confronté à un stress et à une augmentation de la susceptibilité à certaines pathologies.

Ainsi après avoir présenté la structure dans laquelle ce travail a été mené, le rationnel de ces deux études sera précisé dans une deuxième partie, en s'appuyant sur l'état des connaissances actuelles. L'analyse des relations entre méthylation et réponse au stress (résultats de l'étude "Cold Pressor Test") fera l'objet d'une troisième partie. Dans une quatrième partie, sera étudiée la relation entre des maltraitances subies durant l'enfance, ou "Early Life Adversity" (ELA) et une susceptibilité accrue aux pathologies cardio-vasculaires, immunologiques et mentales à l'âge adulte.

1 SECTION 1 : INTRODUCTION ET SITUATION DU SUJET

1.1 Présentation du CRP-Santé et LNS

1.1.1 Le CRP- Santé

Le Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) de Luxembourg est une institution publique reconnue par la communauté scientifique internationale pour son excellence dans le domaine de la recherche biomédicale et de la santé publique. Le CRP-Santé collabore notamment avec les centres de recherches, les universités, les professionnels de santé et les hôpitaux reconnus à l'échelle nationale et internationale.

En se positionnant comme acteur principal dans le domaine de la recherche biomédicale, le CRP a pour ambition de devenir la source principale d'informations en santé pour les autorités nationales et européennes.

Les activités du CRP Santé sont organisées en 5 départements de recherche:

- Maladies cardiovasculaires
- Immunologie
- Oncologie
- Santé Publique
- Virologie, Allergologie, Immunité.

1.1.2 Le Département d'Immunologie

Sous la direction du Professeur Claude P. MULLER, le Département d'Immunologie, créé en 1992, est à la fois un département du CRP-Santé et du Laboratoire National de Santé (LNS).

Ses 4 objectifs principaux sont:

- La surveillance des maladies infectieuses provoquées par des virus : le principal objectif est de contribuer à la compréhension de la distribution géographique, des variants génétiques, de la variabilité et de l'histoire naturelle des virus.
- Le développement de stratégies de vaccination : l'expérience du Département d'Immunologie historiquement acquise par le développement de stratégies vaccinales ciblant la rougeole est utilisée dans l'objectif d'explorer les stratégies immuno-prophylactiques contre les substances cancérigènes.
- L'immunologie psycho-endocrinienne du stress : en étroite collaboration avec un département d'enseignement supérieur en psychobiologie de l'Université de Trèves, le Département d'Immunologie correspond également avec six départements dans le cadre de la recherche sur les aspects liés au stress, des molécules aux fonctions cognitives.
- L'enseignement et la formation : des enseignements et un programme de formation destinés aux doctorants et les étudiants du premier cycle sont dispensés.

Les principaux axes de recherche du Département d'Immunologie sont :

- La surveillance des nouveaux virus et variants génétiques
- La diversité génétique et antigénique des virus humains et vétérinaires
- L'évolution moléculaire et la pathogénie des virus de la grippe humaine, aviaire et porcine
- Les stratégies d'immunisation contre les virus et les facteurs de risque environnementaux (par exemple carcinogènes)
- La structure génique, les régulations transcriptionnelles et traductionnelles du récepteur aux glucocorticoïdes (et d'autres récepteurs nucléaires) et le rôle majeur qu'il joue, en tant que médiateur, dans la réponse au stress
- La programmation épigénétique du système immunitaire pendant la période périnatale.

Les domaines d'application correspondants sont :

- L'identification de nouveaux variants viraux humains, vétérinaires et zoonotiques, et comprendre leur diversité génétique et antigénique, leurs conséquences pour la surveillance, leurs interactions virus/hôte et leur pathogénicité
- L'analyse des problèmes de santé publique liés aux maladies infectieuses chez l'homme, ainsi que chez les animaux
- La compréhension des mécanismes transcriptionnels, traductionnels et post-traductionnels des médiateurs de la réponse au stress sur le système immunitaire, et l'interaction entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien
- La compréhension de la place et du rôle de la méthylation de l'ADN dans la programmation périnatale du système immunitaire
- La compréhension des mécanismes des vaccins, l'efficacité des vaccins existants et développer de nouvelles stratégies vaccinales.

Le Département d'Immunologie est composé d'une équipe d'environ 35 scientifiques, ingénieurs et techniciens, étudiants en thèse et en Master, ainsi que d'autres personnes rattachées aux services support. Avec environ 15 à 20 publications scientifiques internationales par an dont 28 uniquement en 2011 et 60 à 80 contributions à des conférences, ce Département est parmi les plus productifs en recherche biomédicale au Luxembourg. Plus de 220 publications ont été rédigées par le Groupe, dont 165 en virologie notamment dans des revues à facteur d'impact élevé comme The Lancet, Nature, Emerging Infectious Diseases, The Journal of Infectious Diseases. 50 publications ont porté sur la vaccination et 23 sur le secteur de la recherche sur le stress.

Le Département d'Immunologie représente l'un des 3 centres de référence mondiaux de la rougeole et de la rubéole pour 22 pays européens.

35 étudiants en thèse et 20 étudiants en médecine ont réalisé une partie de leur formation au sein du Département d'Immunologie. 67% des étudiants en thèse ont poursuivi une carrière de recherche académique ou institutionnelle et 30% se sont orienté vers l'industrie.

Le Département possède des équipements parmi les plus novateurs, constituant ainsi un environnement stimulant pour les étudiants désirant réaliser une thèse

pour développer leur propre projet scientifique. Les équipements de pointe permettent l'utilisation de nombreuses techniques modernes en science de la vie / biotechnologies.

1.1.3 Le Groupe PsychoImmunologie

Les projets décrits dans cette thèse constituent des axes de recherche du Groupe PsychoImmunologie du Département d'Immunologie. Cette équipe a été créée en 2003 suite à la nomination du Professeur C.P. Muller à la Présidence du Département de PsychoBiologie de l'Université de Trier. Au cours des 10 dernières années, le Groupe a acquis une expérience considérable dans le contrôle de la transcription et les effets du récepteur aux glucocorticoïdes. Depuis la mise en évidence initiale de l'influence de l'environnement sur la méthylation de l'ADN contrôlant l'expression du gène du récepteur aux glucocorticoïdes chez le rat, le Groupe a montré qu'une structure semblable de ce gène existe chez l'humain (Turner and Muller 2005). Des recherches complémentaires ont également montré la susceptibilité à la méthylation de l'ensemble de l'îlot CpG en amont du premier exon (promoteur actif) de ce gène chez l'humain (Turner, Pelascini, and Macedo 2008). Par ailleurs, il a été montré que l'expression du premier exon est altérée dans les syndromes dépressifs majeurs ou major depressive disorders (MDD), a priori indépendamment de tout phénomène épigénétique (Alt, SR *et al* 2010).

Le gène du GR présente plusieurs promoteurs et exons distincts. Récemment, l'étude des mécanismes contribuant à l'activation du promoteur 1F a conduit le Groupe à montrer que le facteur de transcription E2F1 joue un rôle important dans l'activation du promoteur (Alt, SR *et al* 2010) et que le niveau global de méthylation du promoteur est vraisemblablement plus important que le niveau de dinucleotides CpG (Cao-Lei, L *et al* 2013).

Une étude portant sur le rôle du GR dans la fibromyalgie a été conduite en partenariat avec l'Université de Trèves et a donné lieu à de nombreuses publications dans des revues scientifiques de premier ordre(Macedo, JA *et al* 2007)(Macedo, JA *et al* 2008). Une étude sur l'importance du GR dans les MDD réalisée en post-mortem à partir de cerveaux humains a récemment été publiée (Alt, SR *et al* 2010). L'analyse de données d'une étude récente (CNER No 201001/02 V1.1) a été débutée dernièrement. Focalisé sur les mécanismes moléculaires qui régissent l'activité du GR, le Groupe a publié 15 articles dans des revues scientifiques à comité de lecture au cours des 6 dernières années. Jusqu'à présent, sept étudiants ont obtenu leur Doctorat (4 Summa cum Laude, 3 Magna cum Laude) au sein du Groupe PsychoImmunologie et trois étudiants réalisent actuellement leur Doctorat en PschoImmunologie.

1.2 Contexte scientifique et rationnel de cette thèse

1.2.1 Epigénétique

Le génome est composé de séquences transcrites et traduites : **les exons**, représentant environ 1% (Ng SB, Turner EH 2009) de la taille du génome et de séquences intercalées entre les exons, qui sont transcrites en ARN mais non traduites en protéine: **les introns**, représentant 25% du génome. La très grande majorité du génome est donc constituée de séquence non codante. Il s'agit en particulier de régions régulatrices, comprenant notamment les **promoteurs** des gènes, situés à l'extrémité 5'. Ces régions, qui ne seront pas elles-mêmes transcrites, sont néanmoins indispensables à la transcription des gènes (Griffiths, A. JF *et al* 2001). Certains gènes, comme celui codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes, possèdent plusieurs promoteurs d'importance inégale et plusieurs sites d'initiation de la transcription.

L'**épigénétique,** définie initialement en 1940 par Conrad Waddington comme « une nouvelle science visant à étudier les mécanismes par lesquels le génotype engendre le phénotype » (Waddington C, *et al* 1942), suscite un intérêt croissant auprès de la communauté scientifique.

Par la suite, dans les années 1970, Riggs, AD et Holliday, R ont proposé une deuxième signification pour le concept d'épigénétique, en tant qu'ensemble des facteurs contribuant au contrôle de l'expression des gènes par méthylation de l'ADN ou modifications des composants de la chromatine (Riggs AD, *et al* 1975)(Holliday R , *et al* 1975). Les définitions plus récentes précisent cette notion sans la remettre en cause. Il s'agit par exemple de celle de Wollfe, définissant l'épigénétique comme l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN (Wollfe AP, *et al* 1999).

Ces modifications impliquées dans la transcription des gènes participent au contrôle de l'épissage alternatif et à la production d'isoformes particuliers (Egger, G, *et al* 2004). Par conséquent, ces mécanismes jouent un rôle majeur dans la différenciation cellulaire. De plus, il a été démontré que les modifications épigénétiques représentent des mécanismes stables et héréditaires (Egger, G *et al* 2004)(Russo, VEA, *et al* 1996).

L'environnement peut également exercer une influence sur l'activité des gènes en modulant les variations épigénétiques (Varmuza, S 2003). Ainsi, les facteurs épigénétiques sont considérés comme la principale interface entre le génome et l'environnement (Fraga, M, *et al* 2005)(Szyf, M, *et al* 2011a)(Szyf, M, *et al* 2011b).

Selon Meaney, et al., certaines variations constatées entre les populations induites par des facteurs environnementaux pourraient trouver leur origine dans des mécanismes épigénétiques (Meaney, M, *et al* 2005).

Trois principaux types de modifications épigénétiques sont susceptibles d'intervenir et d'interagir au niveau cellulaire conduisant à l'inactivation des gènes concernés. Il s'agit de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones appelés acétylations et des modifications touchant l'ARN (Cao-Lei, *et al* 2013). Annexe 1.

La **méthylation de l'ADN**, modification épigénétique largement décrite et sans doute la mieux connue, (Jones, P, *et al* 2012)(G Li, DR, *et al* 2011) consiste en l'ajout de groupement méthyl sur la séquence d'ADN. Cette fixation est hautement spécifique et intervient toujours au niveau d'une cytosine directement liée à une guanine par un phosphate, appelé un "site CpG" ou "dinucléotide CpG" (Egger, G, *et al* 2004)(Lister, R, *et al* 2009) (Figure 1).

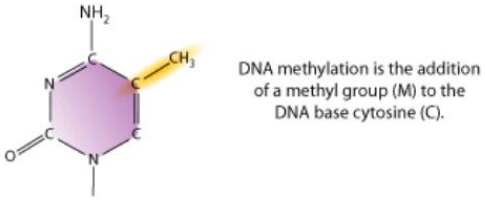


Figure 1: Méthylation de l'ADN (Siroux, V 2013)

La fréquence de ces dinucléotides CpG à travers le génome est relativement faible. Ils sont généralement regroupés en clusters ou "CpG island". En général, ces CpG islands sont de petites régions génomiques d'une longueurs variant de 200 à 3 000 paires de bases en moyenne et la majorité des 11 millions de CpG se situent au sein des 25 000 CpG islands (Lister, R 2009). Les CpG islands, généralement localisés dans les promoteurs, sont majoritairement non méthylés (MA, G.-S 1983). En principe, la méthylation des cytosines dans les régions promotrices d'un gène est associée à une altération des interactions entre le gène et la machinerie cellulaire impliquée dans la transcription, conduisant à l'inactivation des gènes (PeterW., L. 2010). (Figure 2).

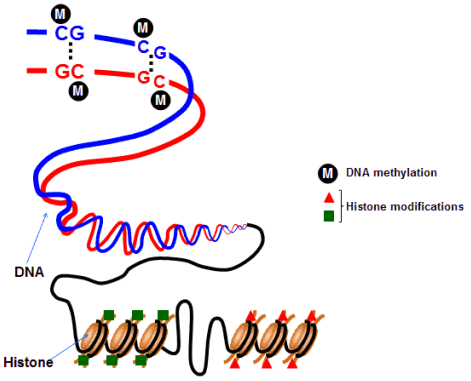


Figure 2: Méthylation de l'ADN et modification des histones

En effet une corrélation négative a été démontrée entre le niveau de méthylation d'un CpG island et le niveau de transcription des gènes associés (J Bell, A.P

2011) comme l'illustre la figure 3. En général les CpG islands sont localisés à l'extrémité 5' des gènes (Bird, A 1987).

Au contraire, un niveau de méthylation élevé au niveau du corps du gène ou " **gene body**", conduit à la transcription de ce gène (Jones, P. *et al* 1999)(Chess, A.H.A., *et al* 2007)(Ball, MP. *et al* 2009). Physiologiquement les niveaux de méthylation sont élevés au niveau des "gene body" et faibles au niveau des régions régulatrices telles que les promoteurs (G Li, DR *et al* 2011).

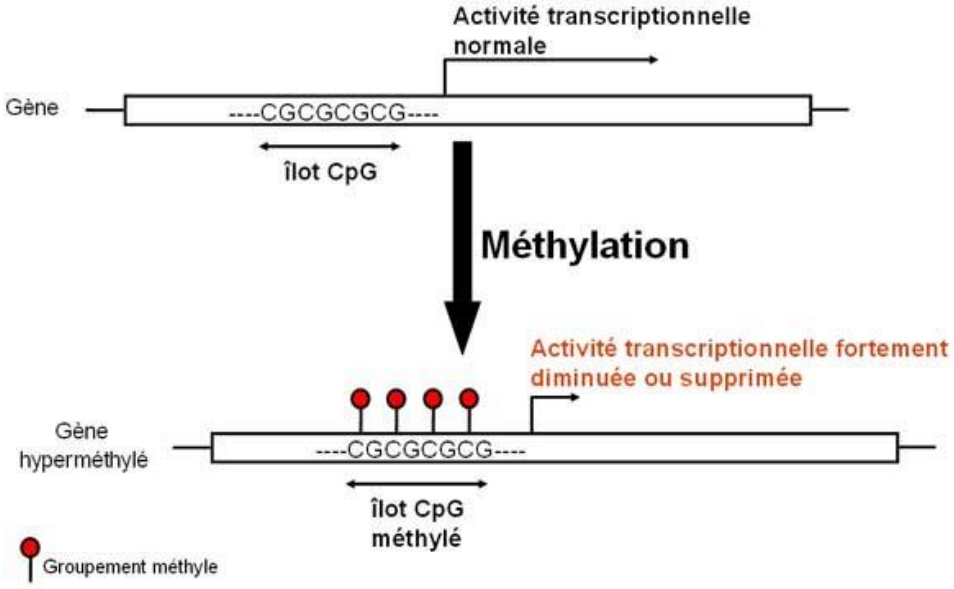


Figure 3 : conséquence de la méthylation des promoteurs sur la transcription des gènes correspondants ("Dysfonctionnements Cellulaires À l'Origine Du Processus Tumoral et Aperçu Des Thérapies Existantes" 2014)

Il serait inexact de dissocier entièrement l'épigénétique de la génétique. En effet, d'une part, une méthylation au niveau des cytosines peut induire des mutations lors de la réplication. D'autre part, une mutation par ajout ou suppression d'une cytosine ou guanine modifiera la probabilité d'apparition d'une méthylation sur le site concerné.

La méthylation de l'ADN est impliquée au cours de nombreux stades du développement, incluant l'embryogénèse, la régulation de la transcription et l'expression génétiques (Bird, A 2007), les interactions entre l'ADN et les protéines et la différenciation cellulaire (Bird, A 2002). Ces mécanismes contribuent à expliquer comment les cellules, possédant une séquence d'ADN identique, peuvent se différencier en différents types cellulaires conduisant à différents phénotypes (M. Suzuki, *et al* 2008)(Kouzarides, T, *et al*. 2007).

En règle générale le profil de méthylation n'est pas modifié au cours des mitoses. Ainsi, le niveau global de méthylation est stable au cours du temps (Lange, U *et al* 2010). Néanmoins, le profil épigénétique ne reste pas strictement identique au cours de la vie ; il subit des modifications ciblées, en particulier à certains stades

du développement, en particulier chez les mammifères. Ces transitions contribuent à une expression des gènes spécifiques à chaque lignée ou tissu (Feil, R *et al* 2012)(Jacobsen, JL. *et al* 2010).

Par exemple la méthylation de l'ADN participe à la différentiation des cellules souches hématopoïétiques en cellules matures (Ji, H *et al* 2010)(Bocker, M *et al* 2011), incluant l'expression des gènes codant pour les cytokines (Lee, C *et al* 2009) et les gènes contrôlant les immunoglobulines.

Initialement il été admis que les mécanismes de maintenance de la méthylation de l'ADN provenaient de copies semi-conservatives du profil de méthylation parental (Holliday R *et al* 1975). Par conséquent les enzymes DNA methyltransferase (DNMT) jouent un rôle à différentes étapes: elles agissent soit en tant que *de novo* DNMTs, instaurant un profil initial de méthylation, soit en tant que DNMTs de maintenance, qui après la réplication reproduisent le profil de méthylation à partir du brin d'ADN existant (Pradhan, S *et al* 1999). La méthylation de novo de l'ADN survient principalement dans les cellules germinales ou au cours de l'embryogénèse (Jaenisch, R *et al* 1982). En effet la fréquence d'apparition des CpG méthylés dans les cellules adultes somatiques semble faible (Lorincz, M *et al* 2000). Néanmoins il a été montré qu'une méthylation progressive se produit dans une proportion importante de l'ensemble des CpG islands dans certains tissus durant le vieillissement (Issa, J *et al* 2000), ou dans les cellules anormales telles que les cellules cancéreuses (Baylin, S *et al* 2000). L'engouement récemment suscité pour l'épigénétique est probablement lié à la mise en évidence de corrélations entre des modifications des niveaux de méthylation de l'ADN et l'apparition de certaines pathologies.

L'épigénétique représente un facteur de risque important pour de nombreuses maladies. Etant donné la place clé occupée par la régulation de l'expression des gènes et la différenciation cellulaire, il semble évident que des altérations ou erreurs survenant dans les mécanismes de méthylation pourraient être lourdes de conséquences et contribuer à l'apparition de pathologies. Les cancers représentent la principale pathologie dans laquelle les conséquences de la méthylation ont été évaluées (Ehrlich, M *et al* 2002)(Feinberg., A *et al* 2004). Par ailleurs, il a été clairement démontré chez la souris, qu'un faible niveau de méthylation de l'ADN précède l'apparition d'athérosclérose. Ce lien a été confirmé chez l'humain : un niveau de méthylation faible a été retrouvé chez les personnes à risque d'artériosclérose tels que les fumeurs, les personnes présentant un déficit en folates et une hyperhomocysteinémie (Baccarelli, A *et al* 2010a), de même que des patients atteints d'un cancer.

De plus, des modifications épigénétiques ont été retrouvées chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires (Baccarelli, A 2010b), maladies auto-immunes (Strickland, F *et al* 2008) ou de troubles psychiatriques (Tsankova, N. 2007). Ainsi, le lien entre une susceptibilité accrue aux maladies cardiovasculaires (Felitti, V *et al* 1998)(Dong, M. 2004), maladies mentales (Felitti, V *et al* 1998), infectieuses (Shirtcliff, E.A. 2009) et respiratoires (Boyce,

W *et al* 1995) et la méthylation de l'ADN a déjà été établi. Enfin, il a également été démontré que les gènes impliqués dans la réponse au stress sont susceptibles à la méthylation de l'ADN (McGowan, P *et al* 2009).

De plus, la méthylation de l'ADN, constituant une interface entre le génome et l'environnement, les conditions subies durant la vie et en particulier au cours de la petite enfance pourraient également avoir un impact sur l'expression des gènes. Un niveau élevé de stress, par exemple consécutif à un placement en institution ou orphelinat et une adoption représente des facteurs environnementaux majeurs susceptibles d'induire des modifications épigénétiques.
Les études d'association pangénomiques, ou GWAS, visent à étudier les corrélations entre de nombreuses variations génétiques. Elles consistent en l'identification de polymorphisme touchant un seul nucléotide (SNPs) dont la fréquence dans le génome humain est importante et à déterminer la façon dont ces polymorphismes sont présents dans différentes populations. Elles permettent également d'identifier des associations entre des SNPs et des pathologies transmises d'une génération à une autre. Néanmoins, il convient de prendre en considération les facteurs de confusion interagissant avec ces modifications génétiques courantes (McGowan, P. *et al* 2009). Même si les études GWAS ont conduit à l'identification de plus de 800 SNPs associés à un éventail de plus de 150 maladies (McGowan, P *et al* 2009), ces SNPs n'expliquent qu'une partie de la composante génétique de ces pathologies. Au-delà de la caractérisation individuelle de chaque SNP à laquelle les études récentes se sont largement intéressées, le rôle des d'interactions complexes entre les SNPs et avec les facteurs environnementaux a reçu moins d'attention. En pratique, la principale limite de ces études est liée à la multiplicité des tests réalisés. En tenir compte dans le choix du seuil de signification pour rejeter l'hypothèse nulle de non association, est un prérequis indispensable (Gut *et al* 2007). De plus, d'un point de vue méthodologiques les études GWAS ne tiennent en général ni compte des interactions avec l'environnement, ni des interactions entre les gènes.

A la différence des études GWAS, les résultats des EWAS sont également directement impactées par des facteurs de confusion environnementaux touchant à la fois le phénotype et l'épigénome, tels que le type de cellules, l'âge, le sexe, qui risquent d'augmenter à tort la taille d'effet et l'erreur de type I. Par conséquent, l'analyse des résultats des GWAS, comme des EWAS doit faire intervenir des méthodes d'ajustement.

Une première limite à l'interprétation des données issues des études EWAS réside dans le fait que l'épigénome est variable selon les tissus. Néanmoins, Dick et al, a suggéré que l'évaluation de la méthylation de l'ADN au niveau des cellules sanguines permet de déterminer de façon robuste et biologiquement pertinente des modifications épigénétiques liées à l'IMC.

La difficulté de différencier l'effet de la cause représente une deuxième limite. Par exemple les modifications épigénétiques identifiés par Dick et al, pourraient être survenues avant toute altération de l'IMC et ainsi être directement responsables des phénotypes liés à l'obésité (Murphy *et al* 2014).

1.2.2 Stress

Une réponse appropriée à des facteurs de stress est essentielle à l'adaptation et à la survie de tout individu (Kloet, E.D *et al* 2005). Il a été montré qu'une altération de la réponse au stress est associée à différentes pathologies, notamment psychiatriques (Kloet *et al* 2005) incluant schizophrénie et troubles bipolaires (Sinclair, D *et al* 2012), mais également dépression (Holsboer, F *et al* 2000), déficiences cognitives (Belanoff, J *et al* 2000), maladies inflammatoires, du systèmes immunitaires (Buske-Kirschbaum, A *et al* 1997), cardiovasculaires (telles que athérosclérose, inflammation, hypertension) et diabète (Turunen, M *et al* 2009)(Ling, C *et al* 2009)(Friso, S *et al* 2008). C'est pourquoi, identifier les déterminants de ces variations dans la réponse à un stress physique ou psychologique est fondamental. Récemment de nombreuses études ont portées sur les mécanismes impliqués dans la susceptibilité et l'adaptation de l'organisme au stress. Il semble évident que, au-delà des facteurs environnementaux et génétiques, des éléments supplémentaires interviennent et contribuent pour une large part à l'apparition des pathologies comportementales et psychologiques (Uchida, S, *et al* 2009).

L'axe hypothalamo-hypophysaire (HPA) constitue l'un des systèmes biologiques majeurs impliqués dans la coordination de la réponse au stress. En effet, il impliqué dans les mécanismes clefs des différentes pathologies liées au stress, telles que les troubles somatoformes et les maladies psychiatriques (Pruessner, J, *et al* 1999)(Heim, C, *et al* 2000). La sécrétion hormonale à l'état normal et lors d'un stress est contrôlée par la sécrétion de glucocorticoïdes (GC) par l'axe HPA (Kloet, E.D, *et al* 2005). Deux types de récepteurs sont susceptibles de fixer les GC circulants : les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et les récepteurs aux minéralocortioïdes (MR).

Le niveau d'affinité du MR pour les GC est nettement supérieur à celui du GR. Ainsi, il a été démontré que le MR est activé en permanence par la fixation de GC (Tallec, P.-L *et al* 2005). Par conséquent, le récepteur aux glucocorticoïdes constitue le principal acteur de la réponse au stress.

Il a été clairement démontré que les GR sont majoritairement localisés dans la région du cerveau appelée hippocampe. En effet Yang et al., (Yang, G 1988)ont montré une forte distribution des ARNm des GR dans cette région. Ainsi, le GR est exprimé au niveau du cerveau humain, de façon constante au cours de la vie (Cao-Lei, L *et al* 2013). Par ailleurs, l'expression du GR a également été mesurée dans d'autres tissus.

La transcription du gène du GR est connue pour être hautement régulée par des mécanismes épigénétiques, et en particulier les modifications des CpG de la région du promoteur. Les niveaux de méthylation de ces promoteurs étant aléatoires et uniques, cela suggère une régulation extrêmement spécifique de l'expression du gène du GR (Turner, JD *et al* 2010) (Turner, Alt, and Cao 2010) (Turner, *et al* 2008). En effet, de nombreux auteurs ont montré que la méthylation de l'ADN du gène du GR exprimé dans l'hippocampe (McGowan, P *et al* 2009)(Weaver, IC *et al* 2004) a un effet sur son niveau d'expression. Il existe de plus en plus de preuves montrant, en particulier, qu'une modification de l'expression du premier exon a une influence sur les isoformes de protéines du GR produites.

Le gène du GR humain (Figure 4) comporte huit exons constants (exon 2-9) et neuf premiers exons alternatifs 1A-1J, dont le niveau d'expression varie selon leur localisation tissulaire (Turner and Muller 2005) (Breslin, M 2001). Les exons 1A et 1I sont régulés par une région promotrice distale et les exons 1B-1H et 1J sont sous le contrôle de promoteurs proximaux (Cao-Lei, L *et al* 2011) localisés dans un ilot CpG qui est très similaire entre les espèces souris, rats et humains (Turner and Muller 2005) (Bockmuhl, Y *et al* 2011).

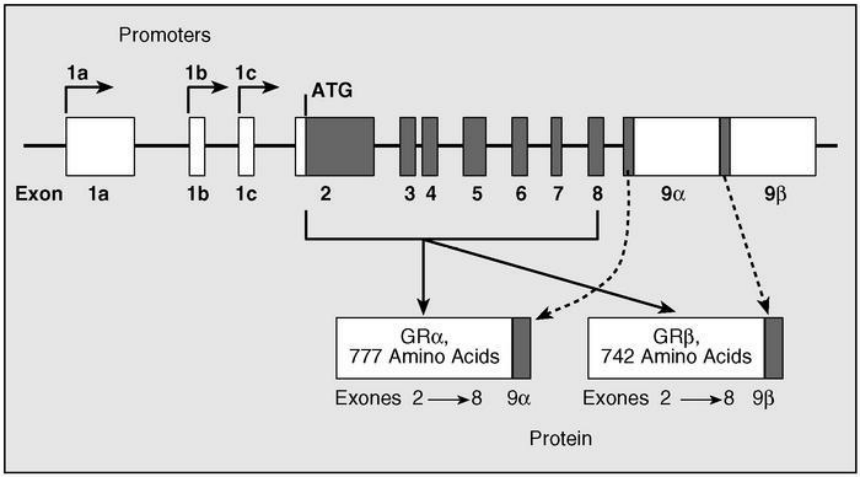


Figure 4: organisation génomique du gène du GR (Cosíoa, BG 2005)

Les ARNm subissent un épissage à l'extrémité 3' résultant en trois transcrits codant trois isoformes : GRα, GRβ et GR-P. **GRα est la forme la plus active du récepteur** responsable de la plupart des effets génomiques des GC. Il a été montré que l'épissage et les **isoformes qui en résultent sont influencés par le premier exon alternatif du *GR*** (Alt, SR *et al* 2010). En concordance avec leurs fonctions physiologiques, GR-α est majoritairement exprimé dans le cerveau, mais également dans les cellules musculo-squelettique, le foie, le poumon, le rein et les cellules mononuclées du sang périphérique ou peripheral blood mononucleated cells (PBMCs). Les ARNm de GR-β ont été retrouvé dans les cellules du système inflammatoire, par exemple les PBMCs, les cellules éosinophiles et les macrophages (Pujols, L *et al* 2002). Par conséquent l'expression du GR au niveau périphérique est souvent mesurée en tant qu'indicateur facilement accessible de l'expression du GR au niveau du cerveau

(Van Zuiden, M *et al* 2011). Weaver et al. et Liu et al. ont montré une réduction du nombre de transcrits du promoteur 1_7 (équivalent du promoteur 1F chez l'homme) du GR ainsi qu'une altération de la réactivité au stress au cours de la vie des rats dont le promoteur 1_7 était méthylé (Weaver, IC *et al* 2004)(Liu, D. *et al* 1997). De plus, Cao-Lei et al, and Turner et al., ont montré en particulier que cinq promoteurs humains du GR sont sensibles à des méthylations épigénétiques (Turner, JD *et al* 2008)(Cao-Lei, *et al* L 2011). Ces promoteurs sont connus pour être actifs dans les lymphocytes circulants (1D, J, E, F, and H).

Cao-Lei et al. (Cao-Lei, L *et al* 2011) ont monté que l'îlot CpG du promoteur proximal est sous le contrôle de la méthylation de l'ADN. Le promoteur 1F est celui qui a été le plus largement étudié (Alt, SR *et al* 2010)(McGowan, P *et al* 2009). La méthylation (5-mC) et l'hydroxyméthylation (5-hmC) du promoteur 1F chez l'homme et 1_7 chez les rongeurs représentent les principales modifications et occupent vraisemblablement une place d'interface privilégiée entre l'environnement et l'expression du GR. Le promoteur 1F/1_7, compte parmi les premiers promoteurs de gènes pour lesquels l'impact de l'environnement sur la méthylation de l'ADN a été démontré. La méthylation de ces promoteurs a été associée avec une diminution du niveau de transcrits du GR. Il a été montré qu'**une modification du nombre de CpG dans la région du promoteur 1F / 1_7 est négativement corrélée avec l'expression globale du *GR*** via les transcrits correspondant (Witzmann, S, *et al* 2012) respectivement chez le rongeur (Weaver, IC 2004) et chez l'humain (McGowan, P *et al* 2009)(Uchida, S, *et al* 2009)(Bromer, C, *et al* 2012). Ceci suggère qu'il existe un processus de régulation épigénétique global via le promoteur 1F / 1_7 du *GR*.

Le GR présent au niveau de l'hippocampe joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la libération de glucocorticoïdes. De plus en plus de preuves tendent à montrer qu'un stress chronique provoque une diminution du taux d'ARNm du GR au niveau du cerveau chez le rat (Kitraki, E, *et al* 1999).

Ainsi, le GR présent au niveau de l'hippocampe occupe une place critique dans la régulation des GC, conduisant à une diminution de la libération de GC.

En effet, il a été montré dans une étude menée en post-mortem chez les victimes de suicide, que les modifications des CpG des promoteurs du GR au niveau de l'hippocampe, étaient corrélées avec des antécédents de maltraitances/abus subis durant l'enfance (McGowan, P *et al* 2009). C'est pourquoi, une hypothèse très probable est que la méthylation de l'ADN des régions riches en CpG joue un rôle d'interface entre les évènements subis durant la petite enfance et la régulation de l'axe HPA via l'activité du GR. De plus, une altération du rétrocontrôle négatif des GC a été retrouvée chez des personnes déprimées et souffrant de troubles de stress post-traumatique (PTSD), suggérant que le GR et le MR pourraient être impliqués dans la physiopathologie de ces troubles.

Une condition similaire est induite chez l'animal par un stress chronique. Mizuchi et al. et Schmidt et al, ont trouvé que ces anomalies du GR dans les centres supérieurs de l'axe HPA sont liées à une réduction du rétrocontrôle négatif induite par un stress chronique (Schmidt, M *et al* 2009). Puisqu'une perturbation au niveau du cortex préfrontal du cerveau ou de l'hippocampe est impliquée dans la pathogénèse de la dépression, ces conclusions pourraient aider à comprendre les mécanismes reliant l'altération du système de rétrocontrôle des GC et les perturbations au niveau du cerveau dans la dépression.

On a également estimé que ces perturbations pourraient être impliquées dans la réduction du nombre GR dans les sites du cerveau impliqués dans le rétrocontrôle.

Un nombre croissant de preuves selon lesquelles le GR régule les gènes principalement impliqués dans le métabolisme énergétique, la transduction du signal, les neurotransmetteurs et l'adhésion cellulaire se sont accumulées. Parmi ces gènes, certains sont associés à des troubles liés au stress (Cole, S *et al* 2007)(E.B, B *et al* 2004). Par exemple une diminution de l'expression de GILZ a été associée à certains symptômes observés chez des patients souffrant de fibromyalgie (Macedo, J.A *et al* 2008) et l'apparition de réaction d'hypersensibilité retardée (Berrebi, D 2003). Il a été montré qu'une augmentation du niveau d'expression de FKBP5 est reliée à des troubles dépressifs majeurs et une récupération suite à la réponse au stress, alors que des niveaux réduits de FKBP5 est associé à des troubles liés au stress posttraumatique (Yehuda, R *et al* 2009).

Le stress est connu pour induire des modifications à court terme des paramètres cardiovasculaires, par exemple, augmentation de la pression artérielle, rythme cardiaque (RC) et volume d'éjection systolique. Ces modifications sont régulées par le système nerveux autonome (SNA).

Les modifications de la pression artérielle sont reliées à l'activation du système sympathique, des ventricules cardiaques et la résistance des vaisseaux périphériques, alors que le retrait du système parasympathique contribue à l'augmentation initiale du rythme cardiaque. On estime que ces réactions hémodynamiques au stress jouent un rôle protecteur en situation de danger aigu. Néanmoins, il semble évident qu'une exposition fréquente au stress et une augmentation de la réactivité cardiovasculaire au stress nuit à la fonction cardiovasculaire. Cela a été confirmé par une méta-analyse récente, suggérant que la pression artérielle et la réactivité au stress du SNA constituent des prédicteurs de l'évolution du risque cardiovasculaire (Chida, Y. and A. Steptoe 2010). Des tests de stress arithmétiques mentaux standardisés et des exercices effectués sur ordinateur augmentent l'activité sur le système nerveux sympathique et la pression artérielle (PA) (Steptoe, A. *et al* and C. Vogele *et al* 1991). L'association entre les réponses à ces tests et l'évolution au long terme de la PA (Flaa, A 2008), l'insulino-résistance (Flaa, A *et al* 2008), et la calcification des artères coronaires (Matthews, *et al* K.A 2006) a été démontrée.

Il a été montré que la réponse en termes de PA induite par le cold pressor test (CPT) est liée au risque de développement d'hypertension artérielle (Menkes, M.S *et al* 1989). Il s'agit d'un test de stress largement utilisé et validé induisant un stress systémique suite à l'immersion de la main d'une personne dans de l'eau glacée.

Ce test a été utilisé dans des études portant sur l'influence du stress sur la mémoire (Buchanan 2006), l'apprentissage (Duncko *et al* 2007), la prise de décision (Lighthall *et al* 2011).

La méthode de CPT est associée à l'activation du système sympathique et à l'activation faible à modérée de l'axe HPA associé à la libération de glucocorticoïdes. L'augmentation faible à modérée de la libération de cortisol observée à l'issue du CPT via l'activation du système sympathique a montré sa robustesse et sa fiabilité (Lovallo *et al* 1975) (McRae *et al* 2006) (Porcelli *et al* 2014).

Tandis que de nombreuses études ont montré que les pathologies liées à la réponse au stress et les maladies cardiovasculaires, maladies mentales et infections du tractus respiratoire supérieur et immunocompétence réduite (appelés CAMI) sont associées à un profil de méthylation de l'ADN particulier, les causes de la modification du profil de méthylation n'ont pas encore été clairement établies. Pour cela, nous avons défini un modèle de population dont le profil de méthylation a été altéré. Weaver et al., Liu et al., et Murgatroyd et al ; ont montré l'existence d'un lien entre l'Early Life Adversity (ELA) et la méthylation de l'ADN.(Murgatroyd, C 2009) (Liu, D. *et al* 1997). Ainsi, les personnes ayant été exposées à des conditions très difficiles durant leurs premières années de vie, telles que des abus physiques ou mentaux, sont susceptibles de présenter un profil de méthylation de l'ADN altéré.

1.2.3 Early Life Adversity (ELA)

Les maltraitances subies durant l'enfance ou "Early Life Adversity" regroupent l'ensemble des conditions délétères subies durant les premières années de vie. Cinq types de maltraitances sont généralement décrits: abus d'ordre émotionnel, physique, abus sexuel, négligences d'ordre émotionnel ou physique (Spitzer, C 2013). Ces différents types de maltraitances (ELA) représentent des facteurs de risque de maladies à l'âge adulte.

Comme mentionné précédemment, l'exposition à une ELA est connue pour contribuer à l'apparition de pathologies à l'âge adulte. Les traumatismes subis durant l'enfance représentent une des formes de stress les plus extrêmes. Ainsi, les conséquences néfastes de ces traumatismes sur le long terme aussi bien sur la santé mentale que physique ont été bien établies (Murgatroyd *et al* 2009). Une relation entre des antécédents d'ELA et des processus inflammatoires, en particulier cardiovasculaires et maladies auto-immunes telles que sclérose multiple et polyarthrite rhumatoïde (Goodwin, R *et al* 2004), a été établie. McCauley et al., a montré que l'association entre violence ou abus et une

susceptibilité accrue est aussi importante chez des participants qui ont subi des abus durant leurs premières années de vie que chez ceux qui les ont subi au cours de l'étude (McCauley, J *et al* 1997).

Par ailleurs, il a été clairement démontré que la modification de la méthylation suite à des antécédents d'ELA affecte la réponse que stress. Dans le model d'ELA chez le rat, les sujets jeunes ayant été privé de soins maternels présentent une plus grande réactivité de l'axe HPA au cours de la vie (Liu, D. *et al* 1997)(Liu, D *et al* 2000). Ce faible niveau de soins reçus a été associé à un faible niveau d'expression du GR (Liu, D. *et al* 1997) et à un niveau de méthylation élevé (80-100%) d'un CpG clé du promoteur 1_7 de l'hippocampe (Weaver, IC *et al* 2004)(Weaver, IC *et al* 2005)(Weaver, IC *et al* 2007). Cependant la situation semble jusqu'à présent moins claire chez l'humain. Il a été montré que les niveaux de méthylation du promoteur 1F du GR, chez des nouveau-nés, varient selon l'humeur de leur mère au cours de la grossesse (Murgatroyd *et al* 2009) (Oberlander, T.F *et al* 2008). De plus, le suivi de ces nouveau-nés a mis en évidence une altération de la réactivité au stress de l'axe HPA durant l'enfance. Par ailleurs, au cours de la période appelée « famine hollandaise » (ou l'hiver de la faim) en 1944, l'étude de la « cohorte de la faim », suggère que les éventuelles transformations épigénétiques liées à l'alimentation des parents seraient transmissibles sur plusieurs générations. À l'hiver 1944, des restrictions alimentaires ont été imposées par le régime nazi à la population d'Amsterdam, ce qui a conduit à une famine. Les filles nées de mères affamées pendant cette période sont étudiées depuis 1994 par Tessa Roseboom, au Centre médical académique d'Amsterdam. Les femmes exposées à la famine durant la gestation ont plus de risques que la population générale de développer un diabète de type 2. Mais c'est également vrai pour leurs filles qui, elles, n'ont pas connu la famine (Pàldi, *et al* 2012).

En outre, Tessa Roseboom et ses collègues ont récemment commencé à rechercher des marques épigénétiques dans cette « cohorte de la faim ». Leurs premières analyses sur trois générations de femmes montrent que celles qui souffrent de diabète de type 2 présentent des modifications épigénétiques sur leurs chromosomes. Et que ces marques se conservent au fil des générations.

Le suivi de cette cohorte a permis d'observer une association entre la méthylation du promoteur 1F du GR et la réponse au stress. Cela a également été expliqué par des facteurs environnementaux (par exemple l'éducation, le mode de vie) mais pas nécessairement par l'ELA (De Rooij, SR *et al* 2011).

Une méta-analyse récente a confirmé que des évènements d'ELA sévères représentent l'un des facteurs de prédisposition les plus robustes de trois problèmes de santé publique majeurs: les maladies mentales (par exemple. dépression, tentatives de suicide (Felitti, V *et al* 1998)), les maladies cardiovasculaires (par exemple cardiopathies ischémiques (Dong, M. 2004), accident vasculaire cérébral (Felitti, V *et al* 1998) et hypertension (Felitti, V 1998)(Dong, M. *et al* 2004)(Batten, S *et al* 2004)) et les infections du tractus

respiratoire supérieur (URTI (Boyce, W. 1995)(Schultz, H 2009)) et la diminution de l'immunocompétence (Shirtcliff, E.A. *et al* 2009)(Batten, S *et al* 2004) regroupées sous l'appellation de CAMI (Wegman, H *et al* 2009). En particulier, une séparation de la mère au cours des premières années de vie augmente significativement le risque de maladies psychotiques, troubles de l'humeur et de la personnalité jusqu'à l'âge de 60 ans (Raikkonen, K 2011). Le stress psychosocial est bien connu et constitue un facteur de prédisposition significatif des problèmes de santé publique cités ci-dessus (Nieuwenhuijsen, K 2010).

Certains auteurs, dont Neigh et al. ont montré qu'une altération de la régulation de l'axe HPA fait suite à un stress durant la petite enfance (Raikkonen *et al* 2011). Une augmentation des troubles dépressifs majeurs, PTSD et troubles liés à l'anxiété, des maladies cardiovasculaires, des cancer et diabètes a également été démontrée. En effet les altérations impliquant l'axe HPA constituent un déterminant majeur de la réponse au stress (Neigh, G *et al* 2009) et ainsi constituent potentiellement une conséquence au long terme des traumatismes subis durant la petite enfance. Le mécanisme qui pourrait expliquer le lien entre ELA et une susceptibilité accrue à ces pathologies reste jusqu'ici inconnu.

Nous pensons que l'un des schémas représentés ci-dessous pourrait expliquer la relation entre l'ELA et la susceptibilité accrue à ces pathologies. Ils se distinguent par la place et le rôle du stress dans le processus.

Dans la première hypothèse (partie supérieure), les modifications épigénétiques consécutives à une ELA augmenteraient la susceptibilité aux CAMI via une altération de la réponse au stress. Dans la deuxième partie (partie inférieure), le système de réponse au stress est altéré au même niveau que les autres systèmes (cardiovasculaire, mental et infectieux).

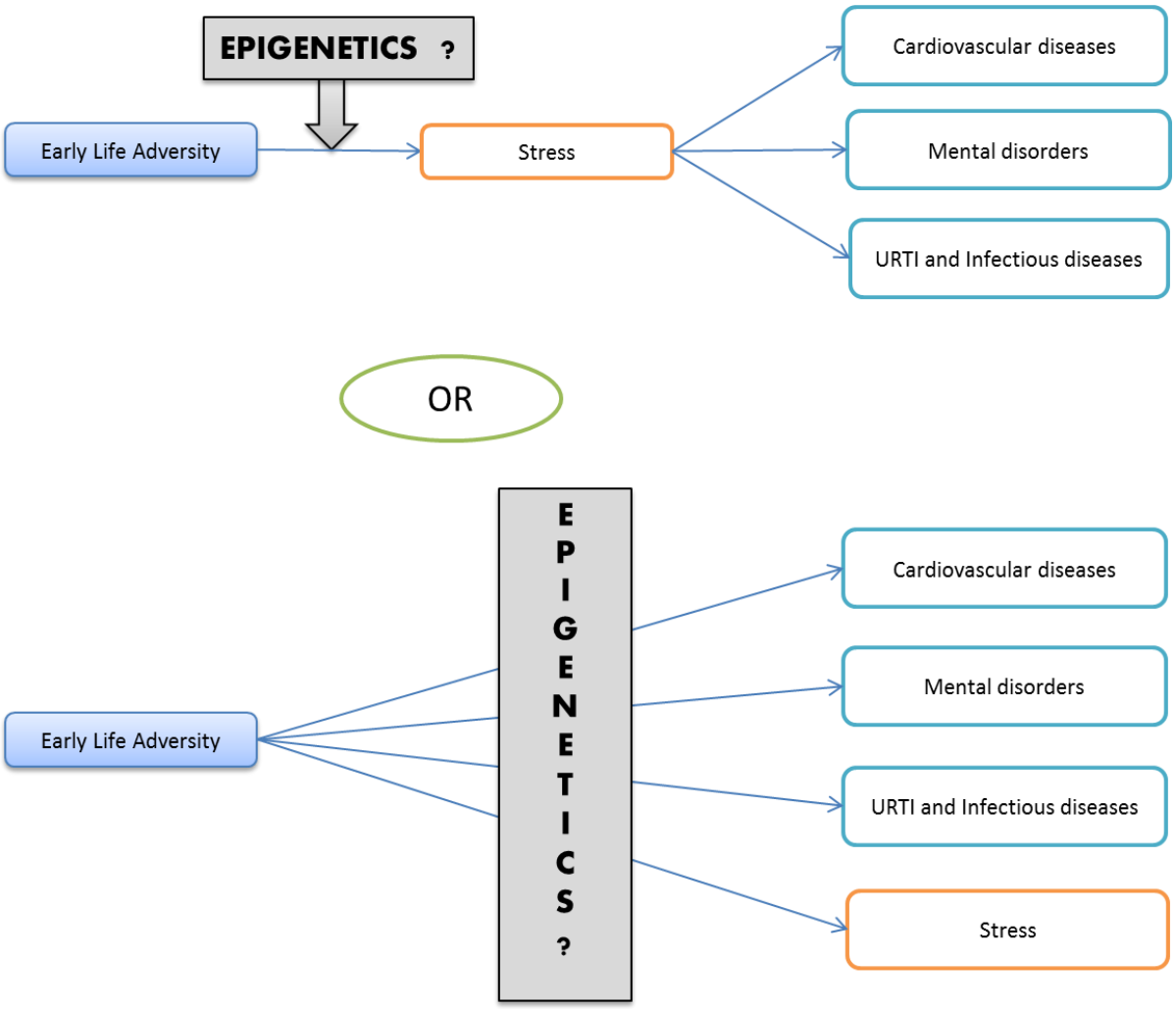


Figure 5: hypothèse de mécanismes reliant l'ELA à une susceptibilité accrue aux CAMI

1.3 Progression d'une population de volontaires sains à des sujets ayant subi une ELA

D'une part le lien entre ELA et les pathologies de l'âge adulte a déjà été clairement établi, d'autre part l'association entre la méthylation de l'ADN et la réponse au stress a été démontrée chez des volontaires sains par l'étude Cold Pressor.

De plus, il a également été démontré que l'ELA pourrait être responsable de modifications du profil de méthylation de l'ADN. Dans ce contexte, l'étude EpiPath a été concue pour évaluer la réponse au stress et la susceptibilité aux pathologies cardiovasculaires, mentales et du système immunitaire dans une population précédemment exposée à des facteurs de stress physique et /ou psychologique au cours des premières années de vie. La Figure 6 montre la façon dont le projet EpiPath a été conçu s'appuyant sur les données de la littérature et les études précédemment conduites par le Groupe PsychoImmunologie.

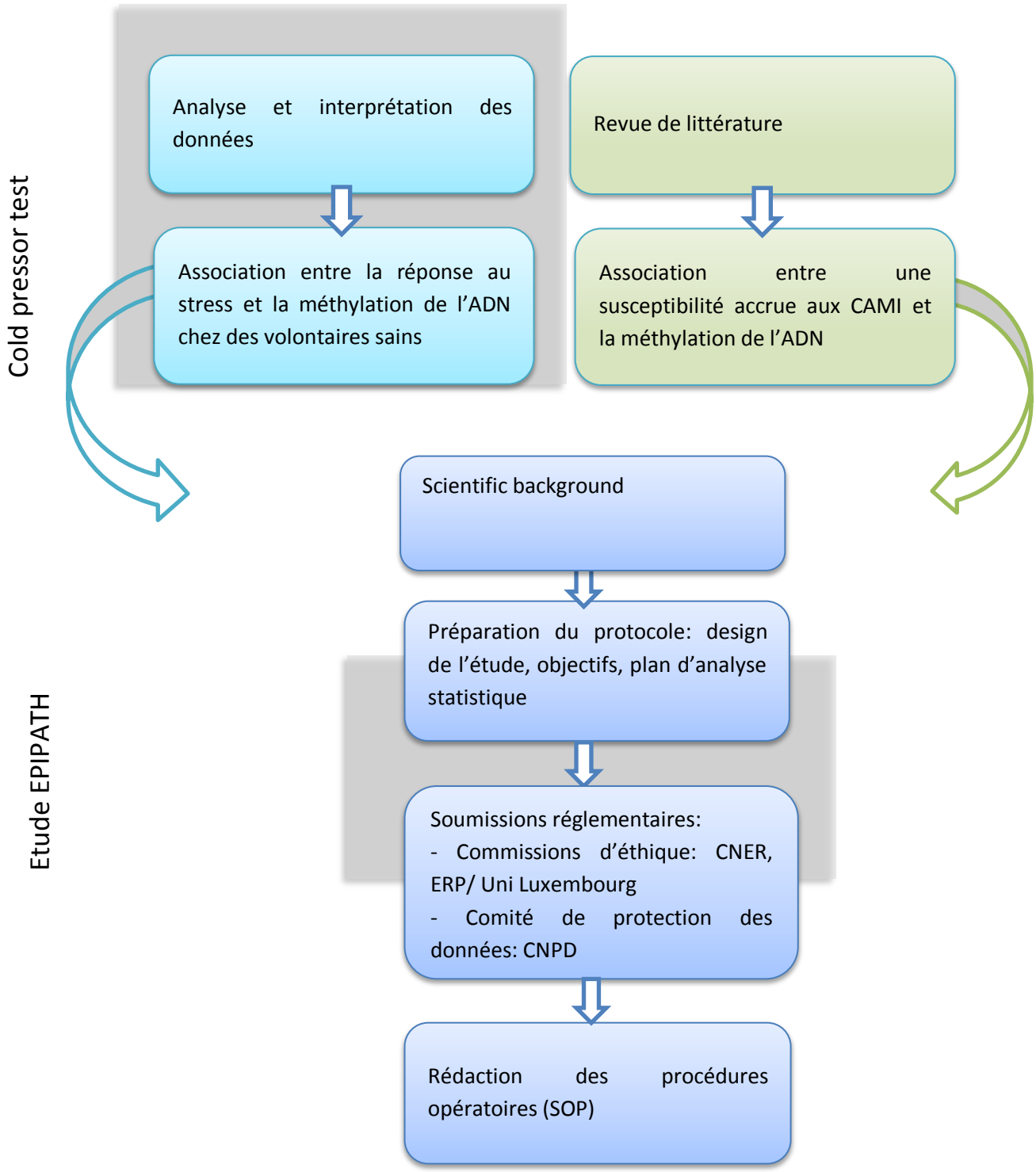


Figure 6: lien entre l'étude EpiPath et l'étude CPT

sujet de cette thèse

2 SECTION 2: ETUDE COLD PRESSOR STUDY

1.1. Introduction

Le récepteur aux glucocorticoïdes est le principal composant de la réponse au stress impliquant l'axe HPA et ainsi un médiateur possible d'une réponse inappropriée à un stress. Le Cold Pressor Test (CPT) constitue un outil largement utilisé en recherche clinique pour analyser la réponse au stress. L'axe HPA et le GR en particulier est connu pour être sensible à une variation de méthylation, l'une des modifications épigénétiques les plus importantes (Weaver, IC *et al* 2007). Les phénomènes épigénétiques constituent une modalité de transmission de l'information qui s'ajoute à l'information portée par la séquence d'ADN (Bird, A 2007) en interagissant avec l'environnement (Friso, S *et al* 2002). De plus, une méthylation incorrecte ou non contrôlée pourrait induire un facteur de risque pour l'apparition de pathologies liées au stress. De nombreuses études ont suggéré que le polymorphisme du gène du *GR* (Wust, S *et al* 2004) pourrait avoir un impact sur la réponse au stress impliquant l'axe HPA et pourrait contribuer à une vulnérabilité individuelle et une altération de la réponse au stress. L'un des mécanismes potentiels conduisant à des perturbations au niveau du GR est la variation génétique du gène du *GR* (*NR3C1*).

Une forte corrélation a été retrouvée entre la méthylation des promoteurs 1F et 1H du GR et la méthylation globale de l'îlot CpG et par conséquent suggère que 1F et 1H jouent un rôle majeur dans la régulation globale de la transcription du *GR* (Cao-Lei, L *et al* 2013). Cette première étude a été conduite pour évaluer l'association entre le niveau de méthylation du *GR* et la réponse physiologique au stress. Par conséquent nous avons utilisé dans cette étude la méthylation des promoteurs 1F et 1H comme un indicateur intermédiaire de la méthylation globale du *GR*. Comme la méthylation de l'ADN est un phénomène global, il n'aurait pas été pertinent d'évaluer la méthylation selon un pourcentage. Une variable binaire a été définie en divisant la population en deux suivant la médiane de la somme de la méthylation de 1F et 1H. Il a été démontré précédemment que même si le *GR* est principalement exprimé au niveau de l'hippocampe, les PBMCs expriment également pratiquement la totalité des premiers exons (y compris F et H) du promoteur du *GR*. Par conséquent, l'ADN génomique a été extrait des PBMCs et le niveau de méthylation de l'ADN a été déterminé par pyroséquençage à partir d'ADN génomique bisulfité comme décrit précédemment (Turner, JD *et al* 2008)(Alt, S.R 2010)(Cao-Lei, L *et al* 2013). Une méthode de randomisation a été utilisée pour répartir les participants entre le groupe test et le groupe contrôle, assurant ainsi la comparabilité initiale des deux groupes. La pression artérielle systolique et diastolique (PAS and PAD) et le rythme cardiaque (RC) ont été mesuré avant, pendant et après le CPT afin d'évaluer la réponse au stress.

2.1 Méthodologie

Dans cette étude académique interventionnelle, nous avons étudié le niveau de méthylation des promoteurs 1F et 1H du GR afin de décrire le lien supposé entre profil de méthylation et réponse au stress. Pour cela, nous avons analysé la méthylation des promoteurs du GR issus de PBMCs, connue pour être corrélée avec la méthylation du GR dans le cerveau. Dans cette étude les paramètres cardiovasculaires mesurés avant, durant et après le test de stress ont été utilisés pour estimer la réponse au stress. Cette étude a été menée sur des volontaires sains qui ont été soumis au cold pressor test (CPT). L'étude CPT se rapproche du principe de l'approche gène candidat, dans la mesure où elle consiste à présupposer l'implication du niveau de méthylation d'un gène dans un effet a priori. L'étude a cherché à confirmer cette implication a posteriori.

2.1.1 Population de l'étude

232 volontaires sains ont été recrutés par le Département de Psychobiologie de l'Université de Trèves (Allemagne) de fin 2011 / début 2012. Les critères d'éligibilité sont: origine caucasiennes, de 18 à 35 ans, de poids normal (Indice de masse corporelle de 19-25). De plus, les critères d'exclusions suivants ont été utilisés : consommation tabagique supérieure à 5 cigarettes par jour, traitement médicamenteux, sensibilité accrue au froid qu'elle soit objective ou subjective, troubles circulatoires ou cardiovasculaires. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé. Le protocole de l'étude a été approuvé par le Comité médical Rhineland-Pfaltz (Allemagne).

2.1.2 Protocole du test de stress: cold pressor test" (CPT)

Le CPT constitue un outil classique largement utilisé (Marciano, C *et al* 2012) (Domingues, R *et al* 2009)(Schwarbe, L *et al* 2008) pour évaluer la réactivité à un facteur de stress physique. Les participants ont été répartis aléatoirement par une randomisation 2:1 entre les deux groupes "test" (de 146 participants) ou groupe "contrôle" (de 72 participants).

Le protocole de l'étude commence par une période de 10 minutes de repos durant laquelle les paramètres à baseline ont été mesurés pour le rythme cardiaque et la pression artérielle. Le CPT a consisté à demander aux participants d'immerger leur main droite jusqu'au poignet inclus, durant 3 minutes, dans de l'eau glacée (2-3°C) pour le groupe test ou dans de l'eau chaude (37° C) pour le groupe contrôle. Le schéma récapitulatif de l'étude était le suivant:

	Resting period				CPT		Recovery period			
Time points	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Time (min)	t= 0	t= 2,5	t= 5	t= 7,5	t= 10,5	t= 12,5	t= 14	t= 16	t= 18	t = 20

Figure 7: Schéma des différents temps de mesure de l'étude CPT

2.1.3 Evaluation de la réponse au stress

La réponse au stress a été évaluée par les paramètres cardiovasculaires suivants: PAS, PAD et rythme cardiaque. Ces variables ont été mesurées à baseline, durant le CPT et durant la période de récupération. Ainsi au total nous avons 10 instants de mesures ou time-points (3 mesures durant la période de repos de 10 minutes avant le CPT, 0,5 et 2,5 minutes après le début du CPT et 3 mesures durant la période de récupération). Le rythme cardiaque et pression artérielle ont été mesurés en utilisant le système Dinamap. Les variables dépendantes sont les paramètres cardiovasculaires suivants: PAS, PAD, pression artérielle moyenne (PAM), RC. Avant le début et après la fin du CPT, il a été demandé aux participants de quantifier leur niveau de stress, tension, éveil et activité via des échelles visuelles analogiques graduées de 0 à 100 (en annexe 2).

2.1.4 Quantification de la méthylation

Une prise de sang a été réalisée avant le début du CPT afin d'isoler les PBMCs utilisées pour la quantification de l'ADN. Dans cette étude, la méthylation de l'ADN a été analysée selon une approche gène-spécifique. La méthylation de l'ADN des deux promoteurs (1F et 1H) du gène *NR3C1* codant le GR a été mesurée par pyrosequençage à partir d'ADN génomique bisulfité comme décrit précédemment (Turner, JD *et al* 2008)(Alt, SR *et al* 2010)(Cao-Lei, L 2013). L'étape de pyrosequençage a été réalisée grâce au PyroMark ID System (Qiagen) incluant des contrôles positifs et négatifs. Les résultats ont été analysé en évaluant le pourcentage de modification de l'ADN de chaque dinucléotide CpG utilisant le logiciel Pyro Q-CpG.

2.1.5 Autres covariables mesurées

Une évaluation psychologique a été réalisée en utilisant la version allemande du Structured Clinical Interview pour évaluer les éventuels troubles mentaux. La somatisation et les troubles végétatifs somatoformes ont été évalués par les systèmes de classification suivants : la version allemande du Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition, text revision (DSM-IV-TR) (Spitzer, M *et al* 2002) et ICD-10 CM Diagnosis Code. Les troubles somatoformes ont été évalués grâce à un auto-questionnaire appelé Screening for Somatoform Symptoms (SOMS) (Rief, W *et al* 1997). 53 items évaluent l'ensemble des symptômes physiques pertinents pour le diagnostic des troubles somatoformes selon DSM-IV (33 symptômes), et selon l'échelle ICD-10, pour le diagnostic des troubles de la somatisation (14 symptômes) et pour le diagnostic des troubles végétatifs somatoformes (12 symptômes). Le Complaint Index a été mesuré comme le score total du questionnaire relatif aux troubles somatoformes.

Le niveau de stress chronique et de dépression ont été évalué par des questionnaires validés. Le stress chronique par l'échelle appelée Trier Inventory for Chronic Stress (TICS). Ce questionnaire fournit des scores qui peuvent être

utilisés pour déterminer la fréquence des situations stressantes vécues au cours de l'année passée. Une analyse en composantes principales a été menée sur 9 sous-scores de cette échelle: surcharge de travail, difficultés sociales, exigences excessives, manque d'appréciation sociale, insatisfaction professionnelle, tensions sociales, pression de succès, isolation sociale et inquiétude chronique. Les réponses ont été évaluées sur une échelle de zéro à quatre (Schulz, P *et al* 1999).

Le questionnaire Beck Depression Inventory (BDI) comprenant 21 items et fournissant un score total allant de 0 à 63 a été utilisé pour quantifier le niveau de dépression (Beck, A *et al,* 1996). Chaque item est noté sur une échelle de 0 (correspondant à une absence de symptôme) à 3 (symptômes très intenses).
Les facteurs de confusion généraux ont été évalués: la taille, le poids, la prise d'un contraceptif oral, la consommation d'alcohol, les paramètres liés au sommeil (qualité, durée, heure) et l'activité physique, qui représentent des facteurs fréquemment liés aux données cardiovasculaires. Les données mesurées pour 6 variables : régularité des cycles, durée des cycles, dernière période menstruelle, durée du sommeil et qualité du sommeil n'ont pas été incluses dans l'analyse du fait de leur taux élevé de données manquantes (45% à 57%).

2.1.6 Analyses statistiques et data management

La distribution de toutes les variables a été évaluée graphiquement par des graphiques « kernel density plots » et numériquement par le test de Shapiro-Wilk en complément de kurtosis et skewness. Les covariables dont la distribution n'était pas normale ont été normalisées pour une meilleure approximation à la distribution normale. La formule utilisée pour la normalisation est la suivante : la variable V a été remplacée par [V − moyenne(V)] / écart type (V). Les variables continues ont été décrites par leur moyenne, écart type et étendue. Les fréquences et pourcentages de participants dans chaque catégorie ont été estimés pour les variables catégorielles. Dans l'analyse bivariée, la significativité des facteurs de confusion a été évaluée par l'association avec le statut de méthylation et le groupe : test/contrôle en utilisant respectivement une régression linéaire et une corrélation de Pearson, ou un test de χ^2. Toute variable présentant une association dont la p-value était inférieure à 0.05 a été retenue pour être incluse en tant que covariable dans l'analyse multivariée principale : le modèle linéaire mixte.

Puisque les variables dépendantes (PAS et PAD) sont des mesures répétées, une analyse de variance sur mesures répétées (ANOVA) a été réalisée en tant qu'analyse préliminaire. Dans les cas où le test Mauchly de sphéricité a montré une hétérogénéité de covariance, une correction Greenhouse-Geisser a été apportée.

De plus, une série de variables a été extraite de mesures répétées incluant l'augmentation moyenne de PAS et PAD (de la PA moyenne au cours de la période de repos initiale au pic de PA au cours du CPT) et la diminution moyenne

(du pic de PA à la moyenne de la PA durant la période de récupération). Celles-ci sont nommées par exemple: "PAS Peak", "PAS increase" et "PAS decrease". La cohérence interne des échelles TICS et BDI a été validée dans la population de l'étude. Le coefficient de Cronbach et les intervalles de confiance correspondants ont été estimés par la méthode du bootstrap.

Par la suite un modèle linéaire mixte pour mesures répétées a été élaboré (Linear Mixed Effects functions du logiciel R). Les variables dépendantes étant des données longitudinales (mesures répétés chez les mêmes individus), les observations d'un même participant sont corrélées. Une structure de corrélation doit être appliquée ainsi qu'un effet aléatoire représentant la variabilité intra-sujet (corrélation entre les différentes mesures d'un même sujet) (Beck, A 1988). Les effets fixes comprennent en particulier le temps de la mesure ainsi que de nombreuses covariables. Une méthode d'ajustement par rééchantillonnage a été utilisée pour tenir compte du risque de faux positifs lors de l'utilisation de multiples hypothèses tel que recommandé par Chunyan et al. 2010 (Chunyan, L *et al* 2010).

Toutes ces analyses ont été réalisées avec le logiciel R, version 3.0.1 (du 16/05/2013). Le seuil de 0.05 a été retenu pour affirmer qu'une différence était statistiquement significative après la correction appropriée (ajustement de Greenhouse-Geisser qui vise à se réduire le risque d'accepter à tort une interaction comme étant statistiquement significative).

Une analyse statistique classique a été conduite. Les caractéristiques à l'inclusion ne présentaient pas de difference significative. Une augmentation de PAS significativement supérieure a été retrouvée dans le groupe CPT en comparaison au groupe contrôle avec un effet significatif des covariables "niveau d'éveil", "modification de la tension après le CPT" et "incomfort". Une association entre PAS, PAD et le groupe de méthylation a été testée dans une approche exploratoire utilisant une analyse de variance à mesures répétées puis un modèle mixte.

2.2 Résultats

2.2.1 Caractéristiques de la population de l'étude à baseline

232 participants ont été inclus dans l'étude. Les participants pour lesquels aucune donnée de méthylation (4 sujets) ou aucune donnée cardiovasculaire n'était disponible (11 sujets), ont été exclus de l'analyse. Au total 14 participants (6%) ont été exclus. Comme décrit dans le diagramme de l'étude (Annexe 3) et dans le tableau 1 ci-dessous, 218 participants ont été inclus dans l'analyse.

Tableau I : Caractéristiques de la population, données exprimées par leurs moyennes

Variables		Hommes n (%)	Femmes n (%)	Population analysée n (%)
N		104 (47.71)	114 (52.29)	218 (100)
Groupe	CPT	69 (66.34)	77 (67.54)	146 (66.97)
	Contrôle	35 (33.66)	37 (32.46)	72 (33.03)

Les caractéristiques à baseline des participants sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : caractéristiques à baseline, moyenne, sd et p value des t-test pour les variables quantitatives et effectifs et pourcentages et p value des tests de Pearson's Chi-squared pour la comparaison des variables catégorielles entre le groupe CPT et le groupe contrôle

	Normal range	Groupe CPT	Groupe contrôle	Population globale	p value
N		147	71	218	
Caractéristiques sociodémographiques					
Sexe, male (n, %)		70 (47.62%)	35 (49.29%)	105 (48.16%)	0.736
IMC	[18.5;30]	22.1 ± 2.3	22.5 ± 2.4	22.2 ± 2.3	0.243
Troubles somatoformes					
Somatisation					
Somatisation index (SI) DSM IV	[0-20]	3.4 ± 3.76	3.4 ± 3.2	3.4 ± 3.6	0.979
Somatisation index (SI) ICD 10	[0-20]	2.0 ± 2.30	2.2 ± 2.5	2.1 ± 2.4	0.708
Somatisation disorders diagnosed (n, %)		14 (9.52%)	6 (8.45%)	20 (9.17%)	0.998
Troubles végétatifs somatoformes (SAD)					
SAD index	[0-20]	1.7 ± 2.3	1.9 ± 2.1	1.8 ± 2.2	0.509
SAD diagnosis (n, %)		46 (31.29%)	22 (30.98%)	68 (31.19%)	0.986
Total score SOMS (BI Soma)	[0-72]	5.4 ± 6.1	5.5 ± 5.6	5.4 ± 5.9	0.935
Autoévaluation (échelles visuelles analogiques)					
Eveil	[0-100]	20.1 ± 19.3	23.2 ± 20.1	23.8 ± 19.5	0.769
Stress	[0-100]	25.2 ± 21.8	22.4 ± 21.3	24.3 ± 21.6	0.379
Anxiété	[0-100]	12.1 ± 15.6	7.6 ± 9.5	10.6 ± 14.1	0.010
Tension	[0-100]	17.8 ± 4.8	17.6 ± 5.2	17.7 ± 4.9	0.803
Activité	[0-100]	26.3 ± 6.5	27.6 ± 6.1	26.7 ± 6.4	0.153
Inconfort	[0-100]	67.7 ± 24.6	4.5 ± 15.2	47.1 ± 36.9	< 0.001

Dépression					
BDI score	[0-63]	6.1 ± 5.3	5.5 ± 4.5	6.0 ± 5.1	0.438
Stress chronique (sous-score de l'échelle TICS)					
Work Overload	[0-32]	8.2 ± 2.4	8.0 ± 2.4	8.1 ± 2.4	0.667
Social Overload	[0-24]	6.5 ± 2.7	6.7 ± 2.6	6.6 ± 2.7	0.638
Excessive Demands	[0-24]	5.8 ± 2.3	6.1 ± 2.0	5.9 ± 2.2	0.343
Lack of social appreciation	[0-16]	6.3 ± 2.2	6.5 ± 2.2	6.4 ± 2.2	0.492
Dissatisfaction at work	[0-32]	6.6 ± 2.3	6.5 ± 2.4	6.5 ± 2.3	0.713
Social Tensions	[0-24]	6.0 ± 2.2	6.4 ± 2.1	6.2 ± 2.2	0.216
Pressure of success	[0-36]	7.6 ± 2.2	7.5 ± 1.9	7.6 ± 2.1	0.976
Social Isolation	[0-24]	6.8 ± 2.4	6.8 ± 2.8	6.8 ± 2.5	0.939
Chronic worrying	[0-16]	7.5 ± 2.6	7.6 ± 2.5	7.5 ± 2.5	0.957

Des scores sur l'échelle Beck Depression Index (BDI scores 10–18) ont montré une dépression légère pour 22 participants et une dépression modérée à sévère pour 4 participants (BDI scores >18). Selon les recommandation cliniques pour le diagnostic de l'obésité (L., and Blood Institute (NHLBI) 2000), 2 sujets étaient classés obèses (BMI>30) et 24 étaient en surpoids (BMI: 25.0-29.9). Ils sont distribués de façon équilibrée entre les deux groupes.

D'un point de vue général, aucune différence significative n'a été retrouvée à baseline entre le groupe CPT et le groupe contrôle, excepté l'anxiété et inconfort qui étaient liés à l'anticipation du test de stress. Ainsi les deux groupes sont équilibrés et la comparabilité à l'inclusion est bien vérifiée.

2.2.2 Analyse des données de méthylation

La méthylation de l'ADN est un phénomène global. Ainsi il a été évalué dans cette étude comme la somme de la méthylation des promoteurs 1F et 1H du gène du GR. La même approche a été utilisée précédemment pour de nombreuses études. Néanmoins, cette étude est la première à notre connaissance à avoir mesuré le niveau de méthylation de ces promoteurs dans une cohorte. Par conséquent, nous avons analysé la distribution des variables graphiquement par des histogrammes (Figure 7) et kernel density plots, qui constituent en général un moyen plus efficace d'estimer la distribution d'une variable que les histogrammes (Figure 8).

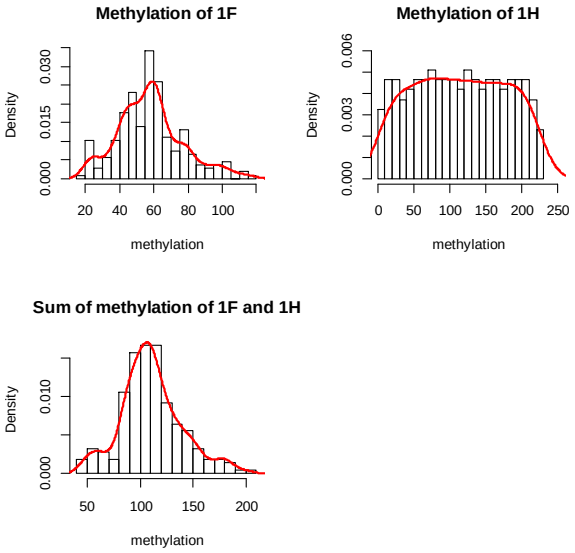


Figure 9: histogrammes de la variable méthylation de 1F, 1H et somme de 1F et 1H.

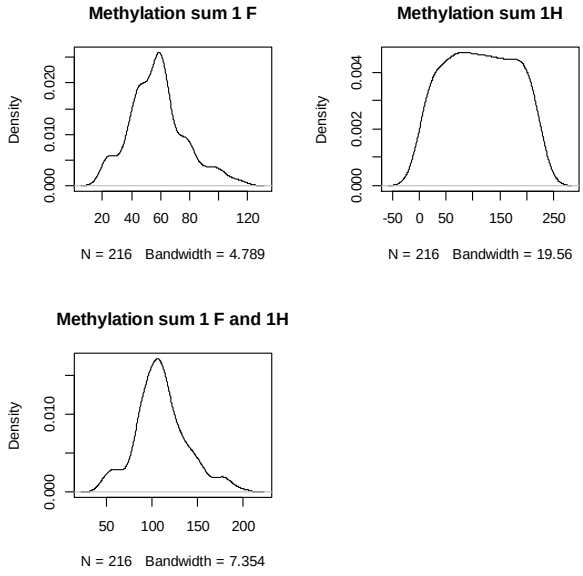


Figure 8: Kernel density plots of 1F, 1H et somme de F et 1H

Ni la méthylation de 1F ni 1H ni la somme de 1F et 1H ne suivaient une distribution normale selon les représentations graphiques. Les tests de normalité Shapiro-Wilks et Kolmogorov-Smirnov étaient significatifs pour ces trois variables ($p<0.001$) indiquant leurs distributions s'écartent de la normalité de façon significative. Néanmoins il convient d'évaluer avec précaution les résultats de ces deux tests, en particulier lorsque la taille de la population est importante, comme c'est le cas ici.
Puisqu'aucune des transformations des variables mesurant la méthylation n'a permis d'aboutir à une distribution normale, la méthylation a été traité en tant que variable binaire, sur la base d'une répartition selon la médiane.

Les sous-groupes de méthylation qui en résultent étaient équilibrés selon le genre comme le montre le tableau ci-après.

Tableau III: répartition selon le sexe par groupe de méthylation et par groupe de randomisation

	Hommes n (%)	**Femmes n (%)**	**Population totale n (%)**
Méthylation faible	60 (56.07)	47 (43.93)	107 (49.08)
Groupe test	42	31	73
Groupe contrôle	18	16	34
Méthylation élevée	44 (39.64)	67 (60.36)	111 (50.92)
Groupe test	27	31	73
Groupe contrôle	17	21	38

De plus, la comparabilité des groupes de méthylation faible et méthylation élevée à baseline a été testée par des t-tests et ANOVA à un facteur. **Aucune**

différence significative n'a été montrée entre les sous-groupes de méthylation (tableau 4).

Tableau IV: Différences à baseline, au niveau des évaluations subjectives selon les groupes de méthylation

	Moyenne dans la population globale ± sd	**p value de la différence entre les sous-groupes de méthylation**
Stress		
Avant le CPT	24.36 ± 21.63	0.146
Après le CPT	28.04 ± 25.62	0.103
Eveil		
Avant le CPT	23.87 ± 19.53	0.513
Après le CPT	31.70 ± 25.44	0.188
Anxiété		
Avant le CPT	10.59 ± 14.05	0.518
Après le CPT	11.62 ± 15.06	0.674
Activité		
Avant le CPT	26.78 ± 6.38	0.511
Après le CPT	28.70 ± 5.62	0.674
Tension		
Avant le CPT	17.72 ± 4.93	0.635
Après le CPT	19.34 ± 5.56	0.748

L'ANOVA simple menée dans les deux sous-groupes de méthylation à baseline n'a montré aucun effet significatif des variables stress, éveil, tension, nervosité et activité. Des résultats similaires ont été obtenus dans les deux groupes CPT et contrôle.

2.2.3 Effet du CPT (Réponse au stress)

L'analyse de variance simple des différences selon les groupes a montré une comparabilité des groupes à baseline. Par conséquent les modifications de ces variables au cours du temps peuvent vraisemblablement être interprétées en lien avec l'intervention (test de stress). A baseline, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux groupes en ce qui concerne la moyenne des PAS et PAD ni RC, comme résumé dans le tableau 5.

Tableau V: pression artérielle à baseline (PAS and PAD) et rythme cardiaque (HR) dans les deux groupes CPT et contrôle (means ± sd) (t.tests)

	Groupe test	Groupe contrôle	Population totale	p value de la différence entre groupe CPT et groupe contrôle
PAS	112.90 ± 10.82	114.24 ± 10.57	113.35 ± 10.74	0.385
PAD	65.22 ± 6.86	65.43 ± 6.78	65.29 ± 6.81	0.829
RC	70.08 ± 9.75	69.49 ± 11.42	69.89 ± 10.30	0.716

Le time point 4 correspond au début du CPT. Comme il a été précédemment montré (Leserman 1998), l'évolution de la pression artérielle systolique et diastolique au cours du temps reflète clairement la réponse au stress induite par le CPT dans les deux groupes de randomisation. La figure 10 montre que l'augmentation de PAS après le début du test de stress est beaucoup plus importante dans le groupe test (CPT) que dans le groupe contrôle.

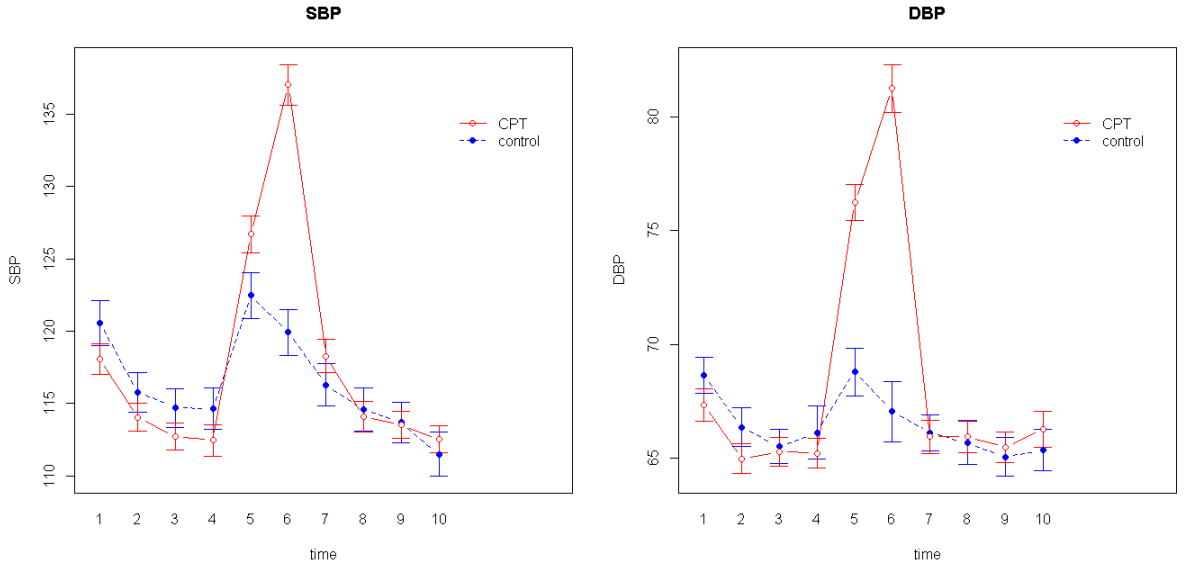


Figure 10: lineplots avec intervalle de confiance à 95% de l'évolution de la PAS (gauche) et PAD (droite) par groupe (CPT en rouge et groupe contrôle en bleu).

Pour évaluer l'effet du CPT, l'augmentation moyenne et la diminution moyenne de la PAS et de la PAD ont été calculées pour chaque participant, par la différence entre le maximum de PAS ou PAD durant le CPT (time point 6) et la moyenne à baseline (time points 2, 3 et 4) ou durant la période de récupération (time points 7, 8 et 9). Comme attendu, nous avons trouvé une augmentation significative (17.72 ± 14.39 mm Hg) de PAS comparée à la PAS moyenne à baseline ($p<0.0001$). Cette augmentation est beaucoup plus importante dans le groupe test (24. 16 ± 14.35mm Hg) que dans le groupe contrôle (4.74 ± 8.52 mm Hg). 2 outliers ont été identifiés (en utilisant le test *chisq.out.test du package outlier*) et n'ont pas été inclus dans l'analyse de PAS et un outlier pour la PAD.

Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature même si l'augmentation est légèrement plus élevée pour PAS que le valeur supérieur du range qui est de 22 mm Hg pour PAS et 18 pour PAD (Kunrath, J 2013).

Tableau VI: oscillations moyennes de PAS et PAD entre les périodes de repos et la période de stress d'une part et entre la période de stress et la période de récupération d'autre part. L'augmentation a été évaluée par la différence entre CPT (time point 6) et baseline (moyenne des time points 2,3,4). La diminution fait référence à la différence entre la PA de la période de récupération (moyenne des time points 7,8,9) et le CPT (time point 6).

	Groupe CPT		**Groupe contrôle**		**Population totale**	
	Mean, sd	p value	Mean, sd	p value	Mean, sd	p value
Augmentation de PAS	24.16 ± 14.35	<0.0001	4.74 ± 8.52	<0.0001	17.72 ± 14.39	<0.0001
Diminution de PAS: après le CPT vs PAS6	21.87 ± 13.61	<0.0001	4.86 ± 7.77	<0.0001	16.21 ± 13.07	<0.0001
Augmentation de PAD: PAD6 vs baseline	15.88 ± 10.12	<0.0001	1.07 ± 8.79	<0.0001	10.99 ± 11.94	<0.0001
Diminution de PAD: après le CPT vs PAD6	15.17 ± 8.93	<0.0001	1.48 ± 8.94	<0.0001	10.65 ± 11.00	<0.0001

De plus, les niveaux de PAS sont significativement plus élevés chez les hommes que chez les femmes à baseline, durant le CPT et au cours de la période de récupération comme précédemment montré dans la Figure 11. Néanmoins, l'évolution semble être parallèle chez les hommes et les femmes au cours du temps, suggérant l'absence de tout effet genre sur la réponse au stress mesurée par la PAS.

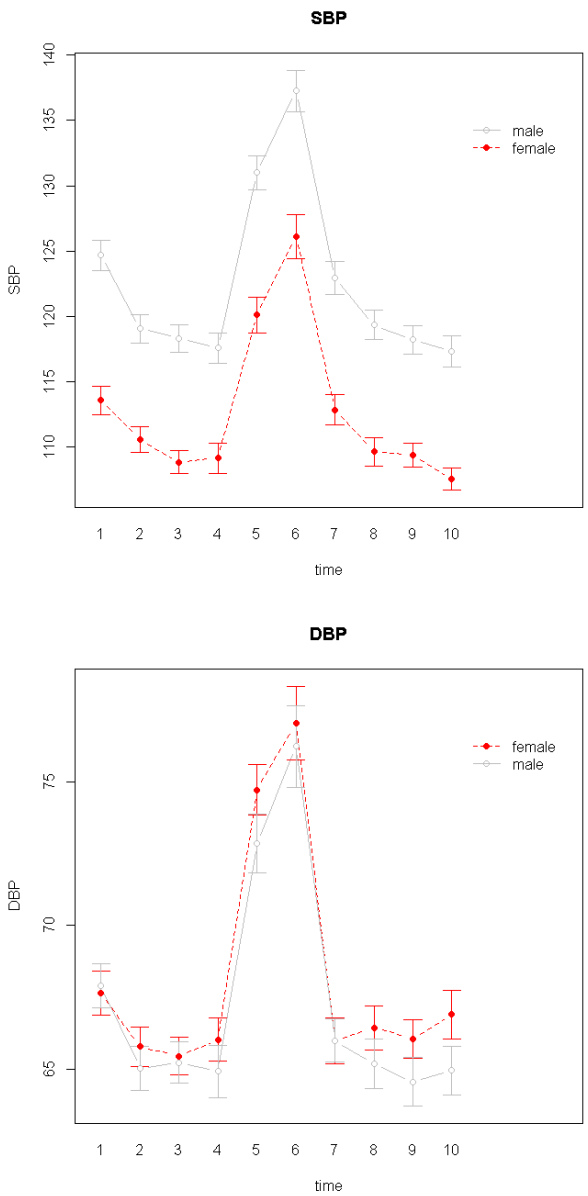


Figure 11: lineplots avec intervalles de confiance à 95% de l'évolution au cours du temps de la PAS et PAD par genre et dans la population totale (groupe CPT et groupe contrôle)

De façon similaire, il y a une différence claire dans la réponse au stress mesurée par la PAS dans chaque sous-groupe, comme le montre la Figure 12.

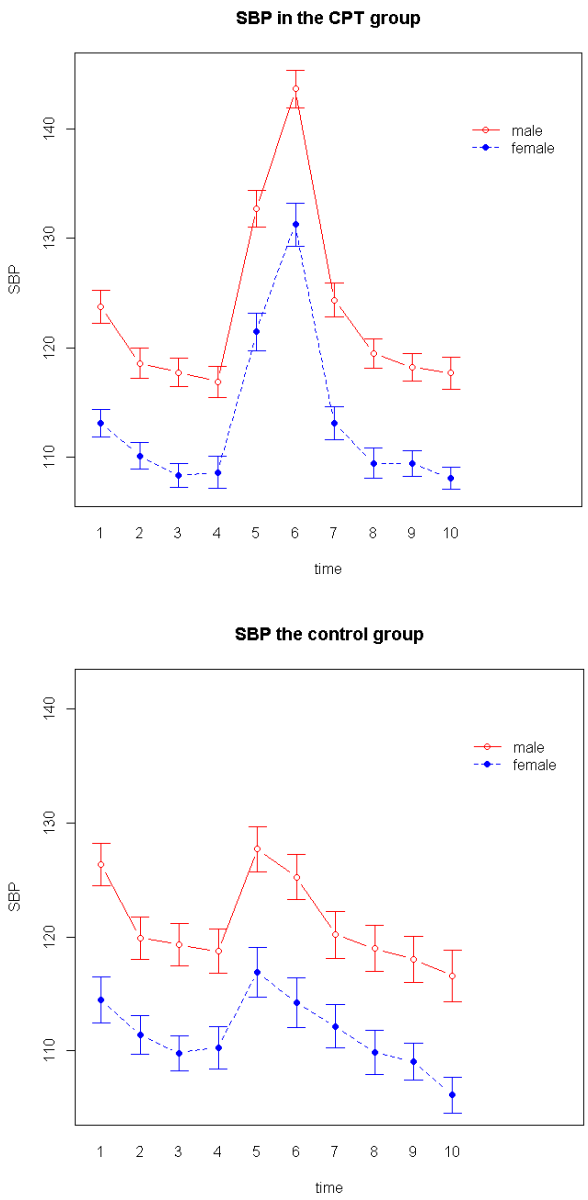
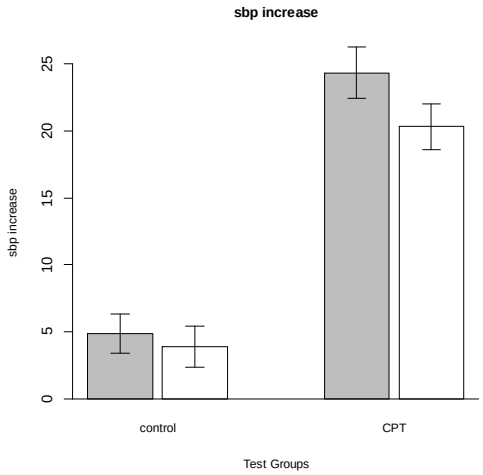
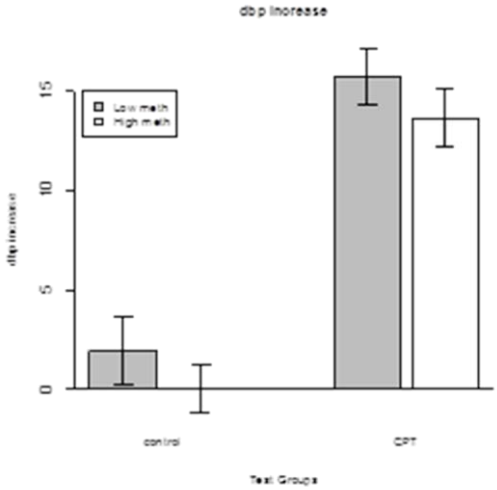


Figure 12: lineplots de l'évolution de PAS avec intervalle de confiance à 95% dans le groupe CPT et le groupe contrôle par genre

Comme le confirme la Figure 13, le CPT induit un stress illustré par une augmentation de PAS et de PAD qui a été naturellement beaucoup plus élevé dans le groupe test que dans le groupe contrôle. On peut constater dans les deux groupes, CPT et contrôle, que l'augmentation de PAS est plus élevée dans le sous-groupe à faible méthylation. Cela suggère une corrélation négative entre le niveau de méthylation et la réponse au stress basée sur la PAS. Cette tendance semble également se confirmer par l'augmentation de PAD même si celle-ci n'a pas atteint le niveau de significativité





.

Figure 13: diagramme en bâtons de l'augmentation de PAS et PAD par groupe de randomisation et par sous-groupe de méthylation avec intervalle de confiance à 95%

De plus, une augmentation significative du rythme cardiaque a été observée (p= 0.006) entre le groupe CPT et le groupe contrôle. Par contre, aucune différence significative n'a été trouvée pour le rythme cardiaque entre les deux sous-groupes de méthylation.

- ***Analyse de covariable***
  - ***Analyse des évaluations subjectives***

Parmi les 5 mesures utilisant les échelles visuelles analogiques avant et après le CPT, quatre ont montré une augmentation moyenne significative après le CPT comparé à baseline: stress (p=0.023), éveil (p<0.001), activité (p<0.001) et tension (p=0.0014) dans la population totale. Dans le groupe CPT, une augmentation significative a été observée pour 5 échelles comme décrit dans le tableau 7.

Tableau VII: scores des échelles subjectives dans le groupe test (paired t- tests)

Echelles	**Avant le CPT Mean ± sd**	**Après le CPT Mean ± sd**	**p value de la différence avant vs après le CPT**
Stress	25.21 ± 21.85	35.73 ± 25.65	0.023
Eveil	24.12 ± 19.37	39.96 ± 25.02	< 0.001
Anxiété	12.05 ± 15.65	14.46 ± 16.29	< 0.01
Activité	26.37 ± 6.49	29.22 ± 5.49	< 0.001
Tension	17.77 ± 4.82	20.80 ± 5.49	< 0.01

Comme précédemment mentionné dans la section 2.2.1, les évaluations subjectives à baseline étaient comparables entre les deux groupes de méthylation. Comme attendu, la comparaison des participants des groupes

contrôle et CPT montre une augmentation significative de tous les scores de ces échelles comparé à baseline. Aucune différence significative n'a été observée ni par genre, ni par groupe de méthylation, suggérant l'absence d'interaction du genre et du niveau de méthylation avec le stress, l'éveil, l'anxiété, l'activité et la tension.

Tableau VIII: Changement dans les scores des échelles subjectives après versus avant le CPT

	Différence selon le genre p values	Différence selon le groupe de randomisation p values	Différence selon le groupe de méthylation p values
Stress	0.501	< 0.001	0.660
Eveil	0.283	< 0.001	0.381
Anxiété	0.057	0.0032	0.786
Activité	0.935	< 0.001	0.739
Tension	0.998	< 0.001	0.916

○ *Analyse de la dépression et stress chronique*

- *Evaluation du stress chronique: validation de l'échelle TICS dans la population de cette étude*

En utilisant les données de l'étude, cette échelle a été validée graphiquement par une représentation de la matrice de corrélation, le diagramme des valeurs propres et numériquement en utilisant le coefficient de Cronbach. La représentation graphique de la matrice de corrélation (Figure 14) permet d'évaluer la corrélation entre les items. Ici on a observé que certains items de l'échelle TICS semblent corrélés les uns avec les autres, ce qui est cohérent avec un lien potentiel entre les différents facteurs de stress chroniques évalués. Cela montre que l'interprétation des données groupées en sous-scores est pertinente.

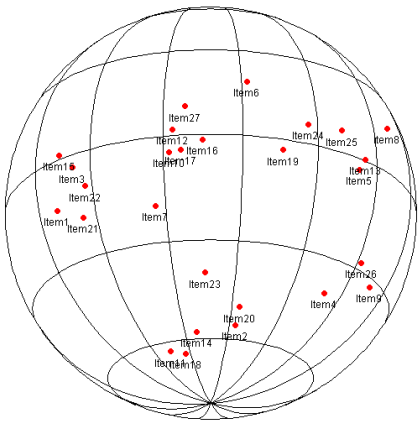


Figure 14: représentation graphique d'une matrice de corrélation entre les items de l'échelle TICS

La représentation graphique des valeurs propres a été utilisée pour déterminer la structure dimensionnelle de ce jeu de variables. La représentation des valeurs

propres confirmée par le scree plot (Figure 15) a clairement montré que quatre dimensions émergent.

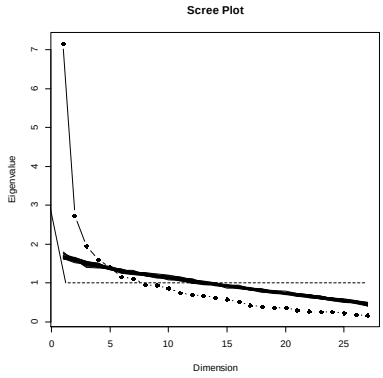


Figure 15: valeurs propres d'une matrice de corrélation

Une analyse en maximum de vraisemblance sur une matrice de covariance a été menée pour identifier les variables latentes. Ces variables pourraient expliquer la variabilité en regroupant la variance partagée entre certaines covariables. Cette analyse a confirmé que 4 dimensions peuvent être identifiées dans cette échelle. Ce nombre de dimensions n'est pas cohérent avec les 9 sous-scores évalués dans cette étude. C'est pourquoi la même analyse a été conduite respectivement sur les items de chaque sous-échelle. Ces sous-échelles sont unidimensionnelles. Aucun de ces items n'a été fortement corrélé et l'analyse factorielle n'a pas montré de dimension dominante dans la sous-échelle. Par conséquent, seuls les sous-scores ont été inclus dans les analyses suivantes. La cohérence interne de l'échelle TICS a été mesuré par le coefficient α de Cronbach et son intervalle de confiance estimé par bootstrap: 0.88; 95% CI [0.87;0.91] (*utilisant la fonction cronbach du package "psy"*). Pour un questionnaire, il est généralement admis qu'un coefficient supérieur à 0.7 est acceptable (Bernstein, N.a 1994). Ainsi la cohérence interne de l'échelle TICS indique une bonne robustesse.

- *Validation de l'échelle Beck Depression Inventory (BDI)*

Le BDI, qui est l'une des échelles de dépression les plus utilisées, a été choisi pour évaluer le niveau de dépression potentiel et la sévérité de la dépression des participants. Le nombre de données manquantes non aléatoirement, relativement élevé, est dû à un amendement au protocole durant l'étude qui a conduit à l'ajout du questionnaire BDI. Ainsi le score de BDI n'est pas disponible pour les 55 premiers patients inclus. Aucune donnée aberrante n'a été identifiée. La distribution du score global BDI est présentée dans le tableau ci-dessous:

Tableau IX : distribution du score global BDI

Median	Mean	Min	Max.	Sd
5	6.11	0	26	5.15

Selon les valeurs seuils suivantes issues de Beck et al., (Beck, A 1988), une dépression légère (BDI de 10 à 18) a été retrouvée chez 25 sujets (16.7% de la

population évaluée) et une dépression modérée (score de 19 à 29) chez 4 sujets. Aucune dépression sévère n'a été retrouvée dans la population (30−63). Par conséquent, la population peut effectivement être considérée comme une population de volontaires sains. Le diagramme des valeurs propres (Figure 16) confirme l'hypothèse d'unidimensionnalité de l'échelle.

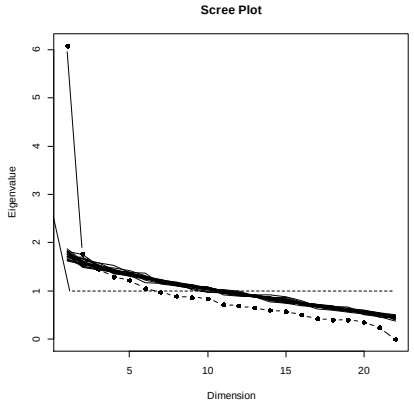


Figure 16 : diagramme des valeurs propres de la matrice de corrélation

Le coefficient de Cronbach est de 0.83 avec un intervalle de confiance de [0.77;0.86]. Ainsi on estime que la cohérence interne de l'échelle BDI est bonne.

2.2.4 Analyse bivariée

Une représentation sphérique de la matrice de corrélation a été réalisée afin de rechercher les corrélations éventuelles entre les covariables. Une colinéarité, ou corrélation excessive, parmi les variables explicatives pourrait perturber la définition d'un jeu optimal de variables explicatives pour le modèle, augmentant ainsi la variance des coefficients de régression. En effet, plus la variance est élevée, plus l'interprétation des coefficients est difficile. Par conséquent, la multi-colinéarité a été évaluée numériquement en utilisation le facteur d'inflation de la variance (VIF) et graphiquement par des scatterplots. Un coefficient de corrélation r supérieur à 0.8 associé à une p value < 0.05 est considéré comme indiquant une colinéarité significative. Nous avons trouvé que les variables :

- inconfort (discomfort) et intensité (intensity) d'une part et
- Somatisation Index (SI DSM-IV and SI ICD-10) mesuré par les systèmes de classification DSM-IV et ICD 10, et Somatoform autonomic dysfunction (SAD) et le complaint index (BI Soma) d'autre part sont fortement et significativement corrélées comme l'ont montré les scatterplots suivants.

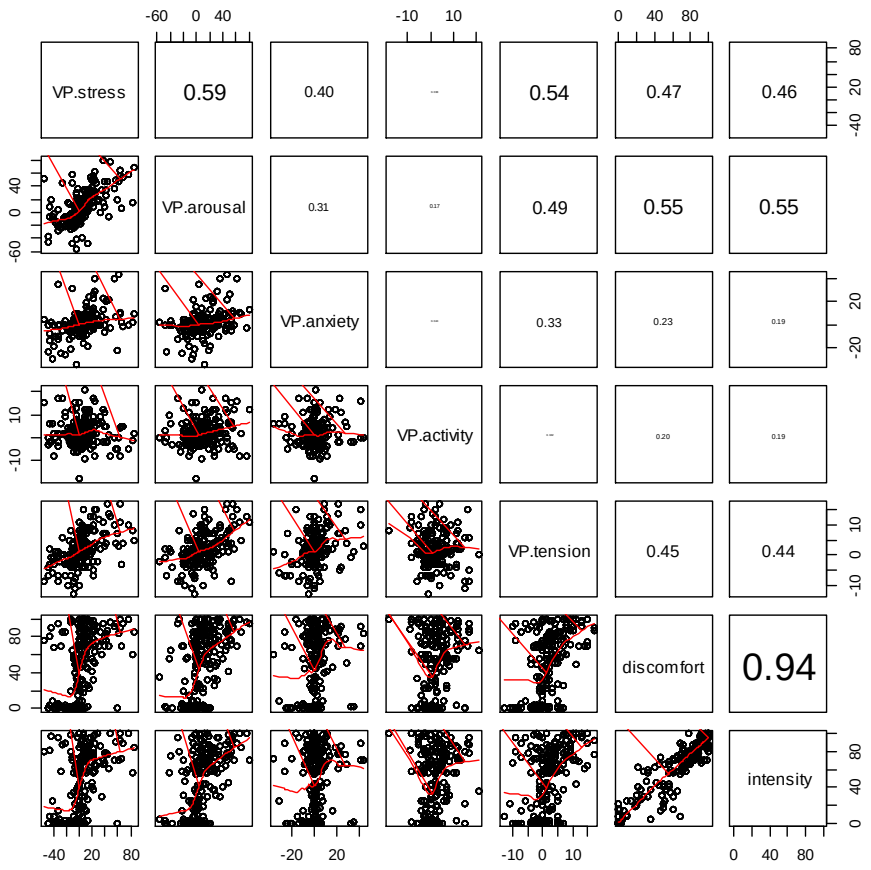


Figure 17: scatterplot des corrélations entre les covariables issues des échelles d'évaluation subjective

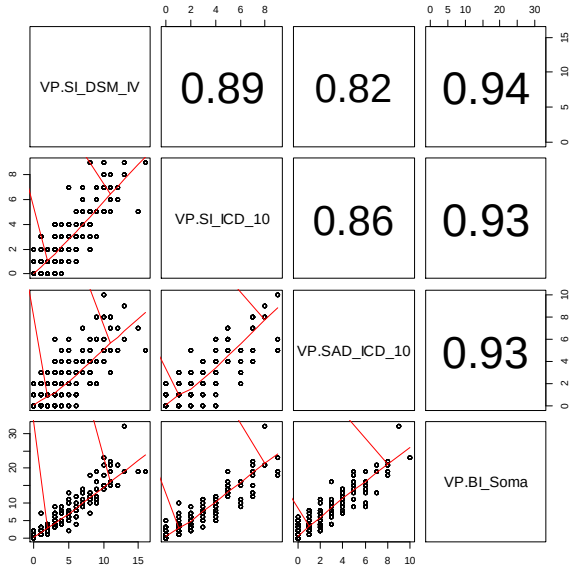


Figure 18: scatterplot de l'index de somatisation (SI DSM-IV et SI ICD-10) évalué via les systèmes de classification DSM-IV et ICD 10, Somatoform autonomic dysfunction (SAD) et complaint index (BI Soma)

L'analyse en composantes principales (ACP) focalisée confirme la corrélation entre le complaint index (BI Soma) et l'index de somatisation (SI ICD 10 et SI DSM IV)

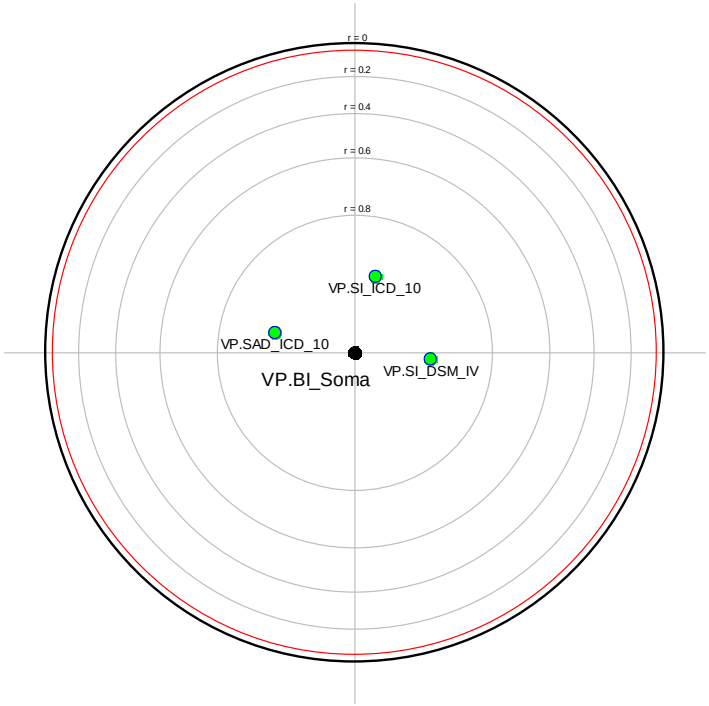


Figure 19: ACP focalisé des troubles somatoformes : la variable VP.SI_ICD_10 correspond à l'index de somatisation dans le système de classification ICD10, la variable VP.SAD_ICD_10 correspond à Somatoform Autonomic Dysfunction , la variable VP.BI_Soma au complaint index et la variable VP.SI_DSM_IV à l'index de somatisation dans le système de classification DSM IV.

De plus, le VIF a été utilisé pour identifier la multico-linearité parmi les variables explicatives. Les valeurs de VIF supérieures à 5 sont considérées comme preuve de multi-colinearité. Nous avons trouvé un problème de multi-colinearité pour les covariables suivantes: tension, intensité, inconfort, SAD, BI Soma, SI DSM IV, SI ICD 10.

L'approche qui a été utilisée pour réduire la multi-colinearité est l'analyse en composantes principales: les fonctions *princomp* et *principal* du package *psych* et *varimax rotation*. La méthode de régression a permis de réduire le nombre de prédicteurs à un plus petit jeu de composants non corrélés. Parmi les prédicteurs fortement corrélés: tension, intensité et inconfort, la proportion de variance expliquée par la variable inconfort était de 95%. Parmi les 4 autres prédicteurs fortement corrélés: SAD, SI mesuré selon différents systèmes de classification et le complaint index (BI Soma), l'analyse en ACP a montré que le complaint index explique 99% de la variance. **Par conséquent, ces deux covariables, complaint index et inconfort, ont été incluses dans l'analyse bivariée, puis dans l'analyse multivariée** (si une corrélation avec les variables dépendantes a émergé de l'analyse bivariée).

Les tests de corrélation et t-tests réalisés sur l'augmentation, la diminution et le pic de PAS nous ont conduit à retenir, pour le modèle multivarié, les covariables qui ont montréune corrélation significative ou au t-test $p < 0.05$ ou test de

corrélation r ≥0.3. L'homogénéité des variances dans les deux groupes a été testée par un test de Levene pour chaque comparaison, afin de sélectionner l'option correspondante pour le t-test.

Tableau X: coefficients de corrélation de Pearson et p-values des t-tests et tests de corrélation

	Augmentation de PAS		**Diminution de PAS**		**PIC de PAS**	
	r	p value	r	p value	r	p value
Groupe de randomisation		< 2.2e-16		< 2.2e-16		2.27e-15
Groupe de méthylation						0.008
Sexe						3.86e-07
Eveil après le CPT	0.40	1.37e-09	0.43	3.25e-11		
Modification de l'éveil	0.43	2.89e-11	0.46	7.97e-13	0.3	9.28e-06
Modification de la tension	0.31	2.23e-06	0.34	2.63e-07		
Modification de l'inconfort	0.51	1.11e-15	0.51	8.88e-16	0.35	1.06e-07
Stress après le CPT			0.33	8.48e-07		
Modification du stress			0.36	9.07e-08		

Les covariables suivantes devraient être incluses: groupe de randomisation, groupe de méthylation, sexe, éveil après le CPT, modification de l'éveil, modification de la tension, modification de l'inconfort, stress après le CPT et modification du stress. Les covariables stress et éveil, respectivement mesurées après le CPT et mesurés comme modification comparé à baseline sont fortement corrélés. Seules les modifications les plus pertinentes ont été utilisées dans l'analyse multivariée. Il y a une corrélation significative négative entre PAS et la somme de méthylation de 1F et 1H (r= -0,26, p= 0.0014) comme l'illustre la Figure 20. La corrélation entre PAD et la somme de méthylation est plus faible et non significative (r= -0.12 ; p= 0.145). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés uniquement à la variable PAS dans les analyses suivantes.

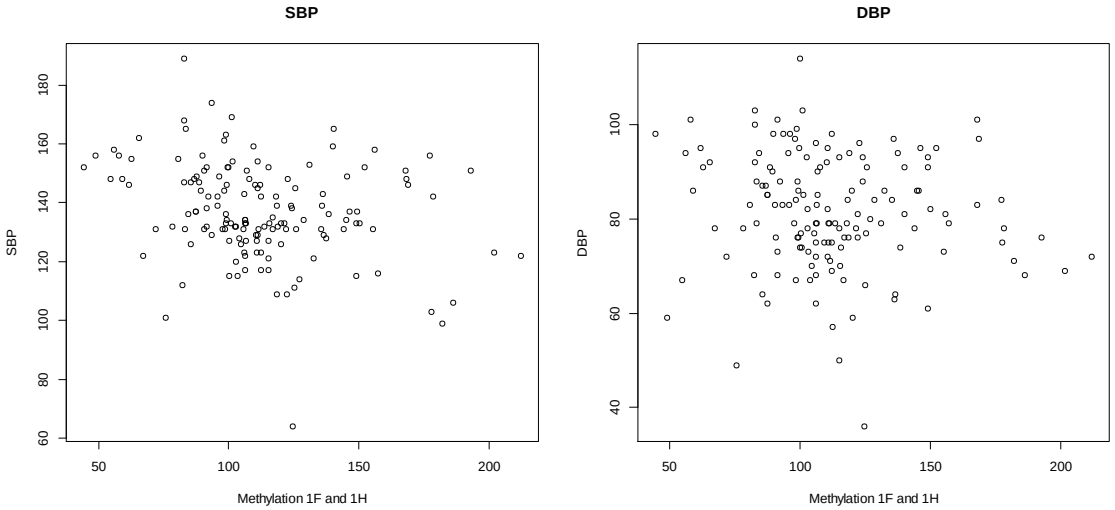


Figure 20: corrélation entre PAS (gauche) et PAD (droite) et le niveau de méthylation

2.2.5 Analyse multivariée:

Les variables dépendantes "réponse" PAS et PAD ont été mesurées de façon répétée au cours du temps pour savoir si leur augmentation de la période de repos initiale jusqu'à leur valeur maximale durant le CPT était associée à d'autres covariables, en particulier au groupe de méthylation.

Une ANOVA de type I a été réalisée respectivement pour l'augmentation (Tableau 10) et la diminution (Tableau 11) de PAS en tant que variable dépendante et groupe de méthylation, groupe de randomisation, sexe, stress, éveil, modification de la tension et inconfort en tant que covariables. L'augmentation et la diminution de PAS sont significativement différentes selon ces covariables comme l'illustre le tableau ci-après.

Tableau XI: ANOVA de l'augmentation de la PAS de la période de repos initiale (baseline) au pic durant le CPT.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Groupe de méthylation	1	6542	6542	45.107	2.52E-11
Groupe de randomisation	1	147710	147710	1018.45	< 2e-16
Sexe	1	5130	5130	35.369	3.29e-09
Stress	1	661	661	4.559	0.003
Eveil	1	16516	16516	113.812	< 2e-16
Tension	1	956	956	6.589	0.0103
inconfort	1	610	610	4.203	0.0404
groupe de méthylation: groupe randomisation	1	1517	1517	10.454	0.0038
groupe de méthylation: éveil	1	509	509	3.508	0.0612
test groupe: éveil	1	1800	1800	12.411	0.0004
groupe de méthylation:test groupe: éveil	1	967	967	6.666	0.00989
Résidus	1732	251199	145		

Tableau XII: ANOVA de la diminution de PAS du pic atteint durant le CPT à la valeur moyenne au cours de la période de récupération

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Groupe de méthylation	1	2316	2316	18.64	1.65E-05
Groupe de randomisation	1	147246	147246	1185.16	< 2e-16
Sexe	1	3921	3921	31.56	2.18E-08
Stress	1	8294	8294	66.76	5.19E-16
Eveil	1	12641	12641	101.74	< 2e-16
Tension	1	1018	1018	8.19	0.004
Inconfort	1	609	609	4.90	0.027
groupe de méthylation: groupe randomisation	1	24	24	0.19	0.658
groupe de méthylation:sexe	1	1071	1071	8.62	0.003
groupe de randomisation: sexe	1	864	864	6.95	0.008
Groupe de méthylation:groupe de randomisation:patient: sexe	1	908	908	7.31	0.007
Résidus	2148	266869	124		

- ***Analyse de variance sur mesures répétées (RM ANOVA)***

Sur la base d'une étude réalisée précédemment (Wierda, R.J 2010) nous avons utilisé une analyse de variance de type I sur mesures répétées pour PAS, PAD et RC. Dans ce type d'analyse, les variables : groupe de randomisation, sexe, modification des évaluations subjectives ont été incluses comme facteurs inter-sujets. Nous avons ajouté un effet temps de mesure et un effet sujet comme facteurs aléatoires (terme d'erreur) pour prendre en compte la variabilité intra-sujet.

Ce design permet de diminuer la variation due aux différences entre les sujets inclus dans les deux groupes. L'hypothèse de sphéricité requise pour réaliser ce test a été vérifiée par le test de *Mauchly, test* qui fait l'hypothèse de l'égalité des

variances entre les différentes conditions. La sphéricité fait référence à l'homogénéité des variances des différences entre les niveaux des mesures répétées. Puisque les données ne vérifiaient pas l'hypothèse de sphéricité (p value < 0.05), une correction a été appliquée sous forme d'un ajustement du nombre de degrés de liberté. Par ailleurs, le coefficient epsilon était inférieur à 0.75 donc l'ajustement de Greenhouse-Geisser a été utilisé. Les tests post-hoc TukeyHSD (Tukey Honest Significant Differences) du package *base* ont été utilisés pour ajuster le niveau de significativité pour contrôler l'erreur de type I.

L'effet principal significatif du temps (F=5.371; p=0.0205) et du groupe de randomisation (F=6.687 ; p=0.0097) et l'interaction significative temps x groupe (F=4.613 ; p=0.0318) a montré clairement que l'augmentation de PAS a été significativement plus élevée dans le groupe CPT que dans le groupe contrôle. L'effet principal du groupe de méthylation a été également significatif tout comme l'interaction méthylation groupe x groupe de randomisation.

Tableau XIII: anova sur mesures répétées pour PAS; p values sont ajustées après test post hoc Tukey

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Groupe de méthylation	1	5291	5291	31.225	< 0.001
Temps	1	910	910	5.371	0.0205
Groupe de randomisation	1	1133	1133	6.687	0.0097
Sexe	1	40669	40669	240.003	< 0.001
Stress	1	3	3	0.018	0.8941
Eveil	1	2252	2252	13.291	0.0002
Tension	1	1175	1175	6.932	0.008
Inconfort	1	1943	1943	11.466	0.0007
Groupe de méthylation:temps	1	44	44	0.261	0.6092
Groupe de méthylation:groupe de randomisation	1	786	786	4.636	0.0314
temps: groupe de randomisation	1	782	782	4.613	0.0318
Groupe de méthylation:temps: groupe de randomisation	1	69	69	0.408	0.5230

Comme attendu, des résultats similaires ont été observés pour la PAD. L'effet principal du groupe de randomisation et du groupe de méthylation étaient aussi significatifs (p<0.001). Néanmoins, ni l'effet principal du temps (F=0.019; p=0.89) ni l'interaction temps x groupe (p=0.07) n'était significatifs.

Tableau XIV: anova sur mesures répétées pour PAD, p values ajustées après test post hoc de Tukey

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Groupe de méthylation	1	2564	2564.3	29.342	< 0.001
Temps	1	2	1.7	0.019	0.8906
Groupe de randomisation	1	3100	3100.4	35.476	< 0.001
Sexe	1	334	334.0	3.822	0.0507
Stress	1	45	44.8	0.513	0.4740
Eveil	1	952	952.4	10.897	0.0009
Tension	1	39	39.0	0.447	0.5039
Inconfort	1	1140	1140.0	13.045	0.0003
Groupe de méthylation:temps	1	7	7.5	0.085	0.7702
Groupe de méthylation: groupe de randomisation	1	6	6.3	0.072	0.7881
temps:groupe de randomisation	1	278	278.1	3.183	0.0745
Groupe de méthylation :temps:groupe de randomisation	1	100	100.3	1.148	0.2841

L'inconvénient de l'analyse de variance sur les mesures répétées est la perte d'information. En effet, elle compare uniquement les moyennes des valeurs répétées, conduisant à une perte de puissance importante étant donné que la forme du profil des mesures répétées n'est pas prise en compte.

- ***Modèle linéaire à effets mixtes***

Un modèle linéaire à effets mixtes a été utilisé pour analyser si la méthylation de l'ADN a un effet sur la réponse au stress. Cette approche est une façon de prendre en compte la variabilité intra-sujet. La PAS, variable dépendante mesurée, est une variable continue. Par conséquent, l'analyse principale a reposé sur un modèle de régression linéaire (fonction lme du package nlme) avec des effets mixtes. Ce modèle a été ajusté pour prendre en considération l'influence potentielle des covariables: genre, stress, éveil, tension, inconfort et temps de mesure (facteur de mesures répétées). Toutes ces covariables ont été incluses en tant qu'effets fixes, comme facteurs de variabilité inter-sujets. De plus, un effet sujet a été inclus comme effet aléatoire. Puisque les groupes de randomisation ne constituent pas des échantillons aléatoires issus d'une population à laquelle on souhaiterait généraliser les résultats, la variable "groupe de randomisation" a été incluse parmi les effets fixes.

Les interactions potentielles entre les variables "groupe de randomisation" et "temps" d'une part et "groupe de méthylation" et "temps" d'autre part, ont été évaluées, mais aucune n'était significative.

La sélection du modèle a été menée sur la base de l'estimation du maximum de vraisemblance. Une matrice auto-regressive a été choisie pour la structure de covariance des résidus.

Les résultats du modèle linéaire mixte ajusté par le maximum de vraisemblance restreint (option REML) confirment le fait que le niveau de méthylation a un effet significatif sur l'évolution de la PAS au cours du temps dans le cadre de ce test de stress (Tableau 15).

Tableau XV: Résultats du modèle mixte pour la variable dépendante PAS

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	114.1536	1.700865	1864	67.11506	0
Groupe de méthylation élevé	-2.36213	1.344495	199	-1.75689	0.0083
Temps	-0.37507	0.099813	1864	-3.75776	0.0002
Eveil	-0.05214	0.037367	199	-1.3954	0.0761
stress	0.02848	0.035385	199	0.80475	0.3964
Groupe randomisation : CPT	2.31255	1.652336	199	1.39957	0.2042

Pour la PAD, un effet significatif du niveau de méthylation a également été observé.

Tableau XVI: résultats du modèle mixte pour variable dépendante PAD

	Value	Std.Error	DF	t-value	p-value
(Intercept)	67.57217	1.066646	1864	63.35014	0
Groupe de méthylation élevé	-2.22491	0.942233	200	-2.36131	0.0192
Temps	-0.08529	0.068024	1864	-1.25386	0.2101
Eveil	-0.03184	0.026461	200	-1.20343	0.2302
stress	0.02525	0.02514	200	1.00441	0.3164
Groupe randomisation : CPT	2.55075	1.1741	200	2.17251	0.031

Pour valider ces modèles, il convient de vérifier la normalité des résidus et le fait qu'ils soient centrés sur zéro. La validation de ces deux modèles a été réalisée graphiquement: la distribution des résidus ne s'écarte pas trop de la normalité comme le montrent l'histogramme et le Q-Q plot. De plus, les résidus sont bien centrés sur zéro.

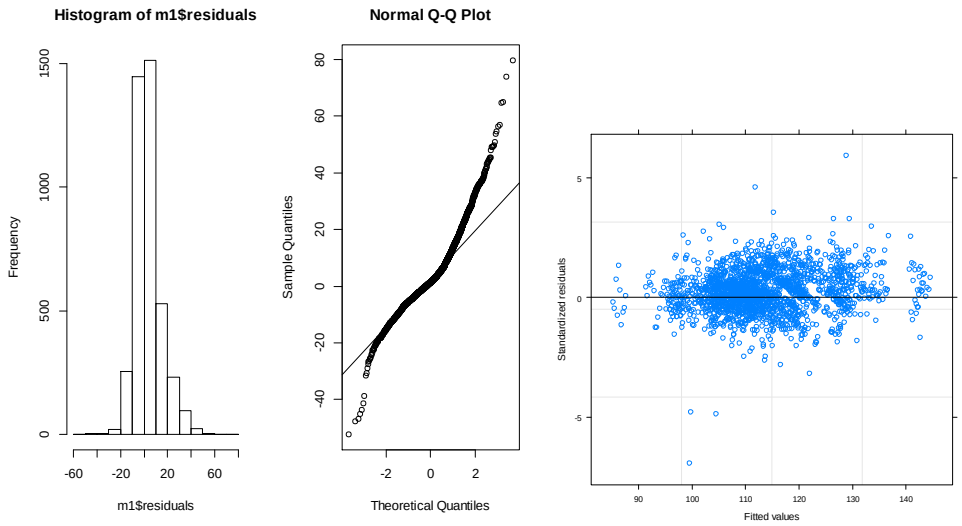


Figure 21: représentation des résidus du modèle mixte pour la PAS

2.3 Discussion

Cette étude, à notre connaissance, est la première à avoir évalué la méthylation de l'ADN des promoteurs du *GR* en fonction de la réponse au stress chez des volontaires sains. Nous avons étudié les conséquences induites par une exposition à un facteur de stress en utilisant le Cold Pressor test (CPT), en mesurant la pression artérielle diastolique, systolique et le rythme cardiaque. Ce test, a consisté en l'immersion de la main des participants dans de l'eau glacée, facteur bien connu pour induire un stress chez des volontaires sains, une activation du système nerveux sympathique et une augmentation de la pression artérielle. Wood et al, ont montré que ce test peut être utilisé comme un prédicteur du risque d'hypertension (Wood, D 1984).

La méthylation de l'ADN, qui représente la modification épigénétique la plus connue, est impliquée dans le développement normal des tissus et dans l'apparition de pathologies liées au stress. La régulation de l'expression du *GR,* en particulier dans le cerveau, est un mécanisme majeur de la réactivité au stress. Sur la base de travaux précédents du Groupe Psychoimmunologie, ayant montré une forte corrélation entre le niveau de méthylation du GR dans les PBMCs et dans les tissus de l'axe HPA (Witzmann, S 2012), dans cette étude nous avons utilisé la méthylation des PBMCs comme critère de substitution, pour refléter le niveau de méthylation d'autres éléments de l'axe HPA.

Puisque l'objectif de cette étude est d'évaluer la réponse au stress, cela implique nécessairement un design utilisant des mesures répétées.

Dans l'analyse bivariée nous avons montré une association significative entre le groupe de méthylation, défini par une répartition selon la médiane, et l'augmentation de la pression artérielle en réponse au test de stress CPT. Les covariables : groupe de randomisation, groupe de méthylation, sexe,

modification de l'éveil, tension, inconfort et modification du stress, qui étaient significativement corrélées avec l'évolution de PAS ou PAD dans l'analyse bivariée ont été incluses dans l'analyse multivariée. Pour expliquer l'évolution au cours du temps des variables dépendantes continues (PAS, PAD et RC) nous avons utilisé un modèle linéaire à effets mixtes.

La nécessité de combiner un effet aléatoire sujet à de nombreux effets fixes a conduit au choix d'un modèle à effets mixtes. Initialement, pour avoir une meilleure idée de la tendance des données, une ANOVA sur mesures répétées a été réalisée dans une analyse préliminaire. Nous avons montré que la méthylation des promoteurs 1F et 1H du GR ont un effet sur réponse au stress évaluée via la PAS. Ainsi, pour l'identification du risque de MCV nous nous sommes intéressés à des facteurs de risque largement étudiés: la PA et le RC. Il aurait pu être judicieux d'analyser également le profil lipidique des sujets et également des facteurs de risque moins connus tels que: l'haptoglobine (Holme I *et al*, 2010) et le VEGF.

La méthode de sélection de la population ne repose pas sur un échantillonnage aléatoire de la population générale mais sur la participation spontanée et volontaire. Cette méthode est susceptible d'induire un biais de sélection. Ainsi une extrapolation de nos résultats à la population générale n'est pas possible. Néanmoins, la randomisation des participants entre le groupe CPT et le groupe contrôle a permis d'assurer une comparabilité des deux sous-groupes à baseline. Les tests réalisés pour vérifier cette comparabilité n'ont montré aucune différence.

L'utilisation d'un test de stress validé permet une évaluation dans des conditions rigoureusement contrôlées ainsi qu'un contrôle des conditions externes qui rendant l'expérience reproductible et assurant de la fiabilité des résultats. Néanmoins, les conditions de stress induites par un test tel que le CPT, représentent un environnement expérimental et donc différent de celles de la vie réelle. Le niveau de stress observé dans le groupe contrôle pourrait être lié aux conditions du test de stress, réalisé dans un laboratoire et évalué par un chercheur, conditions qui ne sont pas naturelles pour les participants.

Ce design en mesures répétées présente de nombreux avantages. Evaluer les participants à différents moments de l'expérience représente un moyen d'utiliser chaque sujet comme son propre contrôle, et ainsi de réduire le nombre de sujets nécessaires. Cela constitue un moyen économique d'évaluer des participants dans les mêmes sessions expérimentales.

La principale faiblesse liée aux designs à mesures répétées est en général l'effet de testing ou effet d'ordre. Il s'agit d'un processus d'apprentissage qui se développe au cours de l'expérience. Par ailleurs, un design en aveugle était impossible à mettre en place ici car dès le début du test de stress, les participants pouvaient immédiatement comprendre en voyant la bassine d'eau s'ils appartenaient au groupe test (eau glacée) ou au groupe contrôle. Cette étude est conduite en ouvert dès les premières visites. Par conséquent, les participants inclus dans le groupe test, connaissant le sujet sur lequel porte l'étude (tout comme les sujets constituant le groupe témoin), pourraient chercher à aider le chercheur en donnant des réponses qu'ils pensent être les réponses attendues de l'étude, par exemple une augmentation de leur niveau de stress, d'éveil, de tension ou d'anxiété après le CPT comparé à baseline et l'absence d'augmentation est envisageable dans le groupe témoin. Cela pourrait affecter les résultats des covariables.

La variance des variables réponse PAS et PAD a été expliquée par les variances intra et inter-sujets. La variabilité inter-sujet a été exclue de l'erreur expérimentale pour faciliter la comparabilité entre les deux groupes.

Ainsi, en utilisant un protocole de test bien établi nous avons étudié l'effet du stress sur une cohorte de volontaires sains. Notre étude a révélé une association entre la méthylation de l'ADN des promoteurs 1F et 1H du gène du GR et la pression artérielle systolique, critère de substitution de la réponse au stress. Nous suggérons qu'un niveau de méthylation élevé de ces promoteurs du GR évalué dans les PBMCs pourrait constituer un biomarqueur de l'augmentation du risque d'apparition d'une altération de la réactivité au stress. De plus, il pourrait être intéressant d'étudier les causes de la méthylation de l'ADN. Il semble évident que celle-ci est influencée par des facteurs environnementaux. Par ailleurs, Neigh et al. ainsi que de nombreux autres auteurs ont montré qu'un stress subi durant la petite enfance pourrait conduire à une altération de la régulation de l'axe HPA (Neigh, G 2009). Par conséquent, les résultats de cette étude ont été pris en considération pour élaborer le design d'une deuxième étude portant sur la réponse au stress dans une population spécifique, pour laquelle le profil de méthylation de l'ADN pourrait avoir était altéré suite à ces conditions de stress.

3 SECTION 3: ETUDE EPIPATH

3.1 Scientific background - Rationnel, justification de l'étude

Comme précédemment mentionné il a été clairement démontré, d'une part que des antécédents d'ELA et de stress représentent des facteurs de risque pour des problèmes de santé publique majeurs et d'autre part, que la méthylation de l'ADN représente une interface entre le génome et l'environnement (Fraga, M 2005)(Szyf, M 2011a)(Bird, A 2007). D'un point de vue général des antécédents d'ELA sont associés à une altération de l'état de santé général par rapport à une population non exposée. Une attention particulière a été portée à une population de femmes souffrant de troubles gastro-intestinaux, symptômes fréquemment associés à des antécédents de maltraitance physique ou sexuelle. Ils ont montré que les femmes ayant subi ces abus étaient davantage susceptibles de rapporter des symptômes somatiques liés à la panique (par exemple palpitations, engourdissements, dyspnées), dépression (par exemple : troubles du sommeil), troubles musculo-squelettiques (par exemple céphalées, douleurs musculaires), troubles génito-urinaires, troubles cutanés et maladies respiratoires (Leserman, J 1998). Par la suite, ils ont montré que la sévérité des abus subis était associée au nombre de consultations médicales durant l'année suivante. Cette relation s'explique par le fait que les femmes ayant des antécédents de maltraitance, présentent une fréquence accrue de symptômes somatiques et handicaps fonctionnels par rapport à une population non exposée. De la même façon, Renee D. et al. (Renee, D 2003) ont décrit une association significative entre les abus subis durant l'enfance et l'augmentation de la vraisemblance des problèmes gastriques récurrents (OR=3.5; 95% CI=1.9, 6.4), migraine (OR=2.7; 95% CI=1.2, 5.8), et ulcère (OR=4.2; 95% CI=1.8, 10.0) à l'âge adulte.

Trois principales catégories de problèmes de santé publique, associés d'une part à l'ELA et d'autre part à la méthylation de l'ADN sont: les maladies cardiovasculaires, maladies mentales et infectieuses (abrégé CAMI). Comme décrit dans la section 1, la survenue des maladies cardiovasculaires telles que les maladies coronariennes sont associées à l'augmentation du niveau global de méthylation de l'ADN. La méthylation de l'ADN jouerait également un rôle dans les troubles dépressifs majeurs, autres troubles mentaux et altérations du système immunitaire, tels que le lupus érythémateux systémique. Les adultes ayant subis une ELA, en particulier les individus ayant séjourné en institution ou orphelinats, sont connus depuis de nombreuses années pour présenter une susceptibilité accrue aux pathologies CAMI. Une association a également été démontrée entre la méthylation de l'ADN au niveau des PBMCs et ces pathologies CAMI d'une part et l'altération de la réponse au stress d'autre part.

Les maladies cardiovasculaires telles que les maladies coronariennes ont été associées à une augmentation du niveau global de méthylation de l'ADN (Sharma, P *et al* 2008)(Baccarelli, A *et al* 2010c) et des niveaux plus faibles de méthylation des promoteurs des gènes (par exemple IGF2 (Heijmans, B.T *et al* 2008)). De la même façon, dans les cardiomyopathies, une corrélation inverse a

été démontrée entre le niveau de méthylation de l'ADN et l'expression des gènes angiogéniques (Movassagh, M *et al* 2010). Chez les rongeurs, la nutrition maternelle modulerait la méthylation des gènes du système rénine-angiotensine et par conséquent la pression artérielle(Bogdarina, I *et al* 2007). De plus, l'étude CPT décrite dans la Section 2 a permis d'identifier un lien entre la méthylation du promoteur du gène du récepteur humain aux glucocorticoïdes et les mesures cardiovasculaires liées à la réponse au stress, telles que la pression artérielle.

Alors que les exemples ci-dessus montrent que le stress et les CAMI ont été associés à une méthylation différentielle de l'ADN dans les PBMCs, l'influence de l'ELA sur le niveau global de méthylation dans ces conditions a fait l'objet de peu d'attention jusqu'ici. Tout porte à croire que la modulation de la méthylation par l'ELA a un impact sur la réponse au stress, le risque de maladies mentales (Felitti, V *et al* 1998), cardiovasculaires et infectieuses (Boyce, W. *et al* 1995)(Schultz, H *et al* 2009). Par ailleurs, il a été clairement montré que la méthylation des gènes est sous l'influence des facteurs environnementaux (Fraga, M *et al* 2005)(Szyf, M *et al* 2011a).

Dans le modèle d'ELA chez le rat, les jeunes rats ayant reçu peu d'attention et de soins présentent, durant leur vie, une réactivité accrue de l'axe HPA (Baylin, S 2000)(Strickland, F. 2008). Un défaut de soins/d'attention maternelle a été associé à une faible expression du GR (Baylin, S 2000) et un niveau élevé de méthylation (80-100%) d'un CpG clé entièrement conservé du promoteur 1_7 du GR au niveau de l'hippocampe (Bird, A 2002)(Tsankova, N. 2007)(Felitti, V 1998). Cependant la situation est jusqu'ici beaucoup moins claire chez l'humain. Le lien entre le niveau de méthylation du promoteur 1F du GR chez les nouveau-nés et l'humeur maternelle durant la grossesse a également été démontré, ayant pour conséquence une réactivité accrue de l'axe HPA au stress durant l'enfance (Dong, M. 2004)(Shirtcliff, E.A. 2009). Dans la cohorte néerlandaise de "l'Hiver de la faim" l'association observée entre la méthylation du promoteur 1F du GR et la réponse au stress chez l'adulte a aussi été expliquée par des influences environnementales autres que l'ELA (par exemple l'éducation, le mode de vie) (Boyce, W. 1995).

3.2 Quels mécanismes pourraient expliquer cette relation? Objectif d'*EpiPath*

Bien que de nombreuses études pédiatriques aient montré une fréquence élevée des modifications du profil de méthylation de l'ADN survenant durant la petite enfance (Martino, D 2011)(Alisch, R, *et al.* 2012), l'influence d'une ELA sur le niveau global de méthylation a reçu très peu d'attention jusqu'ici. Ainsi, l'étude EpiPath propose d'analyser l'effet de l'ELA sur la méthylation de l'ADN.
Cependant l'objectif d'EpiPath n'est pas de montrer le lien entre l'ELA et les pathologies de l'âge adulte, mais de fournir une meilleure compréhension de l'impact de l'ELA sur la méthylation de l'ADN et les conséquences sur la réponse au stress, les maladies cardiovasculaires, mentales et infectieuses.

L'hypothèse de travail est la suivante:

Nous suggérons l'existence d'un profil de réponse épigénétique particulier, faisant suite à des antécédents d'ELA, qui pourrait augmenter la susceptibilité à un large spectre de pathologies résumées par l'acronyme CAMI, et conférant un profil à "haut risque" pour ces pathologies. La susceptibilité aux pathologies CAMI pourrait dépendre à la fois directement des modifications épigénétiques impactant l'ensemble du génome, et indirectement d'une altération de la réponse au stress ou difficultés d'adaptation au stress.

3.3 Comment le montrer? Méthodologie de l'étude EpiPath

3.3.1 Design de l'étude

EpiPath est une étude observationnelle monocentrique académique analysant les effets de l'ELA sur certaines pathologies de l'âge adulte. Elle pourrait être considérée comme une étude de cohorte, de type « exposés / non-exposés» à des antécédents d'ELA. Elle a été développée par le Département d'Immunologie du CRP-Santé en collaboration avec l'Université du Luxembourg et le Département de PsychoBiologie de l'Université de Trèves. Un groupe de jeunes adultes ayant subi une ELA sévère, puis ayant été adoptés par des parents vivant au Luxembourg sera recruté, ainsi qu'un groupe contrôle. Tous les participants seront invités à se rendre à deux sessions expérimentales, durant lesquelles seront réalisés respectivement un test de stress standardisé proche du CPT (le SLST au cours de la visite 1) et un entretient psychologique classique (visite 2).

Le design de l'étude se justifie ainsi :

- Les deux groupes (exposés et non-exposés) constituant la cohorte pourront être suivis dans le temps
- méthode appropriée à l'analyse des facteurs d'exposition relativement rares, tels que l'ELA.
- ce design permet le suivi de différentes pathologies en même temps ainsi que l'identification des profils épigénétiques particulier.

Ce type d'étude, observationnelle exploratoire, requiert une méthodologie et un design très spécifique.

Les participants seront recrutés uniquement au Grand-Duché du Luxembourg de décembre 2013 à 2016.

Critères

Les éléments clé de l'étude sont: l'évaluation du niveau de méthylation sur l'ensemble du génome, de l'ELA, la réactivité au stress, l'évaluation psychologique sur une période de suivi d'un an. Par contre, aucun critère principal n'est défini. Il sera demandé aux personnes incluses de participer à deux sessions expérimentales et d'accepter d'être contactées durant une période de suivi d'un an, ainsi que dans le cadre de futures études.

L'étude est divisée en plusieurs périodes :

- ***screening***, par l'intermédiaire d'associations d'adoption actives au Luxembourg de la fin des années 1980 aux années 1990
- ***inclusion*** des participants
- ***visite 1*** : évaluation de la réponse au stress et collecte d'échantillons
- **visite 2** : entretien d'évaluation de psychologie clinique
- période de **suivi** d'un an, évaluant en particulier la fréquence des infections
- évaluation au long terme de la population.

3.3.2 Population

La population sera constituée de deux groupes qui seront comparés: le groupe ELA ou "exposés" et le groupe contrôle, ou "non exposé". Les groupes seront aussi proches que possible et différeront uniquement par l'exposition à une ELA.

- **Groupe ELA**

L'institutionnalisation, ou séjour dans un orphelinat, suivie par une adoption constitue un modèle standard d'ELA. Le travail de Gunnar et al. (Gunnar, M 2000)(Gunnar, M 2009) a clairement montré que même les meilleures institutions /orphelinat emploient des salariés qui travaillent par poste et sont responsables d'un nombre d'enfants relativement élevé, avec des ratios enfants: salarié excédant généralement 20:1.

Ceci par définition, résulte en une offre de soins instable dans le temps, induisant des carences affectives aussi bien qualitatives que quantitatives

(Smyke, A 2007). Un sous-effectif de personnel soignant constitue le facteur de stress le plus important décrit chez l'enfant (tout comme chez le jeune primate non-humain) (Johnson, J 2002). De plus, il a été montré que le "turn over" du personnel soignant altère significativement le comportement social et émotionnel des enfants, de nombreuses années après l'adoption (Kaler, S 1994)(Hodges, J. 1989).

EpiPath recrutera des participants ELA qui ont été institutionnalisés et adoptés au cours de leurs premières années de vie quelques soit leur sexe, origine ethnique ou géographique, nationalité actuelle ou passée et âge au moment de l'adoption. Il a été précédemment démontré que la réponse au test de stress était optimale, dans la tranche d'âge 18-30 ans, c'est pourquoi la population recrutée devra répondre à ces critères d'âge. Puisque le recrutement continuera jusqu'en 2016, les sujets nés entre 1983 et 1998 seront éligibles. Les troubles mentaux et psychotiques qui pourraient exposer les participants à un risque de subir des conséquences néfastes suite à leur participation à cette étude (par exemple troubles psychotiques) constituent des critères d'exclusion formels en complément d'autres conditions qui ne sont pas compatibles avec les examens. En collaboration avec différentes associations d'adoption, nous avons estimé la population éligible de l'ordre de 250-300 personnes. Afin d'éliminer les risques à court terme, les participants potentiels présentant des contre-indications au fait de placer leurs pieds dans de l'eau froide (par exemple le syndrome de Raynaud, la maladie des agglutines froides) seront exclus.

Grâce aux services d'adoption, nous serons en mesure de réaliser un screening de la population ayant des antécédents d'ELA. Par exemple le Département "Maison de l'Adoption" de la "Croix Rouge luxembourgeoise" est responsable des missions de conseils. De plus, quatre associations d'adoption indépendantes sont agréées au Luxembourg par le Ministère de la Famille et de l'Intégration et sont spécialisées par pays d'origine des enfants. (*Rapport D'activité Du Ministère de La Famille et de l'Intégration* 2012)

Tableau XVII: associations adoption agréées au Luxembourg

Associations d'adoption	**Pays d'origine**
Amicale Internationale d'Aide à l'Enfance (AIAE) a.s.b.l.	Corée du Sud, Inde
Service d'Adoption de la Croix-Rouge luxembourgeoise	Luxembourg, Bulgarie, Colombie, other
Naledi a.s.b.l.	Afrique du Sud
Luxembourg-Pérou a.s.b.l.	Pérou

- **Groupe contrôle**

Le groupe contrôle idéal serait un groupe d'individus :

- génétiquement appariés (personnes ayant des profils génétiques proches) à des individus ayant des antécédent d'ELA et élevés par des parents et entièrement intégrés socialement et ayant une préparation linguistique au Luxembourg;
- élevés par des parents Luxembourgeois par exemple des frères et sœurs non-adoptés de la même famille que l'enfant adopté;
- élevés par des parents Luxembourgeois appariés par âge et sexe aux enfants ayant un historique d'ELA.

En pratique, pour le groupe contrôle, nous allons majoritairement recruter des frères et sœurs des enfants adoptés. Les sujets du groupe contrôle seront également évalués pour l'ELA et un cut-off sur le questionnaire Childhood Trauma Questionnaire, Parental Bonding Index, et Relationship Questionnaires seront définis, au-delà desquels, les sujets contrôles ne pourront pas être inclus. Si nous ne parvenons pas à recruter un nombre suffisant de frères et sœurs non adoptés, nous recruterons des adultes de même sexe et d'âge similaire aux personnes adoptées, élevés par des parents luxembourgeois sans antécédent d'ELA, issus par exemple du cercle social immédiat des adoptés.

- **Taille de la population –** Nombre de sujets nécessaires

Le faible nombre d'étude ayant porté sur la méthylation du génome entier en population générale, ajoute une complexité aux calculs de puissance de cette étude reposant sur une méthode d'évaluation de la méthylation par MeDIP-Seq. Néanmoins, nous estimons la taille minimale de la cohorte afin de déceler les différences attendues entre les deux groupes pour le test de stress SLST, qui constitue le test le moins sensible parmi les différentes évaluations prévues.

L'objectif que l'on s'est fixé est d'avoir une puissance de de 0.8 pour un risque alpha de 0.05 dans un t-test pour l'aire sous la courbe du cortisol (AUC) en fonction des niveaux AUCg et AUCi avant le test et la différence maximale entre ces niveaux de cortisol. Nous avons calculé le nombre de sujets nécessaires sur la base des données issues d'une étude précédente sur le cortisol (Institute of Psychobiology in Trèves) du Cold Pressor Test (CPT), test de stress similaire au SLST. D'après ces données, un minimum de 70 participants par groupe est nécessaire pour observer des différences entre les groupes dans les niveaux de cortisol AUCg. A posteriori, la puissance devrait être réévaluée afin de confirmer l'estimation du nombre de sujets.

- **Faisabilité**

En collaboration avec les différentes associations d'adoption nous avons estimé le nombre total de personnes éligibles à environ 250-300. Cela constitue un pool important d'individus adoptés au Luxembourg après avoir été placés dans un orphelinat. A partir de ce groupe, nous avons pour objectif de recruter 120 participants pour le groupe ELA et 70 pour le groupe contrôle. Des sous-groupes seront constitués au sein des participants ELA sur la base des résultats de l'examen psychologique et sur la durée du séjour en institution en utilisant des techniques telles qu'une répartition selon la médiane, et selon le sexe. Chaque sous-groupe comprendra environ 70 individus, nombre minimal nécessaire pour garantir une puissance suffisante à l'identification des régions qui diffèrent par leurs niveaux de méthylation. L'analyse des données issues du suivi au long terme de la population risque d'être difficile du fait du taux important de perdus de vie.

3.3.3 Evaluation de l'ELA

L'ELA sera étudiée et caractérisée grâce à deux auto-questionnaires et un entretien parental. Les données de la littérature proposent de nombreux systèmes de classification pour évaluer la nature et l'intensité de l'ELA. Les outils les plus utilisés sont le Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) qui définit cinq catégories d'ELA : abus physique, abus sexuel, abus émotionnel, négligence physique et négligence émotionnelle. Dans cette étude, le traumatisme perçu sera mesuré par le CTQ, présenté en Annexe 4. Il s'agit d'un auto-questionnaire validé destiné à mesurer rétrospectivement, chez l'adulte ou l'adolescent, la fréquence et la sévérité des différents types d'abus subi durant l'enfance. La fiabilité test/retest du CTQ a était démontrée, avec des valeurs telles que de 0.79 à 0.86 sur une période de 2 à 4 mois, suggérant l'existence de biais de mémoire lié à des états d'humeur transitoire (Bernstein, N.a 1994) (*Rapport D'activité Du Ministère de La Famille et de l'Intégration Au Luxembourg* 2012), et convergent avec les scores évaluant le niveau de maltraitances subies. Bien que le CTQ présente une mesure subjective de la perception des participants de l'ELA, il a été utilisé de façon fiable dans un grand nombre d'études afin d'investiguer les effets de l'ELA sur les troubles de type anxiété. Ces questionnaires permettront à l'équipe d'évaluer l'intensité, la durée et la nature de l'ELA subie.

Néanmoins, la mesure de la fréquence et de la sévérité des maltraitances subies durant l'enfance n'est pas simple. Aucune norme ou référence n'a été publiée à ce jour concernant une population d'adultes ayant subi des maltraitances et abus durant l'enfance. Ainsi, et suivant les commentaires du Comité d'éthique (CNER) relatifs au premier dossier que nous avons déposé, nous avons définis la population avec plus de précision. Cela a été réalisé principalement via un questionnaire spécifiquement élaboré pour évaluer l'ELA.

Ces données seront collectées sur la période pré et immédiatement post adoption via les participants et leurs parents afin de palier au biais de mémoire des participants adoptés. Il a été demandé aux individus de donner leur

consentement éclairé pour autoriser les investigateurs d'EpiPath à contacter leurs parents et à procéder à des entretiens téléphoniques. La trame de cet entretien structuré a été inclus au dossier de soumission au CNER. Il sera demandé aux parents leur accord pour procéder à un enregistrement audio de cet entretien. Un consentement oral leur sera demandé après que l'objectif de l'étude leur aura été expliqué. Un questionnaire similaire sera proposé aux participants eux-mêmes. La nature (émotionnelle, physique, sexuelle de l'abus ou de la négligence), l'intensité (basée sur un score lié au nombre de catégories d'évènements néfastes reportés) et leur durée (durée de la période de placement en institution) de l'ELA seront mesurés par ces questionnaires. Les écarts de réponse entre les données collectées auprès des parents et celles recueillies auprès des enfants seront analysés. Nous pouvons nous attendre à ce que les parents identifient davantage les troubles présentés par les enfants adoptés du fait plus grande vigilance et attention envers ces derniers. Cela conduirait à une potentielle surestimation de la différence.

3.3.4 Analyse statistique

Les participants des groupes ELA et contrôle seront comparés par des analyses de variance (ANOVA) pour les variables continues et des tests du $\chi 2$ pour les variables catégorielles.

- Evaluation de la réponse au stress

Pour déterminer la relation entre l'ELA et la réponse au stress, nous réaliserons un modèle linéaire mixte incluant comme variable dépendante la pression artérielle systolique, l'ELA comme effet principal, le niveau de méthylation comme terme d'interaction et un effet sujet comme effet aléatoire.

- Evaluation de l'ELA

Il a été précédemment démontré que le type d'ELA subi est fortement corrélé aux pathologies psychiques survenant à l'âge adulte (Oberlander, T.F 2008). C'est pourquoi chaque type de traumatisme subi, tel que mesuré par le CTQ, sera analysé en premier lieu comme une variable binaire.
Nous avons prévu de débuter les analyses par les abus sexuels qui représentent la plus cohérente et la plus largement utilisée parmi les différentes maltraitances subies durant l'enfance (Oberlander, T.F 2008). Si l'association de cette variable avec le statut de méthylation est significative, nous estimerons dans quelle mesure la sévérité de chaque traumatisme individuel, (en utilisant les scores cutoff du CTQ) est associé au statut de méthylation.

Il a été montré que la maltraitance peut être associée au statut de méthylation, quel que soit le nombre de types de maltraitances subies durant l'enfance (sur la base des différentes catégories rapportées par le CTQ). Finalement et uniquement pour les sujets ELA, l'association entre les abus cliniquement documentés et le statut de méthylation sera testée.

- La méthylation de l'ADN

Dans cette étude, le niveau global de méthylation de l'ensemble du génome sera estimé. Plusieurs méthodes existent pour mesurer le niveau global de méthylation (PeterW., L. 2010). Ici nous utiliserons la méthode "Methylated DNA immunoprecipitation" (MeDIP), qui est l'une des techniques les plus fréquemment adoptées (Weber, M 2005). Elle consiste en la fixation d'anticorps spécifiques aux 5-methylcytosines (5mC), conduisant à la précipitation de l'ADN méthylé. Dans cette étude, cette méthode sera combinée à une méthode de séquençage dite "MeDIP-Seq" permettant d'identifier les régions du génome contenant des cytosines méthylées et la quantification du niveau de méthylation du génome entier.
Le protocole MeDIP-Seq a été optimisé très récemment au sein du Département de Psychoimmunologie.

3.3.5 Soumissions réglementaires

Pour mettre en place cette étude au Luxembourg, les autorisations de deux comités d'éthiques sont requises, celle du Comité National d'Ethique et Recherche (CNER) et celle de l'Ethical Review Panel (ERP) de l'Université du Luxembourg, regroupant des membres du CRP-Santé et de l'Université du Luxembourg respectivement. Nous avons soumis un dossier de demande initiale au CNER en février 2013. Par la suite, une nouvelle version a été soumise en avril suivant les commentaires du CNER et de l'ERP. L'accord du CNER a été obtenu avec quelques conditions fin mai (Annexe 6). J'ai préparé le dossier initial de soumission à l'ERP et une partie du dossier soumis au CNER (deuxième version, Annexe 5). Suivant la réponse de l'ERP, nous avons soumis une version rectifiée. Nous avons également reçu une réponse positive de l'ERP en mars (Annexe 7).

Conformément à la loi en vigueur au Grand-Duché du Luxembourg, nous avons également sollicité l'autorisation de la Commission Nationale de Protection des Données (CNPD). L'objectif de ce dossier est de montrer que toutes les mesures possibles seront mises en œuvre pour protéger les données personnelles à chaque stade de l'étude (accès, transfert et stockage des données) en accord avec la réglementation en vigueur.

3.4 Réflexion sur les aspects méthodologiques

3.4.1 Limites et biais

3.4.1.1 Biais

Dans l'EpiPath différents types de biais pourraient affecter la fiabilité des résultats :

Les biais liés à l'exactitude des réponses aux questionnaires. Cette catégorie inclue les biais de mémoire, biais de désirabilité sociale. En effet, pour les données issues des entretiens parentaux, les personnes interrogées sont les participants eux-mêmes mais également leurs parents adoptifs qui n'ont pas nécessairement une parfaite connaissance des conditions subies par leurs enfants avant l'adoption. Par ailleurs, Payne et al. ont montré que le stress a un impact sur la mémorisation des évènements subis. Le stress survenant avant un évènement d'ordre émotionnel faciliterait la mémorisation de cet évènement, alors qu'un stress suivant un évènement neutre en réduirait la mémorisation (Payne, J 2007).

Un biais de mesure de l'ELA est attendu du fait de la "désirabilité sociale". Ce biais de réponse intervient lorsque les participants à une étude ne répondent pas honnêtement car ils estiment que la vérité ne serait pas socialement acceptable, ou mal perçue. Ce biais peut conduire à une sous-estimation du niveau d'ELA. Néanmoins, le design de l'étude, de type cas/contrôle devrait permettre de réduire l'impact de ce biais.

Certains facteurs de confusion qui ne seront pas évalués dans cette étude, tels que les facteurs génétiques, pourraient également expliquer la partie la variance mesurée entre les groupes de méthylation. Pour limiter il conviendrait de procéder à des analyses en sous-groupes selon l'origine ethnique des sujets.

3.4.1.2 Limites

Une première limite liée au design de l'étude serait le taux de perdus de vue au cours de l'année de suivi. Ainsi les données qui seront principalement impactées sont les données liées à la partie immunologique.

La seconde limite concernerait la sélection de la population ELA. Tout d'abord, on peut s'attendre à ce que les individus qui accepteront de participer à cette étude soient en relativement bonne santé. Cela induit un risque de sélectionner uniquement une partie de la population victime d'ELA. De plus, les résultats de l'étude seront principalement basés sur les individus ayant été placés en institution. Ainsi, la transférabilité directe des résultats à une population plus large, victime d'autres types d'ELA ne semble pas évidente.

L'interprétation des données du MeDIP Seq n'a pas encore été clairement établie.

Les facteurs de confusion intervenant sur la méthylation de l'ADN demeurent inconnus à ce jour. Néanmoins, l'étude du Cold Pressor Test semble indiquer

que, parmi l'ensemble des variables analysées, le nombre de facteurs de confusion est faible.

Outre la méthylation de l'ADN, d'autres mécanismes épigénétiques pourraient jouer un rôle dans l'augmentation de la susceptibilité aux CAMI et pathologies liées au stress. Par exemple les modifications des histones sont également responsables de l'activation ou de l'inactivation des gènes durant le développement. A ce stade, la façon dont ces phénomènes pourraient influer sur les phénotypes dépendant de l'environnement reste inconnue. Les ARNs non codant contribuent également à la régulation de l'épigénome (Pauli, A 2011) en particulier sur les séquences d'ADN répétée. Cependant, jusqu'ici peu d'études ont été en mesure de fournir une hypothèse claire du mécanisme.

De plus, il a également été montré que les différences génétiques entre individus peuvent exercer une influence sur la régulation épigénétique et induire une prédisposition aux effets environnementaux. Par exemple, de nombreux gènes autosomiques présentent des niveaux de méthylation de l'ADN différents entre hommes et femmes (Tobi, E 2009). De la même façon, des effets de la nutrition sur la méthylation de l'ADN au niveau des gènes autosomiques spécifiques semblent être très différents selon le sexe. Des études sur la souris ont révélé des différences marquées de réponses épigénétiques à des facteurs environnementaux entre différents génotypes. Par ailleurs, des jumeaux dizygotes montrent de plus grandes différences épigénétiques qu'entre jumeaux monozygotes.

D'autres facteurs environnementaux ont également pu affecter l'épigénome des individus après leur adoption. Par exemple, une étude épidémiologique a identifié un lien possible être les particules aériennes pollution et la méthylation globale de l'ADN dans les cellules circulantes. La méthylation globale a été également altérée dans le sang des individus qui ont été exposés à des carcinogènes de type benzène. Un facteur de confusion possible est que le stress environnemental peut altérer l'abondance relative des différents types de cellules sanguines. De telles modifications pourraient conduire à une altération des niveaux de méthylation de l'ADN pour certains gènes spécifiques. De plus, la méthylation de l'ADN elle-même est associée à la différenciation cellulaire dans l'hématopoïèse, et sa perturbation pourrait affecter les populations cellulaires sanguines. Pour éviter ces facteurs de confusion, idéalement d'autres lignées cellulaires et tissus auraient pu être explorés. Nous nous sommes limités dans cette étude à la collecte de cellules buccales épithéliales. Cette méthode non invasive a été privilégiée dans l'objectif de faciliter l'adhésion des participants et l'approbation du protocole de l'étude par les autorités d'éthique.

4 SECTION 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse repose sur deux études portant sur l'épidémiologie épigénétique. La première, le cold pressor test, a été réalisée sur des volontaires sains et a montré une corrélation entre la méthylation des deux exons du promoteur du gène du GR humain et des éléments de la réponse au stress, en particulier la PAS. La seconde étude, EpiPath, porte sur une population dans laquelle le profil de méthylation de l'ADN a probablement été altéré. De nombreux articles ont montré que des modifications épigénétiques peuvent être induites par des conditions environnementales, telles que des maltraitances subies durant l'enfance (ELA). A ce jour l'ELA est la seule manifestation, non-pharmacologique et non cancéreuse, connue liée à une modification de la méthylation de l'ADN. L'approche utilisée dans l'étude CPT a été adaptée dans l'étude EpiPath à une population ayant été exposée à un stress au cours des premières années de vie et ainsi dont le profil de méthylation pourrait avoir été modifié. La méthodologie retenue permettra de comparer le niveau de méthylation de deux groupes: le groupe exposés, dit "groupe ELA" et groupe non-exposés, dit "groupe contrôle".

Suite aux résultats de l'étude CPT, un autre type de test de stress a été utilisé dans l'étude EpiPath. L'inconvénient du test utilisé dans la première étude est que le CPT était l'induction d'une réponse au stress qui soit principalement à composante physique, alors que d'autres tests, tels que le "paced auditory serial addition task" (PASAT) sont connus pour induire également une réponse au stress à composante psychique. De ce fait, dans l'étude EpiPath, le "socially evaluated cold pressor test" (SECPT) (Berrebi, D 2003) combiné au PASAT seront utilisés à la place du CPT. EpiPath s'appuie sur les conclusions et l'évaluation de la réponse au stress évaluée via des paramètres cardiovasculaires dans l'étude CPT, à la différence près que les mesures seront réalisées battement par battement ("beat to beat"). Cela permettra à l'équipe projet de déceler l'implication du SNA dans la relation méthylation de l'ADN / réponse au stress, en suivant des variables telles que la variabilité du rythme cardiaque.

Ainsi les résultats et la mise en œuvre de l'étude CPT ont permis au Groupe de Psychoimmunologie de développer et d'améliorer le protocole de l'étude EpiPath. Le lien entre la méthylation du gène du GR et la réponse au stress a déjà été clairement établi dans une population de volontaires sains. EpiPath examinera si cette relation reste valable dans une population dans laquelle la réponse au stress et la méthylation de l'ADN ont potentiellement été altérées. L'équipe du projet EpiPath identifiera les conséquences de l'ELA sur l'apparition de pathologies à l'âge adultes et le lien potentiel avec le profil de méthylation.

De plus, utiliser une approche basée sur la méthylation de l'ensemble du génome est un challenge considérable qui permettra d'identifier les régions génomiques

présentant un niveau de méthylation différent entre les sujets exposés à une ELA et le groupe contrôle.

En conclusion l'étude EpiPath devrait confirmer l'une des deux hypothèses mécanistiques proposées dans la section 1.2. qui diffèrent par le rôle et la place de l'altération de la réponse au stress. L'hypothèse la plus probable serait que les troubles de la réponse au stress soient influencés, de la même façon que les pathologies appelées CAMI, par des antécédents d'ELA, via des modifications épigénétiques. A court terme, EpiPath conduira à l'identification de facteurs de risque de CAMI via des critères de substitution validés. Néanmoins, cette étude reste à visée exploratoire. En effet, pour affirmer que l'ELA constitue réellement un facteur de risque, et ainsi être en mesure de calculer de risque relatif ou l'Odds Ratio, un suivi au long terme est nécessaire reposant sur des critères cliniques. Cela constitue le seul moyen d'évaluer l'augmentation de la susceptibilité aux CAMI. Cependant, l'intérêt principal d'EpiPath repose sur le fait que cette étude permette de constituer une cohorte de personnes ayant des antécédents d'ELA ainsi qu'une cohorte de témoins ; première étape indispensable à la mise en place de ce suivi.

L'intérêt de cette étude d'un point de vue santé publique est double. Cette approche vise à la fois à développer les connaissances actuelles en épidémiologie épigénétique et à sensibiliser une population particulière ayant été victime d'ELA, afin d'encourager des démarches de prévention. Le véritable challenge repose sur la phase de suivi à long terme des sujets.

D'un point de vue méthodologie, ce type d'étude présente une complexité particulière dans la mesure le profil de méthylation peut difficilement être isolé de la séquence d'ADN. Comme l'a montré notamment Lienert *et al*., dans les cellules pluripotentes, les promoteurs proximaux gouvernent leur propre niveau de méthylation. Ainsi, malgré les nombreuses études menées récemment sur le profil de méthylation de l'ensemble du génome, les principes gouvernant la élaboration et la modification du profil de méthylation de l'ADN restent mal connus (Lienert, F *et al* 2011*)*.

D'un point de vue général l'identification de déterminants génétiques et non génétiques d'apparition d'une maladie constitue un défi majeur pour la recherche. Récemment les études GWAS ont permis d'établir un lien entre des associations des SNPs et plus de multiples caractéristiques et pathologies. Néanmoins, l'effet du variant ou des allèles du gène représente uniquement l'un des facteurs influençant le risque d'apparition de la maladie.

Même si elles sont utilisées dans le cadre de l'estimation de ce risque (Norrgard 2008), les résultats des études GWAS ne sont généralement pas directement applicables à la prévention ou au traitement de pathologies complexes, en raison du nombre important de variables génétiques et environnementales qui

interagissent dans la survenue de ces maladies. Ainsi, l'identification d'une corrélation entre une modification génétique et l'incidence d'une pathologie complexe est limitée à l'estimation statistique de l'augmentation du risque d'apparition de la maladie, plutôt que par un véritable facteur pronostic.

Par ailleurs, l'exploration des conséquences des modifications non-génétiques sur l'apparition des maladies, reste à approfondir. La mise en place d'études à large échelle d'études de type EWAS semble constituer le meilleur moyen de relier une variation phénotypique à une modification épigénétique (Vardhman *et al* 2011).

Ces études se sont développées très rapidement au cours des dernières années si bien que la littérature actuelle est encore relativement pauvre en référentiels et bonnes pratiques en termes de méthodologie et de design. Dans ce contexte, Michels, K *et al* ont formulé les recommandations suivantes pour les études EWAS:

- Choisir un tissu approprié
- Tenir compte de l'hétérogénéité de la population cellulaire
- Contrôler la structure de la population et de la variabilité biologique
- Choisir un protocole approprié d'évaluation de la méthylation de l'ADN
- Vérifier et valider les résultats
- Etre prudent dans l'inférence causale dans la mesure où la plupart des études EWAS sont exploratoires.

Ces recommandations ont été prises en compte dans l'élaboration du protocole de l'étude EpiPath.

Les études EWAS visent notamment à apporter des éléments permettant l'évaluation du risque cardio-vasculaire. Les CAMI et notamment les MCV, sont des maladies complexes fréquentes résultant de multiples facteurs génétiques et environnementaux et de leurs interactions. Concernant les MCV, selon les recommandations de l'Anaes le recours à un modèle d'évaluation du RCV permettrait une évaluation quantifiée et reproductible du RCV global (Anaes 2004). Contrairement à la méthode de sommation des facteurs de risque, ces modèles intègrent la valeur précise des paramètres évalués (par exemple la PAS), qui entrera dans un calcul mathématique précis.

Parmi les différentes approches proposées, deux modèles d'évaluation du RCV font consensus :

- Le modèle de Framingham, dont la validation prospective a été la plus large. Il s'agit du score le plus utilisé dans le monde et sert de référence pour l'évaluation d'autres modèles. Il peut être réalisé manuellement en se servant d'abaques ou en utilisant des logiciels et permet d'évaluer le risque coronarien à 10 ans.
  Il tient compte du sexe, de l'âge, du taux de cholestérol total, du taux de HDL-C, du tabagisme, de l'existence d'un diabète et de la PAS, un nombre de points différents étant attribué à chaque niveau de ces différents facteurs.

A l'issue de ce calcul, les sujets dont le score est supérieur à 20 % seront considérés comme à haut risque CV.

- Le modèle de SCORE issu d'études de cohortes européennes, reposant ainsi sur des populations similaires à la population française en ce qui concerne la prévalence des MCV.

Les recommandations de l'Anaes suggèrent de choisir l'un de ces deux modèles selon les objectifs poursuivis, notamment la prévention du risque vasculaire cérébral ou coronarien.

Ainsi, au cours du déroulement de l'étude EpiPath, le protocole de l'étude pourrait être adapté selon les avancées scientifiques et méthodologiques. Comme mentionné précédemment, les conclusions premières reposant essentiellement sur des critères de substitution, seront à confirmer par une phase de suivi au long terme des sujets sur la base de critères cliniques. De plus, l'utilisation d'un modèle d'estimation du RCV constituerait une opportunité d'affiner l'évaluation du risque. Les résultats de cette étude devront être mis en perspective des connaissances établies en épidémiologie épigénétique et également des études interactions gène-environnement.

BIBLIOGRAPHIE

Alisch, R., Barwick, BG., Chopra, P., Myrick, LK., Satten, GA., Conneely, KN., Warren, ST., 2012. "Age-Associated DNA Methylation in Pediatric Populations." *Genome Res*, sec. 22.

Alt, SR, Turner JD, Klok MD, Meijer OC, Lakke EA, Derijk RH, et al. 2010. "Differential Expression of Glucocorticoid Receptor Transcripts in Major Depressive Disorder Is Not Epigenetically Programmed." *Psychoneuroendocrinology*, sec. 35.

Anaes. 2004. *Méthodes D'évaluation Du Risque Cardio-Vasculaire Global*. 2.6.

Baccarelli, A., Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J, 2010a. "Ischemic Heart Disease and Stroke in Relation to Blood DNA Methylation." *Epidemiology*, sec. 21.

Baccarelli, A, Rienstra, M, Benjamin, EJ, 2010b. "Cardiovascular Epigenetics: Basic Concepts and Results from Animal and Human Studies." *Circ. Cardiovasc.*, sec. 3(6).

Baccarelli, A.. 2010c. "Repetitive Element DNA Methylation and Circulating Endothelial and Inflammation Markers in the VA Normative Aging Study." *Epigenetics*, sec. 5(3).

Ball, MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, Park IH, Xie B, Daley GQ, Church GM, 2009. "Targeted and Genome-Scale Strategies Reveal Gene-Body Methylation Signatures in Human Cells," sec. 27.

Batten, S., Aslan, M., Maciejewski, PK., Mazure, CM., 2004. "Childhood Maltreatment as a Risk Factor for Adult Cardiovascular Disease and Depression." *J CLin Psychiatry*, sec. 65-2.

Baylin, S., Herman JG, 2000. "DNA Hypermethylation in Tumorigenesis: Epigenetics Joins Genetics." *Trends Genet*, sec. 16.

Beck, A. 1988. "Psychometric Properties of the Beck Depression Inventory Twenty-Five Years of Evaluation." *Clin. Psych. Review*, sec. 8.

Beck, A, Steer RA, Ball R, Ranieri W, 1996. "Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in Psychiatric Outpatients." *J Pers Assess*, sec. 67.

Belanoff JK, Gross K, Yager A, Schatzberg AF. 2000. "Corticosteroids and Cognition." *J Psychiatr Res*, sec. 35.

Bernstein, N, Nunnally, J, 1994. "Psychometric Theory." *Psychometric Theory*, 3rd Edition edition.

Berrebi, D, Stefano Bruscoli, Cohen, N, Foussat, A, Migliorati, G, Bouchet-Delbos, L, Maillot,MC, Portier, A, Couderc, J, Galanaud, P, Peuchmaur, M, Riccardi, C and Emilie D, 2003. "Synthesis of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) by Macrophages: An Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Mechanism Shared by Glucocorticoids and IL-10." *Blood*, sec. 33(6).

Bird, AP, Taggart MH, Nicholls RD, Higgs DR, 1987. "Non-Methylated CpG-Rich Islands at the Human Alpha-Globin locus:Implications for Evolution of the Alpha-Globin Pseudogene." *EMBO J*, sec. 6.

Bird, A. 2002. "DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory." *Genes Dev*, sec. 16(1).

Bird, A. 2007. "Perceptions of Epigenetics." *Nature*, sec. 447(7143).

Bocker, M, Hellwig, I, Breiling, A, Eckstein, V, Ho,AD, and Frank Lyko 2011. "Genome-Wide Promoter DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Progenitor Cells during Differentiation and Aging." *Blood*, sec. 117.

Bockmühl Y, Murgatroyd CA, Kuczynska A, Adcock IM, Almeida OF, Spengler D, 2011. "Differential Regulation and Function of 5'-Untranslated GR-Exon 1 Transcripts." *Mol Endocrinol*, sec. 25(7).

Bogdarina, I, Welham, S, King, PJ, Burns, SP, and Clark, A, 2007. "Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension." *Circ Res*, sec. 100(4).

Boyce, W, Chesney M, Alkon A, Tschann JM, Adams S, Chesterman B, Cohen F, Kaiser P, Folkman S, Wara D, 1995. "Psychobiologic Reactivity to Stress and Childhood Respiratory Illnesses: Results of Two Prospective Studies." *Psychosom Med*, sec. 411-422.

Breslin, M, Geng, CD, Vedeckis, WV, 2001. "Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids." *Molecular Endocrinology*, sec. 15(8).

Bromer, C, Marsit CJ, Armstrong DA, Padbury JF, Lester B, 2012. "Genetic and Epigenetic Variation of the GR (NR3C1) in Placenta and Infant Neurobehavior." *Developmental Psychobiology*.

Buchanan, T, Tranel, D and Adolphs, R, 2006. "Impaired Memory Retrieval Correlates with Individual Differences in Cortisol Response but Not Autonomic Response." *Learn. Mem*.

Buske-Kirschbaum, A, Jobst S, Wustmans A, Kirschbaum C, Rauh W, Hellhammer D. 1997. "Attenuated Free Cortisol Response to Psychosocial Stress in Children with Atopic Dermatitis." *Psychosom Med*, sec. 59.

Cao-Lei, L, Leija SC, Kumsta R, Wüst S, Meyer J, Turner JD, Muller CP, 2011. "Transcriptional Control of the Human Glucocorticoid Receptor: Identification and Analysis of Alternative Promoter Regions." *Hum Genet*, sec. 129(5).

Cao-Lei, L, Suwansirikul S, Jutavijittum P, Mériaux SB, Turner JD, Muller CP, 2013. "Glucocorticoid Receptor Gene Expression and Promoter CpG Modifications throughout the Human Brain." *Journal of Psychiatric Research*.

Chess, A.H.A., A. 2007. "Gene Body-Specific Méthylation on the Active X Chromosome." *Science*, sec. 315.

Chida, Y. and A. Steptoe. 2010. "Greater Cardiovascular Responses to Laboratory Mental Stress Are Associated with Poor Subsequent Cardiovascular Risk Status: A Meta-Analysis of Prospective Evidence." *Hypertension*, sec. 55(4).

Chunyan, L, Cripe, TP and Kim, MO. 2010. "Statistical Issues in Longitudinal Data Analysis for Treatment Efficacy Studies in the Biomedical Sciences." *Mol Ther*, sec. 1724-1730.

Cole, S. 2007. "Social Regulation of Gene Expression in Human Leukocytes." *Genome Biology*, sec. 8(9).

Cosíoa, BG, Torregob, A, Adcock, IM. 2005. "Molecular Mechanisms of Glucocorticoids." *Arch Bronconeumol*, sec. 41.

De Rooij, S.R. 2011. "Associations between DNA Methylation of a Glucocorticoid Receptor Promoter and Acute Response Au Stresss in a Large Healthy Adult Population Are Largely Explained by Lifestyle and Educational Differences." *Psychoneuroendocrinology*.

Domingues, R. 2009. "Alered Cardiovascular Reactivity to Mental Stress but Not to Cold Pressure Test in Migraine." *Headache*, sec. 50.

Dong, M. 2004. "Insights into Causal Pathways for Ischemic Heart Disease: Adverse Childhood Experiences Study." *Circulation*, sec. 110(13).

Duncko, R. 2007. "Acute Exposure to Stress Improves Performance in Trace Eyeblink Conditioning and Spatial Learning Tasks in Healthy Me." *Learn. Mem*.

"Dysfonctionnements Cellulaires À l'Origine Du Processus Tumoral et Aperçu Des Thérapies Existantes." 2014. Accessed January 3.

E.B, B. 2004. “Polymorphism in FKBP5 Are Associated with Augmentationd Recurrence of Depressive Episodes and Response to Antidepressant Treatment.” *Nat Genet*, sec. 36(12).

Egger, G. 2004. “Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy.” *Nature*, sec. 429.

Ehrlich, M. 2002. “DNA Methylation in Cancer: Too Much, but Also Too Little.” *Oncogene*, sec. 21(35).

Feil, R. 2012. “Epigenetics and the Environment: Emerging Patterns and Implications.” *Nature*, sec. 13(2).

Feinberg., A. 2004. “The History of Cancer Epigenetics.” *Nat Rev Genet*, sec. 4(2).

Felitti, V. 1998. “Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study.” *Am J PrevMed*, sec. 14(4).

Flaa, A. 2008. “Sympathoadrenal Stress Reactivité Is a Predictor of Future Pression Artérielle: An 18-Year Follow-up Study.” *Hypertension*, sec. 52(2).

Fraga, M., E Ballestar, and MF Paz. 2005. “Epigenetic Differences Arise during the Lifetime of Monozygotic Twins,.” In *Proc Natl Acad Sci*, 10604–49.

Friso, S. 2002. “Gene–nutrient Interactions and DNA Methylation.” *J. Nut*, sec. 132(8).

Friso, S. 2008. “Epigenetic Control of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 Gene Promoter Is Related to Human Hypertension.” *Atherosclerosis*, sec. 1999.

G Li, D.R. 2011. “Chromatin Higher-Order Structures and Gene Regulation.” *Curr Opin Genet Dev*, sec. 21.

Goodwin, R. 2004. “Association between Childhood Trauma and Physical Disorders among Adults in the United States.” *Psychological Medicine*, sec. 34.

Griffiths, A. J. F. 2001. *Molecular Genetics*.

Gunnar, M. 2000. “International Adoption of Institutionally Reared Children: Research and Policy.” *Dev Psychopathol*, sec. 12(4).

Gunnar, M. 2009. “Moderate versus Severe Early Life Stress: Associations with Stress Reactivity and Regulation in 10-12-Year-Old Children.” *Psychoneuroendocrinology*, sec. 34(1).

Gut, M. 2007. “Common Pathways in Crohn’s Disease and Other Inflammatory Diseases Revealed by Genomics.” *Epubn*.

Heijmans, B.T. 2008. “Persistent Epigenetic Differences Associated with Prenatal Exposure to Famine in Humans.” *Proc Natl Acad Sci*, sec. 105(44).

Heim, C. 2000. “The Potential Role of Hypocortisolism in the Pathophysiology of Stress-Related Bodily Disorders.” *Psychoneuroendocrinology*, sec. 25.

Hodges, J. 1989. “Social and Family Relationships of Ex-Institutional Adolescents.” *J Child Psychol Psychiatry*, sec. 30(1).

Holliday R. 1975. “DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development.” *Science*, sec. 187.

Holme I, Aastveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. Inflammatory markers, lipoprotein components and risk of major cardiovascular events in 65,005 men and women in the Apolipoprotein Mortality Risk study (AMORIS). *Atherosclerosis*. 2010;213(1):299-305.

Holsboer, F. 2000. “The Corticosteroid Receptor Hypothesis of Depression.” *Neuropsychopharmacology*, sec. 23.

Issa, J. 2000. “CpG-Island Methylation in Aging and Cancer.” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, sec. 249.

Jacobsen, J.L. 2010. “Establishing, Maintaining and Modifying DNA Methylation Patterns in Plants and Animals.” *Nature Rev Genet*, sec. 11.

Jaenisch, R. 1982. “DNA Methylation, Retroviruses, and Embryogenesis.” *J. Cell Biochem*, sec. 20.

J Bell, A.P. 2011. “DNA Methylation Patterns Associate with Genetic and Gene Expression Variation in HapMap Cell Lines.” *Genome Biology*, sec. 12.

Ji, H. 2010. “Comprehensive Methylome Map of Lineage Commitment from Haematopoietic Progenitors.” *Nature*, sec. 467.

Johnson, J. 2002. “Prior Stressor Exposure Primes the HPA Axis.” *Psychoneuroendocrinology*, sec. 27(3).

Jones, P. 1999. “The DNA Methylation Paradox.” *Trends Genet*, sec. 15.

Jones, P. 2012. “Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and beyond.” *Nat Rev Genet*, sec. 13.

Kaler, S. 1994. “Analysis of Environmental Deprivation: Cognitive and Social Development in Romanian Orphans.” *J Child Psychol Psychiatr*, sec. 35(4).

Kitraki, E. 1999. “Long-Lasting Effets of Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Rat Brain,” sec. 69(5).

Kloet, E.D. 2005. “Stress and the Brain: From Adaptation to Disease.” *Nat Rev Neuroscience*, sec. 6.

Kloet, E.D. 2005. “Stress and the Brain: From Adaptation to Disease,.” *Nat Rev Neuroscience*, 463–75.

Kouzarides, T. 2007. “Chromatin Modifications and Their Function.” *128(4)*.

Kunrath, J. 2013. “Blood Pressure Hyperreactivity: An Early Cardiovascular Risk in Normotensive Men Exposed to Low-to-Moderate Inorganic Arsenic in Driking Water.” *J Hypertens*, sec. 31(2).

L., and Blood Institute (NHLBI). 2000. “The Practical Guide: Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults.” *North American Association for the Study of Obesity (NAASO) and the National Heart*.

Lange, U. 2010. “What an Epigenome Remembers.” *Bioessays*, sec. 32.

Lee, C. 2009. “Epigenetic Regulation of Cytokine Gene Expression in T Lyphocytes.” *Yonsei Med J*, sec. 50.

Leserman. 1998. “Selected Symptoms Associated with Sexual and Physical Abuse History among Female Patients with Gastrointestinal Disorders: The Impact on Subsequent Health Care Visits.” *J. Psychol Med*, sec. 28.

Leserman, J. 1998. “Leserman, J.” *Psychol Med*, sec. 28(2).

Lienert, F. 2011. “Identification of Genetic Elements That Autonomously Determine DNA Methylation States.” *Nature Genetics*, sec. 43 (11).

Lighthall, N.R. 2011. “Gender Differences in Reward-Related Decision Processing under Stress.” *Soc. Cogn. Affect Neurosci*.

Ling, C. 2009. “Epigenetic: A Molecular Link between Environmental Factors and Type 2 Diabetes.” *Diabetes*, sec. 58.

Lister, R. 2009. “Human DNA Methylomes at Base Resolution Show Widespread Epigenomic Differences.” *Nature*, sec. 462.

Liu, D. 1997. “Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress.” *Science*, sec. 277(5332).

Liu, D. 2000. “Maternal Care, Hippocampal Synaptogenesis and Cognitive Development in Rats.” *Nat Neurosci*, sec. 3(8).

Lorincz, M. 2000. “Dynamic Analysis of Proviral Induction and de Novo Méthylation: Implications for a Histone Deacetylase-Independent, Methylation Density-Dependent Mechanism of Transcriptional Repression.” *Mol Cell Biol*, sec. 20.

Lovallo, W. 1975. “The Cold Pressor Test and Autonomic Function: A Review and Integration.” *Psychophysiology*.

Macedo, J.A. 2007. “Adhesion Molecules and Cytokine Expression in Fibromyalgia Patients: Increased L-Selectin on Monocytes and Neutrophils.” *J Neuroimmunol*, sec. 155(1-2).

Macedo, J.A. 2008. “Glucocorticoid Sensitivity in Fibromyalgia Patients: Decreased Expression of Corticosteroid Receptors and Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper.” *Psychoneuroendocrinology*, sec. 33(6).

MA, G.-S. 1983. “Tissue-Specific Differences in DNA Methylation in Various Mammals.” *Biochim Biophys Acta*, sec. 740.

Marciano, C. 2012. “Effets of Type 2 Diabetes Mellitus on Coronary Microvascular Function and Myocardial Perfusion in Patients without Obstructive Coronary Artery Disease.” *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, sec. 39(7).

Martino, D. 2011. “Evidence for Age-Related and Individual-Specific Changes in DNA Methylation Profile of Mononuclear Cells during Early Immune Development in Humans.” *Epigenetics*, sec. 6.

Matthews, K.A. 2006. “Blood Pressure Reactivity to Psychological Stress and Coronary Calcification in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Stud.” *Hypertension*, sec. 47(3).

McCauley, J. 1997. “Clinical Characteristics of Women with a History of Childhood Abuse: Unhealed Wounds.” *JAMA*, sec. 277(17).

McGowan, P. 2009. “Epigenetic Regulation of the Glucocorticoid Receptor in Human Brain Associates with Childhood Abuse.” *Nat Neurosci*, sec. 12(3).

McRae, A.L. 2006. “Stress Reactivity: Biological and Subjective Responses to the Cold Pressor and Trier Social Stressors.” *Hum. Psychopharmacol*, sec. 21.

Meaney, M. 2005. “Environmental Programming of Réponse Au Stresss through DNA Methylation: Life at the Interface between a Dynamic Environment and a Fixed Genome.” *Dialogues Clin Neurosci*, sec. 7(2).

Menkes, M.S. 1989. “Cardiovascular Reactivity to the Cold Pressor Test as a Predictor of Hypertension,” sec. 524-30.

Movassagh, M. 2010. “Differential DNA Methylation Correlates with Differential Expression of Angiogenic Factors in Human Heart Failure.” *PloS One*, sec. 5(1).

M. Suzuki, a.A.B. 2008. “DNA Methylation Landscapes: Provocative Insights from Epigenomics.” *Nat Rev Genet*, sec. 9(6).

Murgatroyd, C. 2009. “Dynamic DNA Methylation Programs Persistent Adverse Effets of Early-Life Stress.” *Nat Neurosci*, sec. 12.

Murgatroyd, C. 2009. “Dynamic DNA Methylation Programs Persistent Adverse Effets of Early-Life Stress,.” *Nat Neurosci*, 1559–66.

Murphy, T. 2014. “Epigenetics in Health and Disease: Heralding the EWAS Era.” *The Lancet*.

Neigh, G. 2009. “The Neurobiological Toll of Child Abuse and Neglect.” *Trauma Violence & Abuse*, sec. 10(4).

Ng SB, Turner EH. 2009. “Targeted Capture and Massively Parallel Sequencing of 12 Human Exomes.” *Nature*, sec. 461 (7261).

Nieuwenhuijsen, K. 2010. “Psychosocial Work Environment and Stress-Related Disorders, a Systematic Review.” *Occup Med (Lond)*, sec. 60(4).

Norrgard, K. 2008. “Genetic Variation and Disease: GWAS.” *Nature Education*, sec. 1.

Oberlander, T.F. 2008. “Prenatal Exposure to Maternal Depression, Neonatal Méthylation of Human Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) and Infant Cortisol Stresss Response.” *Epigenetics*, sec. 3(2).

Pàldi, A. 2012. “Epigénétique : L’hérédité Au-Delà Des Gènes : Comment L’environnement Modifie Les Chromosomes.” *La Recherche*, sec. 463.

Pauli, A. 2011. “Non-Coding RNAs as Regulators of Embryogenesis.” *Nature Rev Genet*, sec. 12.

Payne, J. 2007. “Stress Administered prior to Encoding Impairs Neutral but Enhances Emotional Long-Term Episodic Memories.” *Learning and Memory*, sec. 14.

PeterW., L. 2010. “Principles and Challenges of Genomewide DNA Methylation Analysis.” *Nat Rev Genet*, sec. 11(3).

Porcelli, A.J. 2014. “An Alternative to the Traditional Cold Pressor Test: The Cold Pressor Arm Wrap.” *J. Vis. Exp.*, sec. 83.

Pradhan, S. 1999. “Recombinant Human DNA (cytosine-5) Methyltransferase. I.Expression, Purification, and Comparison of de Novo and Maintenance Methylation.” *J Biol Chem*, sec. 274.

Pruessner, J. 1999. “Burnout, Perceived Stress, and Cortisol Responses to Awakening.” *Psychosom Med*, sec. 61.

Pujols, L. 2002. “Expression of Glucocorticoid Receptor A- and B-Isoforms in Human Cells and Tissues.” *American Journal of Physiology*, sec. 283(4).

Raikkonen, K. 2011. “Risk of Severe Mental Disorders in Adults Separated Temporarily from Their Parents in Childhood: The Helsinki Birth Cohort Study.” *J Psychiatr Res*, sec. 45(3).

Raikkonen, K. 2011. “Risk of Severe Mental Disorders in Adults Separated Temporarily from Their Parents in Childhood: The Helsinki Birth Cohort Study.” *J Psychiatr Res*.

Rapport D’activité Du Ministère de La Famille et de l’Intégration Au Luxembourg. 2012.

Renee, D. 2003. “Association Between Childhood Physical Abuse and Gastrointestinal Disorders and Migraine in Adulthood.” *American Journal of Public Health*, sec. 93(7).

Rief, W. 1997. “Sreening Für Somatoforme Störungen.” In , (Manual) Huber.

Riggs AD. 1975. “X Inactivation, Differentiation and DNA Methylation.” *Cytogenet Cell Genet*, sec. 14.

Russo, V.E.A. 1996. “Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation.” *Cold Spring Harbor Laboratory Pres*.

Schmidt, M. 2009. “Post Natal Glucocorticoid Excess due to Pituitary Glucocorticoiod Receptor Deficiency: Differential Short Term and Long Term Consequences.” *Endocrinology*, sec. 150 (6).

Schultz, H. 2009. “Optimism, Self-Efficacy, and Perceived Stress as Predictors of Self-Reported Health Symptoms in College Students.” *Zeitschrift Für Gesundheitspsychologie*, sec. 17.

Schulz, P. 1999. “Das Trierer Inventar Zur Erfassung von Chronischem Stre (TICS): Skalen-Konstruktion, Teststatistische Uberprüfung Und Validierung Der Skala Arbeitsüberlastung Konstruktion, Teststatistische Uberprüfung Und Validierung Der Skala Arbeitsüberlastung.” *Diagnostica*, sec. 45.

Schwarbe, L. 2008. “HPA Axis Activation by a Socially Evaluated Cold-Pressor Test.” *Psychoneuroendocrinology*, sec. 33.

Sharma, P. 2008. “Detection of Altered Global DNA Methylation in Coronary Artery Disease Patient.” *DNA Cell Biol*, sec. 27(7).

Shirtcliff, E.A. 2009. “Early Childhood Stress Is Associated with Elevated Antibody Levels to Herpes Simplex Virus Type 1.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, sec. 106(8).

Sinclair, D. 2012. “Glucocorticoid Receptor 1B and 1C mRNA Transcript Alterations in Schizophrenia and Bipolar Disorder, and Their Possible Regulation by GR Gene Variants.” *PLoS ONE*, sec. 7(3).

Siroux, V. 2013. “8e Congrès Francophone d’Allergologie.” *Grenoble CFA*.

Smyke, A. 2007. “The Caregiving Context in Institution-Reared and Family-Reared Infants and Toddlers in Romania.” *J Child Psychol Psychiatry*, sec. 48(2).

Spitzer, C. 2013. “Gender-Specific Association between Childhood Trauma and Rheumatoid Arthritis: A Case-Control Study.” *J Psychosom Res*, sec. 74(4).

Spitzer, M. 2002. “Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition.” *Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute*.

Steptoe, A. and C. Vogele. 1991. “Methodology of Mental Stress Testing in Cardiovascular Research.” *Circulation*, sec. 83(4 Suppl).

Strickland, F. 2008. “Epigenetics in Human Autoimmunity. Epigenetics in Autoimmunity - DNA Methylation in Systemic Lupus Erythematosus and beyond.” *Autoimmunity*, sec. 41.

Szyf, M. 2011a. “DNA Methylation, the Early-Life Social Environment and Behavioral Disorders.” *J Neurodev Disord*, sec. (3) 3.

Szyf, M. 2011b. “The Early Life Social Environment and DNA Methylation: DNA Methylation Mediating the Long-Term Impact of Social Environments Early in Life.” *Epigenetics*, sec. 6 (8).

Tallec, P.-L. 2005. “The Mineralocorticoid Receptor: A Journey Exploring Its Diversity and Specificity of Action,” sec. 19(9).

Tobi, E. 2009. “DNA Methylation Differences after Exposure to Prenatal Famine Are Common and Timing and Sex-Specific.” *Hum Mol Genet*, sec. 18.

Tsankova, N. 2007. “Epigenetic Regulation in Psychiatric Disorders.” *Nat Rev Neuroscience*, sec. 8.

Turner, JD. 2005. “Structure of the Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Gene 5’ Untranslated Region: Identification, and Tissue Distribution of Multiple New Human Exon 1.” *J Mol Endocrinol*, sec. 35(2).

Turner, JD. 2008. “Highly Individual Methylation Patterns of Alternative Glucocorticoid Receptor Promoters Suggest Individualized Epigenetic Regulatory Mechanisms.” *NucleicAcids Res*, sec. 36.

Turner, JD. 2010. “Transcriptional Control of the Glucocorticoid Receptor: CpG Islands, Epigenetics and More.” *Biochem Pharmacol*, sec. 80(12).

Turner, JD, SR Alt, and L Cao. 2010. “Transcriptional Control of the Glucocorticoid Receptor: CpG Islands, Epigenetics and More,.” *Biochem Pharmacol*, 1860–68.

Turner, JD, and Muller, CP. 2005. “Structure of the Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Gene 5’ Untranslated Region: Identification, and Tissue Distribution of Multiple New Human Exon 1,.” *J Mol Endocrinol*, 283–92.

Turner, JD, Pelascini, LP and Macedo, JA. 2008. “Highly Individual Methylation Patterns of Alternative Glucocorticoid Receptor Promoters Suggest Individualized Epigenetic Regulatory Mechanisms,.” *NucleicAcids Res*, 7207–18.

Turunen, M. 2009. “Epigenetic and Atherosclerosis.” *Biochim Biophys Acta*, sec. 1790.

Uchida, S. 2009. “Epigenetic Status of Gdnf in the Ventral Striatum Determines Susceptibility and Adaptation to Daily Stressful Events.” *Neuron*, sec. 69(2).

Van Zuiden, M. 2011. “Pre-Existing High Glucocorticoid Receptor Number Predicting Development of Posttraumatic Stress Symptoms After Military Deployment.” *Am J Psychiatry*, sec. 168.

Vardhman, KR. 2011. “Epigenome-Wide Association Studies for Common Human Diseases.” *Nature*.

Varmuza, S. 2003. “Epigenetics and the Renaissance of Heresy.” *Genome*, sec. 46.

Waddington C. 1942. “L’épigénotype.” *Endeavour*, sec. 1.

Weaver, IC., 2004. “Epigenetic Programming by Maternal Behavior.” *Nat Neurosci*, sec. 7(8).

Weaver, IC., 2005. “Reversal of Maternal Programming of Réponse Au Stresss in Adult Offspring through Methyl Supplementation: Altering Epigenetic Marking Later in Life.” *J Neurosci*, sec. 25(47).

Weaver, IC., 2007. “The Transcription Factor Nerve Growth Factor-Inducible Protein a Mediates Epigenetic Programming: Altering Epigenetic Marks by Immediate-Early Genes.” *J Neurosci*, sec. 27(7).

Weber, M. 2005. “Chromosome-Wide and Promoter-Specific Analyses Identify Sites of Differential DNA Methylation in Normal and Transformed Human Cells.” *Nat Genet*, sec. 37(8).

Wegman, H. 2009. “A Meta-Analytic Review of the Effets of Childhood Abuse on Medical Outcomes in Adulthood.” *Psychol Med*, sec. 71(8).

Wierda, R.J. 2010. “Epigenetics in Atherosclerosis and Inflammation.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, sec. 14(6a).

Witzmann, S. 2012. “Epigenetic Regulation of the Glucocorticoid Receptor Promoter 1 7 in Adult Rats.” *Epigenetics*, sec. 7(11).

Wollfe AP. 1999. “Epigenetics: Regulation through Repression.” *Science*, sec. 286.

Wood, D. 1984. “Cold Pressor Test as a Predictor of Hypertension.” *Hypertension*, sec. 6(3).

Wust, S. 2004. “Common Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene Are Associated with Adrenocortical Responses to Psychosocial Stress.” *J Clin Endocrinol Metal*, sec. 89.

Yang, G. 1988. “Localization of Glucocorticoid Receptor Messenger Ribonucleic Acid in Hippocampus of Rat Brain Using in Situ Hybridization.” *Molecular Endocrinology*, sec. 2(8).

Yehuda, R. 2009. “Gene Expression Pattern Associated with Posttraumatic Stress Disorder Following Exposure to the World Trade Center Attacks.” *Biol Psychiatry*, sec. 66(7).

ANNEXES

Annexe 1: Mécanismes épigénétiques

Annexe 2: Echelle visuelle analogique utilisée dans l'étude EpiPath

Annexe 3 : Diagramme de l'étude CPT

Annexe 4: Childhood trauma questionnaire (CTQ)

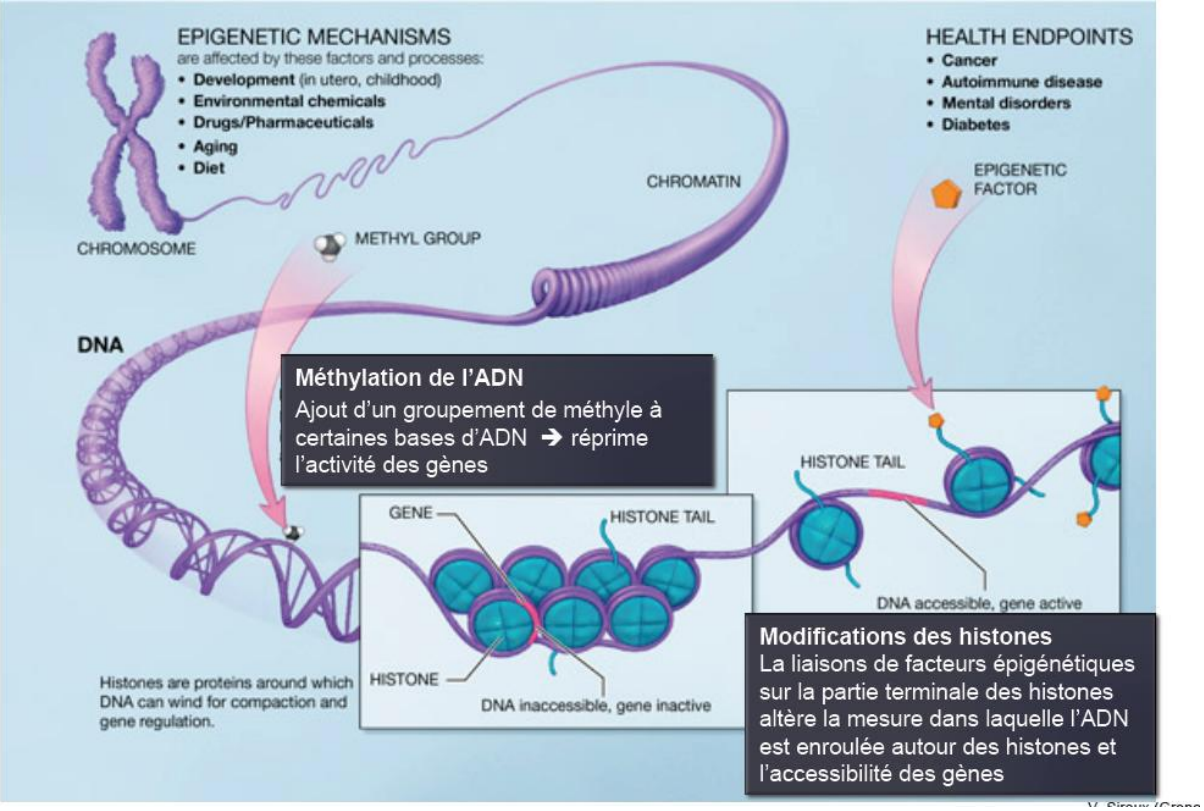
Annexe 5 : Version rectifiée du dossier de demande d'autorisation au CNER (comité d'éthique national)

Annexe 6 : Lettre de réponse favorable avec conditions du CNER

Annexe 7: Courrier de réponse favorable de l'ERP (Comité d'éthique de l'Université du Luxembourg).

Annexe 1

Mécanismes épigénétiques



Source : Siroux, V. 2013. "8e Congrès Francophone d'Allergologie." *Grenoble CFA*

Annexe 2

Echelles visuelles analogiques

EpiPath

Visual analogue scales

For the four questions below please rate how you feel by placing a cross on the scale that corresponds to how you are currently feeling, not during the previous minutes or hours.

- Please rate how much **pain** you are currently feeling. 0 is no pain whatsoever, and 10 is the worst pain imaginable.

  0¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦10

- Please rate your current feelings of **stress**. 0 is very relaxed and unstressed, 10 is unbearable stress

  0¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦10

- Please rate your current feelings of **arousal**. 0 is very sleepy, 10 is very awake or alert

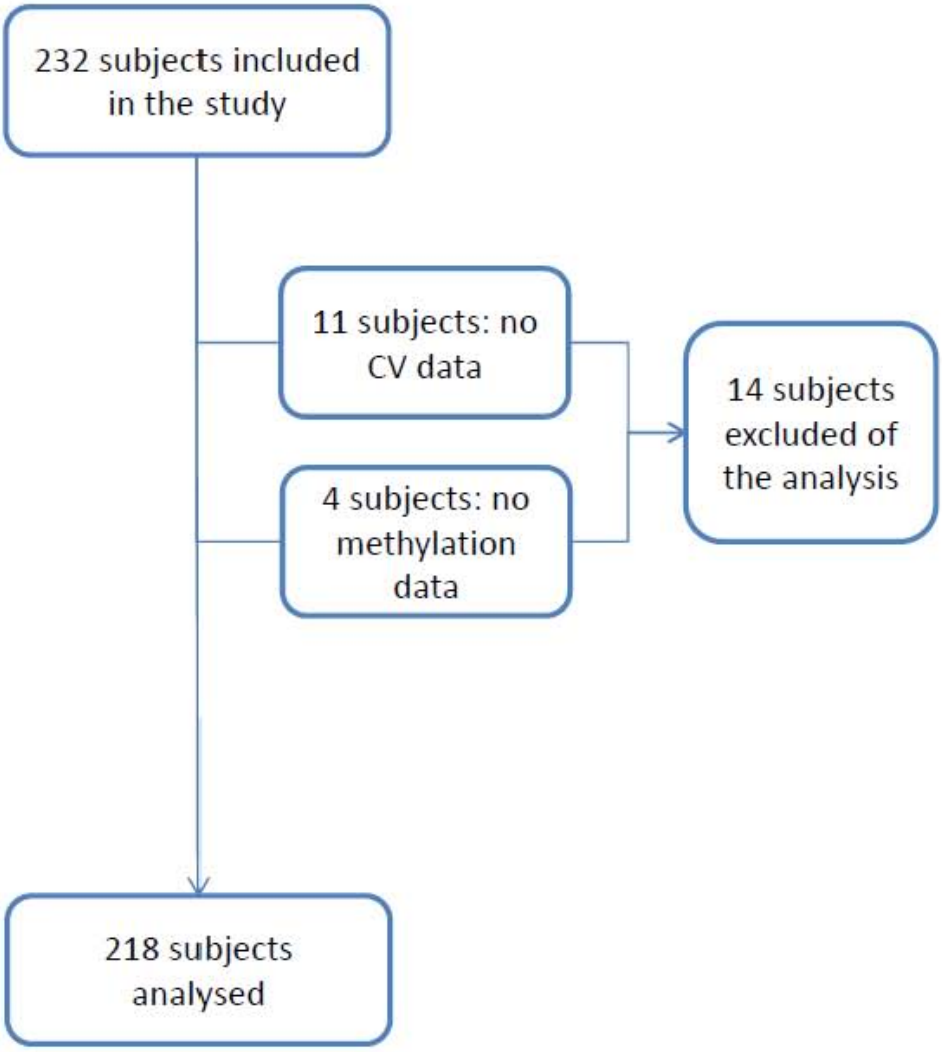
  0¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦10

- Please rate your current feelings of **anxiety**. 0 is very calm and collected, 10 is the highest anxiety imaginable.

  0¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦----¦10

Annexe 3

Diagramme de l'étude CPT



Annexe 4

Childhood trauma questionnaire (CTQ)

(Wright et al. 2001)

Below you will find a series of statements, which you are asked to rate according to how true you feel they are for you and your family. Please circle the number that best reflects your experience, where 1 means **never** and 5 means **very often**.

People in your family called you things like stupid, lazy, or ugly.	1	2	3	4	5
You thought your parents wished you had never been born.	1	2	3	4	5
People in my family said hurtful or insulting things to me.	1	2	3	4	5
I felt that someone in my family hated me.	1	2	3	4	5
I believe that I was emotionally abused.	1	2	3	4	5
I got hit so hard by someone in my family that I had to see a doctor or go to the hospital.	1	2	3	4	5
People in my family hit me so hard that it left me with bruises or marks.	1	2	3	4	5
I was punished with a belt, a board, a cord, or some other hard object.	1	2	3	4	5
I believe I was physically abused.	1	2	3	4	5
I got hit or beaten so badly that it was noticed by someone like a teacher, neighbour, or doctor.	1	2	3	4	5
Someone tried to touch me in a sexual way, or tried to make me touch them.	1	2	3	4	5
Someone threatened to hurt me or tell lies about me unless I did something sexual with them.	1	2	3	4	5

Someone tried to make me do sexual tings or watch sexual things.	1	2	3	4	5
Someone molested me.	1	2	3	4	5
I believe that I was sexually abused.	1	2	3	4	5
There was someone in my family who helped me feel that I was important or special.	1	2	3	4	5
I felt loved.	1	2	3	4	5
People in my family looked out for each other.	1	2	3	4	5
People in my family felt close to each other.	1	2	3	4	5
My family was a source of strength and support.	1	2	3	4	5
I didn't have enough to eat.	1	2	3	4	5
I knew that there was someone to take care of me and protect me.	1	2	3	4	5
My parents were too drunk or high to take care of the family.	1	2	3	4	5
I had to wear dirty clothes.	1	2	3	4	5
There was someone to take me to the doctor if I needed it.	1	2	3	4	5

Annexe 5

Version rectifiée du dossier de demande d'autorisation au CNER (comité d'éthique national)

Dr. Jonathan D. Turner, and Prof. Dr. Claude P. Muller (Principal investigators), Department of Immunology, CRP Santé, B.P. 1102, L-1011 Luxembourg
Tel.: +352 490 604 220, Fax: +352 490 686, e-mail: claude.muller@CRP-SANTE.LU

EpiPath

Submitted for review by the National Ethic Committee
and the National Data Protection Committee

Version 2.0

24th April 2013

Deleted: 1

Deleted: 12th

Deleted: February

Principal investigators: Dr. Jonathan D. Turner, and Prof. Dr. Claude. P. Muller
Department of Immunology,
Centre de Recherche Public - Santé,
20A rue Auguste Lumiere
L-1950 Luxembourg
Tel : +352 490604 223. Fax: +352 490686.
Email claude.muller@CRP-SANTE.LU

UNIVERSITY OF LUXEMBOURG
Integrative Research Unit on Social and Individual Development (INSIDE)
Universität Trier

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

SUMMARY

Title of the study:	Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity - EpiPath
Principal investigators:	Dr. J.D. Turner, and Prof. Dr. C. P. Muller, Department of Immunology, Centre de Recherche Public - Santé, 20A rue Auguste Lumiere L-1950 Luxembourg Tel : +352 490 604 223. Fax: +352 490686. Email: claude.muller@CRP-SANTE.LU
Sponsor:	CRP Santé
Sponsors Medical Expert:	Prof. Claude P. Muller, MD 20A rue Auguste Lumière L-1950 Luxembourg Tel: +352 490604 220 Fax: +352 490686
Finance:	Fonds National de la Recherche / CRP-Santé
Planned start date: **Planned finish date:**	01.03.2013 31.12.2016
Expected number of participants:	280
Pharmacological intervention:	No
Investigated molecules:	DNA, RNA, hormones, cytokines, immune cells
Type of study:	Academic observational study
Scale of the study:	Luxembourg based, monocentric study
Co-Submission:	As University of Luxembourg staff members will participate in this study, it will also be submitted to the University Ethical Review Panel

CONFIDENTIAL

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

Table of Contents

1. Scientific Collaborators & study locations p6
2. Project outline p7
3. Scientific background "
   3.1 Aims of the proposed Study p10
4. Study design "
5. Protocol "
   5.1 Recruitment "
   5.2Outline of the two experimental visits p12
      5.2.1 SLST protocol p13
      5.2.2 Clinical Psychological evaluation p15
      5.2.3 ELA evaluation "
      5.2.4 Cardiovascular evaluation "
   5.3 Sample / Data Collection p16
   5.4 Online follow-up of URTI p17
   5.5 Laboratory assays "
   5.6 Power Calculation p18
   5.7 Risk assessment p20
6. Informed Consent "
7. Data Management p21
8. Insurance and Funding "
9. Investigator profiles "
   9.1 Prior work of the investigators p22
   9.2 Relevant publications from the laboratory p23
10. Description of the laboratory p25
11. Bibliography p26

CONFIDENTIAL

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

List of Annexes

1. Informed consent document
2. Participant information document
3. Visit 1 exclusion criteria questionnaire
4. Visit 1 Visual Analogue Scales
5. Validated Questionnaires

   Including:

   - Childhood Trauma questionnaire
   - Relationship Questionnaire
   - ARSQ (Rejection sensitivity)
   - Parental Bonding Index (PBI)
   - Family Adaptability and Cohesiveness Evaluation (FACES-IV)
   - Rosenberg Self Esteem Scale
   - Beck Depression Index (BDI)
   - International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)
6. Online URTI Reporting System Questions
7. Parental Interview Outline
8. Letters of Support for Recruitment
9. Participant ELA questionnaire

CONFIDENTIAL

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Abbreviations:

ARSQ	abreviated rejection sensitivity questionnaire
BDI	Beck depression index
BP	blood pressure
CAMI	cardiovascular-mental health-immune
CIEC	Centre D'Investigation Epidemiologique et Clinique
CTQ	childhood trauma questionnaire
ECG	electrocardiogram
ELA	Early life adversity
FACES-IV	family adaptability and cohesiveness evaluation
IL	interleukin
IPAQ	international physical activity questionnaire
MeDIP-Seq	Methyl-DNA Immunoprecipitation-Sequencing
NGO	non-governmental organisation
PASAT	paced auditory serial addition task
PBI	parental bonding index
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
SECPT	socially evaluated cold pressor test
SLST	standardised laboratory stress test
UID	unique identifier

Deleted: FAS foetal alcohol syndrome¶

Formatted: French (Switzerland)

CONFIDENTIAL

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

1. Scientific collaborators:

CRP-Sante – CIEC

Contact: Dr. Manon Gantenbein / Anna Chioti MD
Role: Clinical Centre where the experimental visit 1 will be performed

University of Luxembourg

Contact: Prof. Dr Claus Vögele
Role: Clinical psychologist and responsible for experimental visit 2

University of Trier – Research Institute of Psychobiology

Contact: Prof. Dr med. Hartmut Schaechinger
Role: Responsible for Laboratory stress test, and psychophysiological measurements.

CRP-Sante - Department of Public health

Contact: Daniel Witte MD PhD
Role: Consultant population epidemiologist

Study Locations

1. **CRP-Santé**
   Centre d'Investigation et Epidémiologie Clinique
   1A, rue Thomas Edison,
   L-1445 Strassen
   Tél: +352 26 970 801
   Fax: +352 26 970 810

2. **Uni-Lux**
   Research Unit INSIDE
   Faculty FLSHASE
   University of Luxembourg
   Route de Diekirch
   L-7220 Walferdange
   Tél: +352 46 66 44-9755
   Fax: +352 46 66 44 9535

CONFIDENTIAL

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

2. Project outline

EpiPath investigates the role of a well-defined health determinant, i.e. exposure to early life adversity (ELA), on the development of disease conditions in adulthood. The target population are orphans that were adopted by Luxemburgish families during the 1990s. All the recruited test individuals had experienced severe ELA. As a result, they have an increased risk for (i) cardiovascular and (ii) infectious diseases as well as for (iii) mental health problems and (iv) stress-related conditions. Using a multidisciplinary approach, this project explores the role of epigenetic mechanisms, by collecting large quantities of epigenetic, environmental, behavioural, and psychological data from these individuals, as well as functional data on the status of their immune, cardiovascular, cognitive and stress response systems. Integrating functional, behavioural, environmental, and epigenetic data will provide a broad and unique insight on the influence of ELA on the development of disorders that become manifest in adulthood.

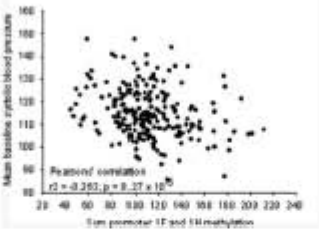
The hypothesis of the study is that ELA result in characteristic epigenetic methylation patterns in blood cells which can be detected by advanced Medip-Seq. The high-resolution genome-wide approach results in a large data-set that will be maintained for follow-up or complementary studies on the effect of ELA on other physiological systems beyond those investigated by EpiPath. It is envisaged that the cohort will be maintained for future studies and for following up on the observations made in this project.

3. Scientific Background

ELA and stress as risk factors for major public health diseases. A recent meta-analysis confirmed that severe ELA is among the most robust risk factors for three major public health problems: mental disorders (e.g. depression, attempted suicide [1-3]), cardiovascular disease (e.g. ischemic heart disease [4], stroke [1] and hypertension [1, 4, 5]) and upper respiratory tract infections (URTI [6-8]) and signs of reduced immuno competence [1, 9, 10] collectively referred to here as CAMI [11]. In particular, maternal separation during early life led to a significantly increased risk of psychotic, mood and personality disorders even 60 years later [12]. Also psychosocial stress is a well-known and highly significant risk factor for the above public health CAMI problems [13].

DNA methylation links the environment to the genome. In mammalian cells, DNA-CpG methylation plays an important role in the regulation of gene transcription and silencing [14], and is considered one of the principal interfaces between genome and environment [15-17]: it helps explain phenotypic variations in human populations caused by the environment [18].

CAMI and an altered stress response have been associated with epigenetic methylation in PBMCs. *Cardiovascular diseases* such as coronary artery disease have been associated with increased global DNA methylation levels [19, 20] and lower methylation levels in the promoters of some genes (e.g. *IGF2* [21]). Similarly, in cardiomyopathy differential DNA methylation inversely correlated with the expression of angiogenic genes [22]. In rodents, maternal nutrition modulated the methylation of renin-angiotensin system genes, and as a result blood pressure [23].



Accordingly recent work by the applicants has identified a link between the human glucocorticoid receptor promoter methylation and blood pressure. In a cohort of 223 healthy young adults of an age similar to EpiPath participants (mean age 23 years old), systolic BP was measured before, during and after a two minute cold pressor test. As shown (left), methylation of the GR promoter, measured by pyrosequencing using previously reported protocols [24] correlated negatively with the baseline systolic blood

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

pressure (BP). Similarly, a median split of the donors into two subgroups based on GR promoter methylation levels showed that lower methylation donors had a higher BP throughout the cold pressor procedure, including a higher stress induced peak BP. This appears to share a common mechanism with the rat renin-angiotensin system model above, since the glucocorticoid receptor is also known to be epigenetically programmed by maternal nutrition [25, 26] or maternal care [27].

Immune function: Normal and impaired immune functions are susceptible to epigenetic methylation e.g. differential methylation of the *IL-4* and *IFNγ* loci in normal Th1/Th2 lymphocyte differentiation [28], or global hypomethylation of DNA and low levels of DNA methyltransferase activity in systemic lupus erythematosus [29]. Inhibitors of DNA methyltransferase activity, reduce global methylation and are susceptible to inducing lupus [30]. In rheumatoid arthritis methylation of the IL-6 gene inversely correlated with LPS stimulated macrophage *IL-6* expression [31].

Mental Health: A role has been proposed for DNA methylation in major depressive disorder (MDD; e.g. *PRIMA1*[32]) and other mental disorders [17, 33]): e.g. several anti-depressants alter global and gene specific methylation levels in the rodent brain, as part of their mechanisms of action [34, 35]. Methylation of the serotonin transporter (5-HTT) promoter exacerbates behavioural stress reactivity in monkeys, and increases the risk of mood disorders [36-39].

Stress response: Stress response genes have been clearly shown to be susceptible to epigenetic methylation. E.g., hippocampal glucocorticoid receptor (GR) expression, essential in regulating the stress response is susceptible to DNA methylation [27, 40]. Methylation of the rat promoter 1_7, orthologous to the human 1F, lowers *Gr* 1_7 transcript levels and alters the stress reactivity of rats throughout life [27, 41]. We have shown in particular that the 5 human GR promoters known to be active in blood lymphocytes (1D, J, E, F, and H) are all susceptible to epigenetic methylation [42, 43]. Methylation levels in these promoters were stochastic and unique, suggesting highly individualised regulation of GR levels [43, 44].

All of the above and many other studies have shown that stress and CAMI disease entities are associated with differential epigenetic methylation in PBMCs. EpiPath takes an identical approach, using PBMC methylation as a surrogate for other organ systems. Previously, we have demonstrated that the predominant CD4 and CD8 lymphocyte subsets both have similar methylation levels at least within the most important immune response genes of a same donor [45] and methylation levels of most genes are reflected in PBMCs.

ELA influences the stress response via epigenetic methylation. While the above examples show that CAMI have been associated with differential DNA methylation in PBMCs, the influence of ELA on methylation in these conditions has so far received little attention. In contrast, there is strong evidence of the modulation of methylation by ELA affecting the stress response. In the rat model of ELA, pups receiving poor care have a more responsive HPA axis throughout their lives [41, 46]. Low maternal care associated with a low *Gr* expression [41] and high levels of methylation (80-100%) of a fully conserved key CpG site in promoter 1_7 in the hippocampus [27, 47, 48]. However, the situation is so far less clear in humans. Methylation levels of the GR 1F promoter in newborns was sensitive to maternal mood during pregnancy, also altering the HPA stress reactivity during infancy [49, 50]. In the Dutch hunger winter cohort the observed association between GR promoter 1F methylation and the adult stress response was also explained by environmental influences (e.g. education, lifestyle) but not necessarily by ELA [51].

ELA may act via the stress response system on CAMI. Multiple studies have shown very high rates of co-morbidity and common risk factors between these disease entities [52, 53]. Alterations in the stress response system, particularly the HPA axis are believed to play an important role, but the exact mechanisms linking them to ELA remains elusive. A poor early life environment has a

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

lifelong effect on the stress response in both humans [54] and animals [55-57]. In rodent models, maternal separation results in an exaggerated stress response later in life [58], while in humans both blunted and elevated cortisol responses to stress have been observed after ELA [54, 59]. Such increased, or prolonged stress reactions predict cardiovascular disease risks (reviewed in [60]), especially, hypertension [61], pre-clinical atherosclerosis [62, 63], and stroke [64]. Similarly, hyperactivity of the HPA axis is the most consistent endocrine abnormalities observed in depression over the last 40 years [65]. Among the many psychosocial parameters investigated, stress had the strongest association with susceptibility and outcome of URTI [66]. Conversely, psychological interventions aimed at stress reduction significantly reduced the duration of URTI and increased sIgA levels, with improvements persisting over a 1 year follow-up period [67].

Adoptees with ELA. Institutionalisation followed by adoption is a standard model of ELA. The work of Gunnar et al [68-70] has clearly shown that even in the best institutions, paid employee caregivers who work in rotating shifts, are universally in charge of a relatively large number of children, with ratios of children:caregiver regularly exceeding 20:1. This, by definition, results in infants receiving continuously unstable care, uniformly lacking in both quality and quantity [71]. This lack of a stable caregiver is the most potent stressor currently known for human (and non human primate) infants [72], and it has also been shown that the lack of a stable carer in what would otherwise be considered an enriched environment significantly alters both social and emotional behaviour for many years post adoption [73-75]. Here we summarise results from studies investigating CAMI risk and stress responses in adoptees or similar cohorts.

Deleted: In the late 1980s and early 1990s many children were adopted into affluent Western families from orphanages in the ex Soviet bloc, particularly from Romania. Many of these children had experienced very poor early life conditions

Deleted: Romanian

Psycological sequelae: The psychological development of these adoptees has been followed by the English and Romanian Adoptees (ERA) study [76, 77]. The authors identified at age 6 a series of deprivation-specific psychological patterns (DSP) concluding that quasi-autism (Q-A), disinhibited attachment (DA) inattention and over-reactivity (I/O) and severe cognitive impairment (CI) persisted to age 11 and 15 [78, 79]. At age 15 the severity of the outcome concurred with duration of institutionalisation (< or >6 months)[80]. The psychological assessment suggested that "the majority would ultimately be able to hold a job and live independently, but it remains to be seen if this is the case" [78].

Cardiovascular risk: There is little data on ELA in adoptees and cardiovascular risk factors. The Minnesota International Adoption Project (MIAP) observed an increase in sympathetic tone at age 10-12 in late adoption/post institutionalised subjects [69], concordant with the reported protective anti-inflammatory role of parasympathetic tone in cardiovascular disease [81].

URTI risk: There is currently no data on institutionalised children and the risk of URTI in adulthood. EpiPath will provide such data.

Stress response: MIAP demonstrated disturbances in the HPA axis which increased with the duration of institutionalisation. The child specific-TSST was inconclusive due to the generally low responsiveness of children at age 12. EpiPath will recruit donors at an age at which laboratory stressors can be reliably used [82].

Deleted: Subjects adopted from Romanian orphanages are now reaching the

DNA methylation: In a limited methylation study differential methylation was observed in immune response and cellular signalling genes, and were also observed in institutionalised children at age 7-9 [83]. However, in these children there were no data available on the ELA, or subsequent physiological and psychological sequelae.

Overall, these studies have all shown that adversity such as institutionalisation in early life causes mental health problems, as well as altering the HPA axis response and important cardiovascular readouts.

Working hypothesis. We suggest that there is a specific epigenetic response pattern to ELA which enhances the susceptibility to a wider spectrum of CAMI pathologies, providing a "high

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

risk" background for these diseases. The enhanced susceptibility of developing CAMI pathologies may depend both directly upon genome-wide epigenetic modifications as well as indirectly on the altered stress response and poor stress adaptation.

3.1. Aim of the study

The overriding objective of EPIPATH is to understand the impact of ELA on epigenetic methylation and the consequences for the stress response system and CAMI, four of the most important public health burdens.

Thus EpiPath will:

1. Identify measurable biochemical and physiological markers in early adulthood that are associated with severe ELA.

2. Identify genes, genomic regions, epigenetic patterns and pathways that are susceptible to epigenetic modulation by severe ELA.

3. Relate these epigenetic patterns and altered pathways to the results of the functional/physiological evaluation of the CAMI and the stress response system.

4. Both ELA and psychosocial stress are risk factors for CAMI pathologies. EpiPath will provide clues whether ELA associated impaired stress response is a common risk factor for these diseases entities.

5. Identify characteristics of ELA (e.g. duration of institutionalisation, level of deprivation, time) that are particularly detrimental.

6. To examine the fundamental nature and identify characteristics of epigenetic methylation induced by severe ELA, especially with respect to the geography of the genomic regions implicated (e.g. genes, promoters, CpG islands, or CpG island shores).

7. To examine the significance of epigenetic modifications in circulating immune cells with respect to potentially impaired specific immune functions of these cells.

8. To re-examine the use of PBMCs as surrogate readouts for methylation levels relevant for other organ systems in particular those involved in the stress response and CAMI.

4. Study design

This is a monocentric academic observational study of the effects of ELA on adult pathology. A group of young adults having experienced severe ELA adopted by families living in Luxembourg will be recruited, together with a suitable control group (Section 5.1). All subjects will be invited to two experimental sessions (Section 5.2), where amongst others a standardised laboratory stress test (SLST; visit 1) and a routine clinical psychological interview (visit 2) will be performed.

All donors will undergo the full SLST protocol and clinical interview. It is not envisaged that the ELA and control subjects will be sub-divided into donors receiving the SLST or a control (warm water) condition.

The travel costs of the donors will be re-imbursed if necessary.

5. Protocol

5.1 Recruitment

Adoptions in Luxembourg are under the supervision of the "Central Authority for adoptions" (Autorité Centrale des Adoptions) of the Ministry of Family and Integration (Ministère de la Famille et de l' Intégration). Organizations that are involved in adoptions are accredited with this Central Authority. The largest and most important organisation is the Luxembourg Red Cross

which operates the Maison de l'Adoption and the Service de l'Adoption. This organisation promotes adoptions from all countries including Eastern European and developing countries. Most other organisations have specialized according to countries or geographic regions.

Participating organisations. The Ministère de la Famille and the Autorité Centrale des Adoptions are highly supportive of the project (see letters of support, Annex 8) and together with the NGOs and the adoption associations operating in the late eighties and early nineties have offered their services for contacting and recruiting the participants:

- The Director of International Solidarity (Mr. Marc Crochet) of the Red Cross has agreed to participate with both the Maison de l'Adoption and the Service de l'Adoption. Both of these departments have the contact details of more than three hundred adoptees and their families many from situations where ELA was experienced.
- Roumänesch Kanner an Noud has volunteered to help with the recruitment of adoptees from Romania during the early nineties. They have contacts lists of 124 adoptees that were adopted by 80 families.
- Amicale Internationale d'Aide a l'Enfence asbl (AIEAE) have been active during the required time period, with ministerial accreditation from 1993 onwards, assisting in adoptions from South Korea and India.
- Association Luxembourg-Pérou was created in 1991 and are active in assisting in adoptions from Peru
- S.O.S. Enfants en Détresse, Mersch has been active during the required time period assisting in adoptions from Brezil.
- Other Luxembourg based NGOs may be added as required.

Recruitment strategy for adoptees. Collectively, the above associations and individuals have the contact details of virtually all the families that adopted post-institutionalisation individuals of a suitable age. They will be our initial point of contact with the foster families. The associations have agreed to contact the parents and to ask them to agree that EpiPath researchers will contact them. We will explain the objective and the implications of the programme. The parents will in turn talk to the adoptees to encourage their participation. If they agree, the adoptees will be contacted by EpiPath recruiters. Since the adoptees are already of full age they may also be contacted directly depending on the situation. Most of the foster parents are well educated and have a high socioeconomic status facilitating their participation.

Together with the different adoption associations we have estimated the total number of eligible participants to be in the order of 250-300. This provides a large pool of post-institutionalisated and adopted individuals in Luxembourg from which we will recruit 120 participants. This includes individuals irrespective of their geographic and ethnic origins. The parents will be contacted in monthly batches to reduce the time delay and potential dropout between the initial contact, recruitment, and the on-site visits.

Inclusion/exclusion criteria for adoptees. EpiPath will recruit ELA subjects that have been institutionalised and adopted in early life irrespective of their gender, age at adoption, ethnic or geographical origin and current or past nationality. To have an optimal response to the SLST all participants will be between 18 and 30 years old. Since the recruitment will continue into 2016 donors born between 1983 and 1998 will be eligible. Current psychotic mental health problems that would put participants at risk from suffering adverse consequences of taking part in the study (e.g. psychotic disorders) are formal exclusion criteria in addition to health conditions that are not compatible with the examinations. Obviously, participation is entirely voluntary and written informed consent of all participants will be obtained. Measurement of ELA using the Childhood

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Formatted: English (U.K.)

Deleted: children from Romania and other countries in the late 1980ies and throughout the 90ies and later

Deleted: about

Deleted: including Romanian, Bulgarian and to a lesser extend some other former Soviet bloc countries

Deleted: potential ELA subjects

Deleted: individuals with ELA

Deleted: Nevertheless, if the recruitment falls short of sufficient numbers of such adoptees we will include adoptees with ELA from other countries, giving priority to former Soviet bloc countries before countries such as e.g. Brazil, Peru, or Asia. If it is necessary to widen the geographic origin of the donors, inclusion will be based on ELA criteria.

Formatted: Font: Not Italic

Deleted: with ELA that were adopted preferentially from Romanian parents or orphanages between 1985 and 2000, irrespective of the gender or age at adoption. All participants will be 18 years or older. Since the recruitment will go until end of 2014/beginning of 2015 donors born before 1997 will be eligible.

Deleted: There are no categorical exclusion criteria based on the current health or psychological status of the adoptees, except for

Deleted: . Our definition of ELA includes any type of early life adversity including pre-, peri-, and post-natal as well as adversity caused by the adoption itself.

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Trauma Questionnaire, Parental Bonding Index, and Relationship Questionnaires will be part of the psychological characterisation (Section 5.2.1).

Recruitment strategy for control subjects. The ideal control cohort would be either (i) genetically matched individuals without ELA and parent-raised and fully integrated socially and language wise in Luxembourg; or (ii) parent-raised Luxembourgish subjects e.g. non-adopted siblings from the same family with uneventful childhood; or (iii) parent-raised Luxembourgish age and sex matched individuals with uneventful childhood. Principally we will recruit non adopted siblings. From the same family, adoptees will be recruited and tested before the control siblings will be tested. Also the control group will be tested for ELA and a cut-off on the Childhood Trauma Questionnaire, Parental Bonding Index, and Relationship Questionnaires will be defined beyond which the control donors will be excluded.

Deleted: Romanian children

In case we were unable to recruit sufficient numbers of non-adopted siblings we will recruit age and sex matched Luxembourg parent-raised children with no history of ELA from the immediate social circle of the adoptees.

Inclusion/exclusion criteria for controls. Exclusion criteria for control subjects will be any pre-existing chronic health problem or any form of early life adversity, such as divorce of parents, or the death of a close relative (e.g. parent or sibling) etc. Control donors will be characterised the same way as the adoptees, and those with questionnaire scores above a predefined level will be excluded. We do not envisage problems with the recruitment of the age and sex matched control group as we can recruit suitable donors without a history of ELA from the general population.

The actual contacting and recruitment will be coordinated by a dedicated staff hired by EpiPath.

5.2 Outline of the two experimental visits

The participants will attend two independent evaluation sessions.

Visit 1: Visit 1 includes a SLST, questionnaires, blood sampling, saliva collection and cardiovascular / autonomic nervous system evaluation. Blood and saliva samples will be obtained before and after the SLST to assess the neuroendocrine response to stress and the effect of stress on immune functions. Cardiovascular and autonomic nervous system function will be monitored non-invasively under resting conditions and in response to stress. A computer or paper based series of questionnaires to evaluate key personality and cognitive traits will be answered after the completion of the stress test. Buccal epithelial cells will be collected prior to the SLST. Figure 1 below summarises the schedule of collection of various samples during visit 1.

Deleted: Subjects will be photographed and clinical features of foetal alcohol syndrome will be assessed.

CONFIDENTIAL

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

Donors will be asked to sign the informed consent either prior to visit 1, or immediately upon their arrival for visit 1. Subjects will be asked to complete a questionnaire (Annex 3) covering the exclusion criteria prior to starting visit 1.

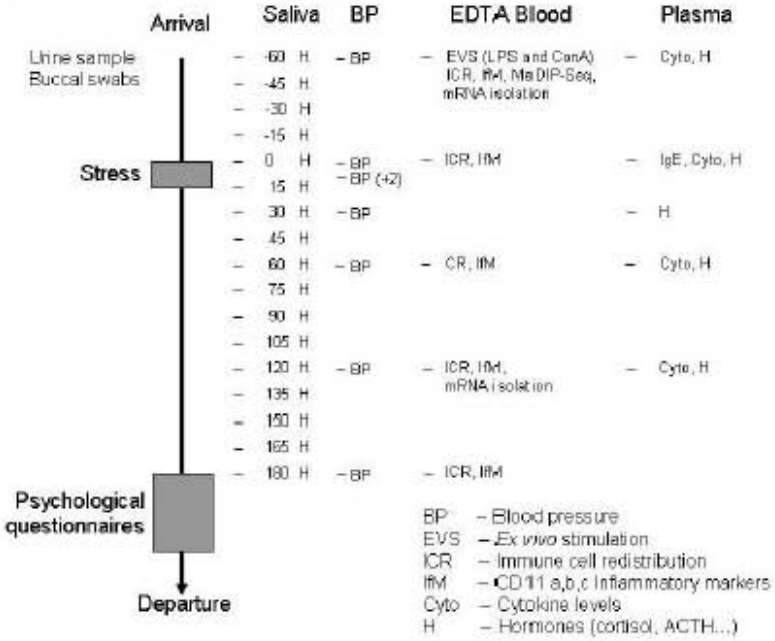


Figure 1. SLST (Visit 1) Schedule

Visit 2: A clinical psychological evaluation, "Visit 2", will be performed to assess mental disorders on Axis I and II of the DSM IV-TR using a structured clinical interview (SKID-I and SKID-II). The SKID yields lifetime-, period-, and point-prevalence rates for the following mental disorders: all anxiety disorders, all affective disorders, hypochondrias, somatisation disorder, conversion disorder and pain disorder, substance abuse and dependence, bulimia nervosa and anorexia nervosa (SKID-I), and personality disorders (SKID-II).

All visit 1s will take place at the Clinical and Epidemiological Investigation Center (CIEC) of the Centre de Recherche Public. The CIEC is highly qualified and certified to conduct clinical research. The personnel of the CIEC are qualified nurses and doctors, and are highly experienced in clinical studies (http://www.crp-sante.lu/Competence-centers/Clinical-and-Epidemiological-Investigation-Center-CIEC and http://www.luxclin.lu). Visit 2 will be performed at either the Research unit INSIDE of the University of Luxembourg, or within the CIEC, depending on the space available within the CIEC.

5.2.1 SLST protocol

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

A standard laboratory stress test (SLST) consisting of the "socially evaluated cold pressor test" SECPT [84] combined with a "paced auditory serial addition task" PASAT [85] will be performed. The PASAT has been successfully used to induce mental stress responses [86, 87] and the cold pressor element is known for many decades to induce stress [88]. There is a lot of experience of how to measure and medically supervise cold pressor tests with the purpose of pain induction / measurements, autonomic nervous system function testing [89] as well as stress induction [90]. The cold pressor element is considered unspecific in that it may be applied to any limb and the head (typically forehead). Here, the proposed variant of the test [84] consists of placing both of the subjects' unclothed feet in cold water (+/- 4 Deg C) for a limited time period of 3 minutes. Subjects will be informed that they may withdraw their feet from the cold water at any time of the experiment. However, they will be encouraged to keep their feet in the cold water for the entire test period, during which the PASAT will be applied. For this purpose, the subjects will be presented with an audio recording of 60 one-digit numbers with a stimulus interval of 2.5 seconds. They will be asked during each interval to calculate the sum of the two last numbers heard. The subjects' responses will be recorded on audio-tape for post hoc analysis of their responses. During this period the subjects are socially evaluated by experimenters in the testing room. Subjects may then dry their feet manually and replace their footwear.

Before, during, and after the test subjects' autonomic and cardiovascular activity markers (ECG, blood pressure, electrodermal activity [91-94]), subjective ratings, and blood samples will be assessed by established procedures. ECG will be measured using a standard electrode II configuration and electrodermal activity by thenar and hypothenar electrode positions with a Biopac MP150 system with ECG100c and GSR100c amplifier module or similar. Physical activity will be concomitantly measured with a system compatible with the BioPac ECG, to allow the correction of activity related ECG and respiratory artefacts. Cuff measured BP will be obtained as outlined in Figure 1 during the preparatory period, immediately pre- and post- stress as well as during the post stress awakening period using a standard automated cuff device such as a Critikon Dinamap SX1846. During the SLST beat to beat blood pressure will be recorded using a Finnometer PRO (or similar) to provide non-invasive hemodynamic estimates, such as stroke volume, total peripheral resistance and cardiac output as well as pulse rate (variability) and baroreflex sensitivity of heart rate control. Subjective ratings will be recorded on a visual analogue scale for pain, stress, energetic arousal (awake vs sleepy), and anxiety. Paper based visual analogue scales will be used and subjects will be asked to place a cross on the scale indicating how they feel for each component. The VAS are included as Annex 4.

After the completion of the SLST to ensure adherence to the post-stress recovery period, as well as ensuring a uniform and full development of the stress reaction, subjects will be asked to engage in low arousing button press and decision games, including watching un-arousing pictures and videos. Visit 1 will last approximately 4 hours, during this time subjects will have access to snacks e.g. biscuits and drinks e.g. tea, water, fruit juice etc.

SLST specific exclusion criteria

Deleted: ¶

The SLST induces a moderate psychosocial and physical stress that is within normal physiological limits. The cold stimulation element is clearly aversive, but something that subjects will likely have experienced on a voluntary basis previously e.g. making snowballs without gloves, or standing with their face exposed during winter time, winter sports, or similar. As such exclusion criteria of the SLST are limited to the subjects' inability to place their feet in cold water for the required time. We will specifically ask for signs of Raynaud's syndrome or any evidence of cold agglutinin disease, as well as pre-existing arterial hypertension. These points are covered in the initial questionnaire (Annex 3) and in the initial blood pressure monitoring.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

The subjects' eligibility for the blood sampling and the SLST will also be subject to the supervision of the medical professional in charge.

5.2.2 Clinical Psychological Evaluation

Participants will be psychologically assessed using a structured clinical-psychological interview (SKID-I and SKID-II) that allows for the diagnosis of mental disorders on Axis I and II of the DSM-IV-TR. In addition, participants will be asked to fill in a range of questionnaires designed to assess ELA and related personality constructs (e.g. attachment security, rejection sensitivity, depression, self-esteem) as outlined in section 5.3. All psychological assessments (i.e. interview, questionnaires) are routinely used in research and clinical practice, and are available in English and validated German translations. All assessments will be carried out by a specially trained psychologist under the supervision of a chartered Clinical Psychologist/Psychotherapist (Prof. Dr. Claus Vögele). There are no contra-indications or exclusion criteria specific to the Clinical Psychological Evaluation. A copy of SKID-I and SKID-II is available upon request.

5.2.3 ELA evaluation

In addition to the psychological evaluation, data will be collected on the pre- and immediate post-adoption period from the donors and their parents. Donors will be asked to give their informed consent for EpiPath investigators to contact their parents, and perform either face to face or telephone interviews to document the individuals' the pre- and immediate post-adoption period. This interview will be preferentially performed by telephone. An example of the structured interview is given in Annex 7, the parents will be asked to agree to the audio recording of the interview, the study aims will be explained, and they will be asked to provide a clear verbal consent to their participation. A similar questionnaire has been included for the participants to quantify ELA. The nature (emotional abuse, physical abuse, sexual abuse, emotional neglect and physical neglect), the intensity (based on a score related to the number of categories of adverse childhood events reported) and the duration (duration of institutionalisation) of ELA will be measured through questionnaires (Annex 9). Reliable measurement of the frequency and severity of child maltreatment is not straightforward. No published norms exist for adult survivors of abuse in childhood, specifically.

The perceived trauma will be measured using the CTQ (Annex5). Responses to the CTQ questions (annex 5) are scored, and several thresholds have been experimentally determined as corresponding to different levels of perceived traumatism, and has been validated as a classificatory diagnostic tool [95].

	Threshold scores for CTQ		
	moderate to severe	intermediate	none
emotional abuse	> 13	8 -13	< 8
physical abuse	> 10	7 – 10	< 7
sexual abuse	> 8	5-8	< 5
emotional neglect	> 15	9-15	< 9
physical neglect	> 10	7 - 10	< 7

Although the CTQ is a subjective measure of the participants' perception of their ELA, it has been reliably used in a large number of studies to investigate the effects of ELA on anxiety disorders. These questionnaires will enable the study team to document the intensity, the duration and the nature of ELA experienced

5.2.4 Cardiovascular evaluation

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Formatted: Font: 11 pt, Not Bold

Cardiovascular and autonomic nervous system (ANS) reactivity to stress as predictors of future cardiovascular health: Stress induces rapid changes in the cardiovascular system, e.g. increases in heart rate (HR), cardiac stroke volume, and arterial blood pressure (BP). These changes are controlled by two branches of the ANS. Parasympathetic withdrawal contributes to the initial HR increase, whereas BP changes reflect sympathetic activation of cardiac ventricles (inotropy) and peripheral resistance vessels (vasoconstriction). These hemodynamic changes have a protective function in the case of acute danger. However, there is ample evidence that frequent exposure to stress and exaggerated cardiovascular stress reactivity impairs cardiovascular health. A recent meta-analysis of SLST supports this and suggests that blood pressure and autonomic nervous system reactivity to stress predict the progression of cardiovascular risks [96]. Standardized mental arithmetic stress tests and computer-based challenging tasks increase sympathetic nervous system activity and blood pressure [97] and these responses predict long-term blood pressure development [98] insulin resistance [99] as well as coronary artery calcification [100]. Blood pressure responses to the cold pressor test [101] have been shown to predict the development of arterial hypertension in later life.

Formatted: Font: 11 pt, Not Bold

5.3 Sample / Data Collection

Deleted: ¶
5.2.3 FAS Evaluation¶
To control for differences in maternal alcohol consumption during pregnancy Foetal Alcohol Syndrome (FAS) will be evaluated in all subjects using a standardised technique (Diagnostic Guide for FAS and related conditions – Second edition, U. Washington 1999). FAS will be evaluated from growth records, scoring of the facial phenotype, and cognitive function. Growth records, when available, will be extracted from subjects Luxemburgish "Carnet de Sante". The Foetal Alcohol Syndrome (FAS) facial phenotype will be evaluated by trained personnel from a digital photograph taken during visit 1. Cognitive function will be evaluated during the clinical psychological interview.¶
To ensure subject anonymity, the photograph taken to evaluate foetal alcohol exposure and FAS will be annotated with the UID and evaluating personnel will have no access to the informed consent sheets contain personal information about the donor. ¶

Blood Samples

As soon as donors arrive in the CIEC trained personnel (doctors, nurses, or lab technicians) will insert an indwelling intravenous canula for blood collection in standard anti-coagulant, or RNA stabiliser treated tubes. Blood samples will be collected before, during, and after the SLST as outlined in Figure 1. It is anticipated that a maximum of 200ml blood will be withdrawn, with an absolute maximum of 250ml being taken. This is in line with all our previous CNER approved studies e.g. Avis No 201001/02 Version 1.1

Saliva

Saliva samples will be collected before, during, and after the SLST as outlined in Figure 1 with suitable absorbent swabs such as the Salimetrics Oral System. The rhythm of saliva sampling is identical to that in a previous study approved by the CNER (Avis No 201001/02 Version 1.1)

Buccal epithelial cells

Buccal epithelial cells will be collected upon arrival at the CIEC (visit 1) with a suitable swab such as the Isohelix SK2 system. Cells will be collected by rubbing the swab for 1 minute against the inside of the subjects cheek using reasonable, firm and solid pressure.

Urine

Upon arrival at the CIEC (visit 1) subjects will be given a suitable plastic container and asked to provide a complete miction when possible during the experimental visit.

Questionnaires

Three hours after the SLST participants will be asked to reply to computer or paper based questionnaires Including the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ), which provides a reliable, valid screening for a history of abuse and neglect [102] Relationship Questionnaire (RQ.), measuring attachment security [103]; The ARSQ assessing rejection sensitivity [104]; Parental Bonding Index (PBI), a post hoc parent–child relationship quality assessment [105]; Family Adaptability and Cohesiveness Evaluation (FACES- IV), measuring family perceptions [106] and the Rosenberg Self Esteem Scale [107]. In addition, due to the suspected link between DNA methylation and mood disorders, the Beck Depression Inventory will be used [108]. As a potential co-variate in the cardiovascular measurements physical activity in the preceding week will be measured using the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) [109].

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Copies of the questionnaires are included as an annex to this application. Questionnaires will either be presented to the participants as paper copies that will be identified by the unique identifier, or on a computer based system, where data will be stored in association with the UID only. To avoid inconsistencies due to the use of different translations, participants will be presented the questionnaires in German only. All subjects have either been born or adopted into Luxembourgish families, and been educated in the Luxembourgish school system, and should have an adequate level of German. An inadequate level of German is an exclusion criteria for participation in the study.

If responses to questions in e.g. the childhood trauma questionnaire raise cause for concern, these will be followed up in the clinical psychological evaluation, and if necessary suitable action will be taken by the responsible clinical psychologist using standard protocols.

5.4 Online follow-up of URTI

Participants will be followed up for a 1 year period. Using an online self-reporting system donors report monthly on URTI symptoms (symptoms, severity, duration number of working days lost to URTI) using previously applied measures [8]. The online reporting system will also include questions an asthma, and allergy symptoms. The LimeSurvey system (www.limesurvey.org) has previously been used within CRP-SANTE in the EuroLight project (www.eurolight-online.eu). This system will be used in the same manner as in the previous CNER authorisation (Avis No 201207/07 v1). This system provides secure donor restricted access to the questionnaire, and all donors will access it using their unique study ID and a password of their choice. Questionnaire responses will be stored encrypted, and the investigators will only have access to the questionnaire responses in association with the UID. The questions included in this monthly questionnaire are included in Annex 6.

To ensure compliance with the monthly reporting, participants will be regularly re-contacted by e-mail to remind them to complete the questionnaire. All participants will be asked to provide a suitable e-mail address.

5.5 Laboratory assays

Laboratory assays will be performed on biological fluids (e.g. saliva, plasma or urine), as well as cellular assays on e.g. whole blood or PBMC ex vivo, and genetic analyses on extracted nucleic acids.

Biological fluids:

To assess the effectiveness of the SLST, as well as baseline immunological parameters panel of pro- and anti-inflammatory cytokines (such as TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12…) and the circulating hormones (e.g. cortisol and other steroid hormones, ACTH, and others) will be measured by commercial techniques e.g. ELISA. To assess the immune polarization towards a Th2 or atopic response baseline IgE levels and antibodies against vaccine preventable diseases and common viruses (EBV, HSV-1 [9]) will be evaluated. sIgA levels will be tested in saliva. Additional analytes may be added as necessary. These assays are labelled **Cyto** and **H** in Fig.1.

Cellular Assays:

Ex-vivo cell assays: To mimic the effect of stress the response of immune or buccal cells *ex vivo* to mitogens (e.g.LPS, ConA…), TLR specific stimuli and to specific viral or bacterial antigens will be tested in the presence and absence of dexamethasone (10-5 to 10-10 M). These assays will be done in microtiter plates on whole blood drawn before the SLST and the resulting cytokine secretion (e.g. TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12…) evaluated using conventional assays requiring only very low microliter amounts of plasma for multiplex cytokine testing (e.g.

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

Luminex). Additional cellular ex-vivo assays may be added as necessary. These assays are labelled EVS in Fig.1.

Flow Cytometry (IfM and ICR Fig. 1): Blood drawn at different time periods throughout visit 1 will also be used to measure the expression of cell surface, inflammatory, activation markers, and adhesion molecules by flow cytometry using standard staining protocols and markers. The effect of endogenous stress hormones on cellular redistribution will also be measured by flow cytometry as we have previously reported. These assays are labelled **IfM** and **ICR** in Fig.1.

Other Cellular assays: Cellular proteins will be extracted from stimulated and non stimulated cells and analysed in either a protein specific manner e.g. Western blot, or in a whole proteome manner, such as 2D-DIGE with peptide mass fingerprinting and MALDI-Tof analysis.

Genetic analyses:

Genomic DNA and mRNA will be extracted from anticoagulated blood or buccal cell samples as in Figure 1 (**MeDIP-Seq** and **mRNA** isolation).

Genomic DNA will be used in EpiPath for the immunoprecipitation of methyl-DNA, and subsequent next generation sequencing (NGS) (MeDIP-Seq). This technique identifies regions in the genome that are differentially methylated (DMR) between our ELA and control subjects. Sonicated (sheared) DNA will be immunoprecipitated with an anti-5-methylcytosine antibody. MeDIP libraries will be subjected to next generation sequencing on an IonTorrent PGM, or other similar machine. The generated reads will be aligned to a fixed human reference genome (e.g. NCBI 36/hg18) using standard software such as Maq (http://maq.sf.net/) or Bowtie [110]. Methylation levels will be quantified with the Batman algorithm [111] or similar.

For validation of the MeDIP-Seq, a number of DMRs identified by MeDIP-Seq will be pyrosequenced. The pyrosequencing will be performed according to our previously published protocols using a Pyromark ID and the PyroQ-CpG software (Qiagen) to measure the absolute methylation levels at individual CpG sites [24]. Additionally, a limited number of Infinium arrays will be performed to validate the DMR on the genome wide level. For pyrosequencing validation extracted DNA will be bisulfite-treated, amplified by PCR and sequenced to determine promoter methylation levels.

Messenger RNA will be extracted and used to quantify transcript levels of genes found to be differentially methylated by MedIP-Seq in addition to known stress induced genes e.g. FKBP and GILZ, CAMI related genes, and normalisation genes e.g. b-Actin, PPIA, or GAPDH. Standard PCR protocols available within the laboratory will be used. Whole genome transcriptomics e.g. RNA-Seq, microarray, or PCR arrays will be used to further characterise the genomic response.

Informed consent will be specifically obtained for these genetic analyses. The genetic analyses will be directly related to the aims and scopes of this project.

5.6 Power Calculation

Formatted: Font: Not Italic

There is currently little data available on the genome wide methylation in the general (non-cancer) population, complicating power calculations of our MeDIP-Seq study. In the following we estimate the size of the cohort that is necessary to see expected differences in the least sensitive test we will perform, the SLST. From this minimum cohort size, we subsequently estimated the statistical power of the MeDIP-Seq under several assumptions.

Power calculation of SLST induced cortisol response Using previous cortisol data (Institute of Psychobiology in Trier) from a Cold Pressor Test (CP) we calculated the number of donors necessary to have a power = 0.8 for alpha =0.05 in a one sided t-test for the area under the cortisol curve with respect to ground and the pre-stress level (AUCg and AUCi respectively) and the maximum difference in cortisol levels as shown in Table 1.

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

		AUCg	AUCi	Δ Cort[a]
Control	Mean	115.86	-24.37	-0.61
	SD	60.90	24.04	0.80
CP	Mean	149.84	10.57	0.01
	SD	97.21	67.05	1.74
	Δ Mean	33.98	34.94	0.61
# donors		71	27	61

Table 1 Cold Pressor test Power calculation
Alpha=0.05, power=0.8; 1 sided t-test
a, difference in post vs pre SLST cortisol level

Based on these calculations, a minimum of 70 donors per group and a similar number of control subjects are necessary to observe group differences in cortisol levels for cortisol AUCg. Subgrouping ELA subjects into groups of approximately 60 will maintain adequate statistical power to observe differences in the AUCi, but not the AUCg and Δ Cortisol levels.

MeDIP-Seq power: The power of the MeDIP-Seq is calculated in two parts, i) the identification of methylated regions within the genome of each donor, and ii) the power of the study to identify the regions differentially methylated between the two groups.

The power to identify methylated regions for any given donor is dependent only upon the number of Next Generation Sequencing (NGS) reads generated, the length of the human genome, and the number of CpG dinucleotides within the genome. For each donor we will obtain $2.4x10^7$ sequences (200bp long, approximately $4.8\ x10^9$ total base pairs sequenced). It has previously been experimentally determined that $2.6\ x10^7$ NGS reads of 40bp (Illumina reads, $1.04x10^9$ bases sequenced) provides >97 identification of methylated regions in the human genome [111]. As such, our proposed NGS, with a similar number of reads, and 4.8 times superior number of sequenced bases, has adequate power to detect methylated regions for each donor. Recent studies have identified approximately 50,000 methylated regions in the human genome.

To analyse regions differentially methylated between the ELA and control cohorts empirical Bayes statistics will be used, and moderated t-statistics, F-statistics as well as the Benjamini and Hochberg FDR will be calculated. To calculate the power of the MeDIP-Seq study methylation differences observed by Naumova et al in 28 institutionalised children and controls were used in a single tailed t-test calculation (Table 2). Naumova observed fold changes of 1.03-2.36 (increased methylation, average 1.09) or 1.04 to 2.04 (decreased methylation, average 1.33) with low σ [112]. We estimate that these fold changes correspond to differences in mean BATMAN percentage methylation values of between 10 and 30. The low σ observed were estimated to correspond to between 10 and 20. To correct for the testing of multiple methylated regions, Bonferonni corrections were applied, with alpha reduced from 0.05 to 0.000001, corresponding to 50,000 tested DMRs.

	Fold change[a]	Sigma[b]	Estimated Batman Δ Means	Power=0.8 alpha=0.05	Power=0.8 alpha=0.0001	Power=0.8 alpha=0.000001[c]
Model 1	1.1	10	10	17	49	72
	1.3	10	30	5	8	14
Model 2	1.1	20	10	64	183	269
	1.3	20	30	8	24	35

Table 2 MeDIP seq power Estimation.

[a] from [73]
[b] estimated from Figure 2 [123] and Figure 4 [73]
[c] alpha=0.05 after application of a Bonferroni post hoc correction equal to the testing of 50,000 DMR

The cohort of 70 donors necessary to obtain the statistical power desired in the SLST provides the statistical power to observe difference of 10% in the methylation level with an error of 10% in the measurement of the methylation level. ELA subjects will be subgrouped based on the results on the clinical psychological investigation or the length of time institutionalised using techniques such as a median split, as well as on sex. We anticipate recruiting 100-120 ELA subjects and 70 controls. The control cohort will not be subgrouped, and ELA subgroups will contain approximately 60 subjects, retaining the power to identify differentially methylated regions. Such

Formatted: Space After: 4 pt

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

group sizes exceed the numbers used in recently published clinical MeDIP-Seq studies. Recently Said et al. published the differential methylome of 12 AML patients and 4 controls [113]. Their relatively low number of donors revealed leukemia-associated DMRs in promoters, gene bodies, CpG islands as well as CpG island shores [113]. However, because of their small group size, few genomic regions remained statistically significant after correcting for multiple testing. Similarly Feber et al. identified 101 466 differentially methylated regions in three samples, but there was no information on repeated measures testing or statistical power [114]. We anticipate that our inclusion of a significantly larger number of donors in the analysis will similarly identify DMRs, and that we will obtain the statistical power necessary with 100-120 subjects in the complete ELA cohort, and 60 in a subgroup to be able to correct for the multiple testing using appropriate tests such as moderated t-statistics, F-statistics as well as B-H FDR.

5.7 Protocol risk assessment

Deleted: 6

There is a minor risk of vasovagal fainting associated with the visit 1 of the study, during placing the cannula and drawing blood during the SLST. It is known that vasovagal fainting may occur during such medical procedures.

To mitigate the risks associated with vasovagal fainting during cannula placement and blood drawing during the SLST, donors will be seated in an appropriate chair (e.g. standard blood drawing armchair) and all objects that may cause injury (e.g. sharp corners on desks, equipment etc) will be removed from the study area to avoid injury if, in the unlikely case, fainting occurs. Trained medical personnel will be available if fainting occurs. The risk of this occurring is further minimized by online monitoring continuous beat-to-beat blood pressure changes via a Finometer monitor during the SLST, which is standard equipment in the evaluation and diagnosis of vasovagal syncope.

All psychological assessments applied in the current project are routinely used in research and clinical practice with no known adverse side effects. The psychologist carrying out the assessments will receive special training and continuous supervision by a Chartered Clinical Psychologist/Psychotherapist. The risk involved for participants to experience adverse reactions in response to the psychological assessment will be further reduced by providing the possibility for participants to receive counselling directly after the assessment and/or to be referred to psychological counselling services in the unlikely event of this becoming necessary. The clinical interview exposes participants to a psychological stress that is equivalent or less to stressors encountered during everyday life [115-117].

Deleted: if they wish

Donors will be informed of these risks in the participant information sheet (Annex 2) and the measures in place to mitigate them.

6. Informed consent

The recruitment of participants is described in section 5.1. Prior to enrolment, participant will receive a participant information sheet outlining the study aims and protocol (Annex 2). Participants will also be informed by the doctor in charge, a trained assistant or technician of the aim of the study and the analyses that will be performed. Informed consent will be explained and will be signed by the participating donors prior to enrolment. The process of anonymizing the data will be explicitly explained to the donor. Consenting donors will keep a copy of the informed consent form. To preserve the anonymity of the donor the PI copy of the informed consent form will be the only record of the donors' personal details and the unique sample identifier (UID). All participants will be asked to provide their e-mail address in order to receive reminders for the online URTI reporting system and to provide a suitable e-mail address. Donors will also be asked whether they accept to be contacted in the future in the framework of EpiPath or its follow-on projects.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

In accordance with the specific ethic and data protection law requirements, donors will be asked to specifically consent to the collection of genetic data. The informed consent document is included as Annex 1.

7. Data management

Personal data including name, address, telephone number, and e-mail together with the unique identifier (alpha-numeric running code identifying study and sample number e.g. PSY-Epi-001) will be recorded on one copy of the informed consent only. Thus, the link between the unique identifier and the donor can only be traced back using the hardcopy of the informed consent form. Access to this record will be limited to the Head of Department (Prof. Dr med. Claude P. Muller). These hard copies will be securely stored in the office of the Head of Department who is a medical doctor and under the legal rules regarding professional secrecy. All sample tubes, questionnaires and electronic physiological data will be labelled with the unique identifier only. Limited personal data (birth year, gender, and the information of the questionnaires as well as the results) will be stored digitally only in combination with the unique identifier. Data will be stored anonymously, and only EpiPath scientists and personnel will have access to the data.

Donors will not be informed of the results since the individual results are meaningless for the donor (fundamental research without direct benefit for the patients involved). Experimental results will be stored electronically only in combination with the unique identifier of the donor. Results will be published without reference to the identity of the participating donors in an anonymous fashion. The donors will be informed of their rights in accordance with the applicable data protection laws and regulations.

All data and subject information will remain strictly confidential. People with direct access in accordance with laws and regulations (eg, investigators, those responsible for quality control, monitors, clinical research assistants, auditors and any persons to cooperate in testing) will take all necessary precautions to ensure the confidentiality of the information in particular as regards their identity and to results obtained. This project will also be submitted to the CNPD for approval.

8. Insurance and funding

CRP-Sante will subscribe a promoters insurance to cover this study. Laboratory work is covered from CRP and FNR Funds.

Both the Study Medical Expert (Prof. Dr med. C.P. Muller) and the Study Chartered Psychologist (Prof. Dr. Claus Vogele) are in addition covered by their professional liability insurance.

9. Investigator Profiles

Jonathan D. TURNER PhD, Co-Principal Investigator, PsychoImmunology Group, Department of Immunology, CRP-Santé, 20A rue Auguste Lumiere, L-1950 Luxembourg: +352 490604 223. Fax : +352 490686. Email : jonathan.turner@CRP-SANTE.LU.

Graduated (BSc, Hons) from Imperial College (London, UK) in chemistry. PhD from Aston University (Birmingham, UK) under the guidance of Professor William J Irwin, and Professor H. Oya Alpar on the development of nasal vaccine delivery systems. Postdoctoral training within the research department of Aventis Pasteur (now Sanofi Pasteur) and the Dept of Immunology, LNS, Luxembourg. Currently the PsychoImmunology group leader in the LNS / CRP-Santé. 2000-date Dr Turner has authored 22 peer reviewed publications and has 4 in preparation in the field of stress research.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

Claude P. MULLER, Co-Principal Investigator, Head of Department, Department of Immunology, P. O. Box 1102, L-1011 Luxembourg Tel : +352 490604 220. Fax : +352 490686. Email: claude.muller@CRP-SANTE.LU.

Head of the Department of Immunology, and of the WHO Collaborating Center for Measles and the WHO European Reference Center for Measles and Rubella, Luxembourg. He is Associate Professor of Experimental Medicine at the University of Homburg (Germany), Honorarprofessor at the University of Trier. He teaches also at the Doctoral School BIOSE of the University of Nancy (France). He graduated as a medical doctor from the University of Cologne, Germany and a Master of Science in Chemistry from the Weizmann Institute of Science, Israel. Postdoctoral training at the National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA. Specialist in Internal Medicine. He has graduated more than 50 doctoral students, published over 220 papers in immunology/virology and several patents. Academic awards include *the Sabin Prize for Vaccinology* in 1995, Deutsche Bank Preis 1997; Innovation Network, Award of Saarland-Wallonie-Rheinland Pfalz 2003, and others. He has obtained numerous scientific grants, both from national and international (e.g. EU, WHO) programmes. Prof. Muller is a member of the ECDC Measles Mumps and Rubella (MMR) Network Coordination group (since 2012). Member of the Flemish Research Foundation (FWO) expert panel MED 3 on infectious diseases in humans and animals (since 2010). One of the 7 members to the WHO Steering Committee for Measles (2000-2007); member of the Advisory Board of the Fraunhofer Center for Molecular Biotechnology and Vaccine Development, Philadelphia, USA (2002-2005); member of the Advisory Board of KEMIN Industries, Herentals, Belgium (since 2005) and Kemin's Worldwide Scientific Board of Advisors, Des Moines, USA (since 2010). He has served on numerous committees and expert panels including of the WHO Measles Programme as a Temporary Scientific Advisor since 1996 and other WHO ad-hoc panels; as an expert-consultant to the Ministry of Cooperation, the Ministry of Research, the Ministry of Health, (LU); programmes of the European Union (4th-7th Framework Programme), the Scientific Advisory Board of the University Center of Luxembourg; various commissions of the Chambre des Députés, Luxembourg (since 1999). He advised the Centre of Disease Control, Ghangxhi Province, China with respect to control of SARS and avian influenza (2005) and The Oyo State Government, Nigeria to control avian influenza. Laboratory Accreditations missions of the WHO Laboratory Network (Sarajewo, Banya Luka, Bosnia-Herzegovina; Blagoveshschensk, Russia; Bishkek, Kyrgistan, Skopje; FYR Macedonia). Prof. Muller performs extensive consulting and peer review activities for scientific journals, national and international funding agencies (Luxembourg, Austria, South-Africa, USA) and national governments (Luxembourg, Bosnia Herzegovina, Nigeria, Kyrgyzstan) including EU, WHO Worldbank, FAO, etc. Prof. Muller has also a long record of experience in working in and with developing countries in the health sector and served as a health sector consultant to numerous development agencies including UNICEF, UNHCR.

9.1 Prior work of the Investigators:

This project is part of the ongoing work of the PsychoImmunology team within the Department of Immunology, CRP-Santé. The PsychoImmunology team was started in 2003 with the nomination of Professor Muller to the chair in Immunology in the Dept of PsychoBiology at the University of Trier. Over the last 10 years the group has built up considerable experience in the transcriptional control and effects of the human glucocorticoid receptor. Since the initial report of environmental manipulation of DNA methylation controlling glucocorticoid receptor levels in the rat, we have shown that the human GR has an homologous structure [118], that the complete human CpG island is susceptible to DNA methylation [43], that the region upstream of each first exon is an active promoter that can be epigenetically silenced [42], and that in major depression (MDD) first exon levels are altered, although perhaps not by epigenetic mechanisms[24].

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

Recently, investigating the mechanisms underlying promoter 1F activation, we have shown that the transcription factor E2F1 plays an important role in activating the promoter (Alt et al submitted; Cao-Lei submitted) and that the overall methylation level of the promoter is perhaps of greater significance than the single CpG dinucleotide levels.

The group has gained considerable experience in clinical studies, a study on the role of the GR in fibromyalgia has been performed in conjunction with the University of Trier and published in peer reviewed journals [119, 120] and a postmortem human brain study on the GR in major depressive disorder has recently been published [24], and a recent study (CNER N° 201001/02 V1.1) has entered the data analysis phase. Working on the fundamental molecular mechanisms of glucocorticoid receptor actions, the team has published a total of 15 peer reviewed papers in the last 6 years. So far six PhD students (4 Summa cum Laude, 2 Magna cum Laude) students graduated in Psychobiology at the Institute, and currently 2 students are working towards their PhDs.

University of Trier: Hartmut Schachinger has experience with SLST including mental arithmetic task [121, 122], paced serial auditory serial addition tasks [86, 87], choice reaction time tasks [86, 87], Trier Social Stress Test [123], cold pressor test [84, 124], chess game [125], hypoglycaemia [92], lower body negative pressure [126], blood loss [127], as well as intravenous pharmacolological stimulation with yohimbine [87], catecholamines [94], cortisol [128], and acute vasodilators [94]. He published on acute stress effects in the following domains: peripheral hemodynamics [86], central hemodynamics [129], endocrine system [130], autonomic nervous system [92], behaviour [131], and cognition [132]. He participated in studies on subjects with cardiovascular risks [133], and studied physiological meachanisms potentially predisposing to the development of arterial hypertension [134, 135]. Recently, he and his team developed a "socially evaluated" version of the cold pressor test, which was able to induce profound changes in cardiovascular as well as hormonal measures [84].

University of Luxembourg: Claus Vögele has long-standing experience in the psychophysiological investigation of the effects of mental stress, and the clinical psychological assessment of individuals at risk for developing mental disorders and/or chronic physical conditions. He has been involved in experimental work and field studies to examine psychological risk factors, emotion regulation and stress responses concerning all three of the three major public health problems (CAMI) addressed in the current proposal. In cardiovascular disease we have evidence of constitutional risk in combination with psychological risk factors for essential hypertension (e.g. emotional coping and anger expression) to impact cardiovascular stress responses to mental challenge in the offspring of essential hypertensives [136-140]. In the area of URTI we have published a quasi-experimental study investigating psychological resilience factors (e.g. optimism, perceived self-efficacy) and their impact upon susceptibility to URTI under stress and no-stress conditions in college students [8]. In the area of mental health we have investigated the role of rumination as cognitive risk factor for mental disorders, e.g. depression and anxiety [141, 142], and have published original articles [143], reviews [144] and a monograph on mental health assessment in individuals with chronic physical conditions.

9.2. Relevant publications from the laboratory

1. S. Vernocchi, N. Battello, S. Schmitz, J.D. Turner, C.P. Muller Membrane glucocorticoid receptor activation induces proteomic changes aligning with classical GC effects. Molecular and Cellular Proteomics.
2. S.T. Trifonova, M. Gantenbein, J.D. Turner, C.P. Muller The use of saliva for assessment of cortisol pulsatile secretion by deconvolution analysis. PsychoNeuroEndocrinology (In Press)

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

3. S.R. Witzmann* (née Alt), J.D. Turner*, S.B. Meriaux, O.C. Meijer, C.P. Muller Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor promoter 17 in adult rats. Epigenetics 7(11):1290-1301 (2012)
4. T.M. Kranz, S. Ekawardhani, M.K. Lin, S.R. Witzmann (née Alt), F. Streit, U. Schuelter, H. Bauer, D. Henseler, J.D. Turner, C.P. Muller, A.Reif, A.B. Schote, J. Meyer. The chromosome 15q14 locus for bipolar disorder and schizophrenia: Is C15orf53 a major candidate gene? Journal of Psychiatric Research 46(11):1414-1420 (2012)
5. A.M. Billing, D. Revets, C. Hoffmann, J.D. Turner, S. Vernocchi, C.P. Muller. Proteomic Profiling of Rapid Non-genomic and Concomitant Genomic Effects of Acute Restraint Stress on Rat Thymocytes Journal of Proteomics 75(7):2064-79 (2012)
6. D. Henseler, J.D. Turner, M. Eckhardt, M. van der Mark, Y. Revsin, M.K. Lin, T. Kranz, Claude P. Muller, J. Meyer. Unusual 5'-regulatory structure and regulation of the murine Mlc1 gene: Lack of promoter-specific functional elements J. Nucleic Acid Invest. (2011) 2:e11
7. M.D.Klok, S.R. Alt, Alicia J.M. Irurzun Lafitte, J.D. Turner, E.A.J.F Lakke, I. Huitinga, C.P.Muller, F.G. Zitman, E.R. de Kloet, R.H. de Rijk. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA and its splice variants in postmortem brain regions of patients with major depressive disorder. J. Psych. Res. 45(7):871-8 (2011)
8. L. Cao-Lei, S.C. Leija, R. Kumsta, S. Wüst, J. Meyer, J.D. Turner, C.P. Muller. Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: Identification and analysis of alternative promoter regions. Human Genetics 129(5):533-43 (2011)
9. Alt SR, Turner JD, Klok MD, Lakke EAJF, Meijer OC, et al. (2010) Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed. Psychoneuroendocrinology 35:544-56 (2010).
10. Turner JD, Pelascini LP, Macedo JA, Muller CP (2008) Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms. Nucleic Acids Res 36: 7207-7218.
11. Macedo JA, Hesse J, Turner JD, Meyer J, Hellhammer DH, et al. (2008) Glucocorticoid sensitivity in fibromyalgia patients: Decreased expression of corticosteroid receptors and glucocorticoid-induced leucine zipper. Psychoneuroendocrinology 33: 799-809.
12. Turner JD, Schote AB, Keipes M, Muller CP (2007) A new transcript splice variant of the human glucocorticoid receptor: identification and tissue distribution of hGRDelta313-338, an alternative exon 2 transactivation domain isoform. Ann N Y Acad Sci 1095: 334-341.
13. Schote AB, Turner JD, Schiltz J, Muller CP (2007) Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. Mol Immunol 44: 1436-1445.
14. Macedo JA, Hesse J, Turner JD, Ammerlaan W, Gierens A, et al. (2007) Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased L-selectin on monocytes and neutrophils. J Neuroimmunol 155: 159-166.
15. Grova N, Valley A, Turner JD, Morel A, Muller CP, et al. (2007) Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene. Neurotoxicology.
16. Billing AM, Fack F, Renaut J, Olinger CM, Schote AB, et al. (2007) Proteomic analysis of the cortisol-mediated stress response in THP-1 monocytes using DIGE technology. J Mass Spectrom 42: 1433-1444.
17. Turner JD, Schote AB, Macedo JA, Pelascini LP, Muller CP (2006) Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? Biochem Pharmacol 72: 1529-1537.
18. Turner JD, Muller CP (2005) Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. J Mol Endocrinol 35: 283-292.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

10. Description of the laboratory

The Department of Immunology is a department of the Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) and the Laboratoire National de Santé (LNS). The Department was de facto created in 1992. Since then it has gradually expanded its scientific activities with the support of competitive research grants from national (CRP-Santé, Ministère de la Recherche, Ministère de la Santé, Ministère de la Coopération, Fonds National de la Recherche, Foundations) and international sources (the European Union DGXII and DGXIII, the World Health Organization, the Deutsche Forschungsgesellschaft DFG, diagnostic and vaccine industry).

The Department has a staff of about 35 scientists, engineers, technicians, PhD and MD students, as well as undergraduate students and support staff. The Department is one of the most productive biomedical research groups in Luxembourg, with about 15-20 peer-reviewed international scientific publications per year (28 only in 2011) and 60-80 contributions to scientific conferences and invited oral presentations per year. The group has published a total of >220 publications, with about 165 in the field of virology including high impact factor journals such as The Lancet, Nature, Emerging Infectious Diseases, The Journal of Infectious Diseases and others. The group has published about 50 publications in the field of vaccinology, and 23 in the field of stress research. 35 PhD and 20 MD students have been or are trained at the Department of Immunology. 67% of Department trained PhD students have continued a scientific career in academia or research institutes (including Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, DE; the Imperial College, London, UK; St. Jude Children's Research Hospital, Memphis/Tennessee, USA; CDC, Atlanta, USA; Queens University Belfast, IR; Weill Cornell Medical College in Qatar; McGill University, CA and many others) and 30% in industry. The Department has a unique network of international collaborations in Europe and beyond.

Our Department is well funded and fully equipped with top-of-the line instrumentation and provides a stimulating environment for Ph.D. students to develop their own scientific project. State-of-the-art equipment and a large range of modern life science / biotechnology techniques are available in the Department.

The following techniques have been established and are available and/or currently in use:

• **Molecular and cell biology:** DNA sequencing including Next Generation Sequencing (IonTorrent PGM), pyrosequencing, Sanger sequencing; classical end point PCR and real-time PCR for quantification of mRNA; Chromatin Immunoprecipitation, ChIP and MeDIP; reporter gene assays including promoter activity, RNA stability and translation efficiency assays; bacteria cultures; cloning and site-directed mutagenesis; eukaryotic and prokaryotic expression systems; monoclonal antibody sequencing; recombinant protein production, purification and crystallization; EMSA; random phage peptide libraries; 5' and 3' RACE; His-tag or other affinity chromatographies; thermofluor assay; polyadenylation assay; rabbit reticulocyte lysate translation assay; pull-down assay.

• **Proteomics:** A state-of-the-art proteomics workstation for comprehensive expression profiling of proteins by 2-D DIGE electrophoresis (Typhoon 9400 2-D high resolution fluorescence scanner) followed by protein identification by peptide mass fingerprinting and sequencing with a matrix assisted time of flight mass spectrometer with post-source decay analysis (MALDI-TOF-TOF PSD/LIFT) and LCMS Ion Trap; preparation of cells and tissues for analysis by secondary ion mass spectrometry

• **Immunology:** T cell and B cell hybridomas; T cell lines; monoclonal and polyclonal antibody production; various formats of immunoassays (ELISA plate readers for absorption, fluorescence,

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

chemiluminescence); flow cytometry including cell sorting and automated cell cloning; phenotyping of clinical samples; pepscan, breeding of specific pathogen-free animals, *in vivo* and *in vitro* immunogenicity studies, cytokine profiling by real-time PCR and 6-color flow cytometry.

• **Virology:** virus isolation, production and purification, serological tests and seroprevalence studies, next generation sequencer (ion torrent) for sequencing and genotyping of viruses, phylogenetic analyses, molecular epidemiology, epidemic surveillance, diagnostic PCR.

• **Biosafety level II animal facility (specific pathogen free) for mice**

• **Biosafety level III laboratory:** WHO, FAO and OIE require increasingly high levels of biosecurity for new emerging and re-emerging human and veterinary viruses. A state-of-the-art Biosafety Level 3 (BSL III) has gone into operation end of 2007;

• **Chemistry:** peptide synthesis and purification, HPLC analysis; chemical derivatization of haptens, conjugation chemistry, analysis of PAH carcinogens and their metabolites by HPLC and fluorescence detection.

11. Bibliography

1. Felitti, V.J., et al., *Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study.* Am J Prev Med, 1998. **14**(4): p. 245-58.
2. Chapman, D.P., et al., *Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood.* J Affect Disord, 2004. **82**(2): p. 217-25.
3. McCauley, J., et al., *Clinical characteristics of women with a history of childhood abuse: unhealed wounds.* Jama, 1997. **277**(17): p. 1362-8.
4. Dong, M., et al., *Insights into causal pathways for ischemic heart disease: adverse childhood experiences study.* Circulation, 2004. **110**(13): p. 1761-6.
5. Batten, S.V., et al., *Childhood maltreatment as a risk factor for adult cardiovascular disease and depression.* J Clin Psychiatry, 2004. **65**(2): p. 249-54.
6. Boyce, W.T., et al., *Psychobiologic reactivity to stress and childhood respiratory illnesses: results of two prospective studies.* Psychosom Med, 1995. **57**(5): p. 411-22.
7. Boyce, W.T. and J.M. Jemerin, *Psychobiological differences in childhood stress response. I. Patterns of illness and susceptibility.* J Dev Behav Pediatr, 1990. **11**(2): p. 86-94.
8. Schulz, H., C. Vögele, and B. Meyer, *Optimism, self-efficacy, and perceived stress as predictors of self-reported health symptoms in college students. Zeitschrift für Gesundheitspsychologie*, 2009. **17**: p. 185-194.
9. Shirtcliff, E.A., C.L. Coe, and S.D. Pollak, *Early childhood stress is associated with elevated antibody levels to herpes simplex virus type 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2963-7.
10. Danese, A., et al., *Childhood maltreatment predicts adult inflammation in a life-course study.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1319-24.
11. Wegman, H.L. and C. Stetler, *A meta-analytic review of the effects of childhood abuse on medical outcomes in adulthood.* Psychosom Med, 2009. **71**(8): p. 805-12.
12. Raikkonen, K., et al., *Risk of severe mental disorders in adults separated temporarily from their parents in childhood: the Helsinki birth cohort study.* J Psychiatr Res, 2011. **45**(3): p. 332-8.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

13. Nieuwenhuijsen, K., D. Bruinvels, and M. Frings-Dresen, *Psychosocial work environment and stress-related disorders, a systematic review*. Occup Med (Lond), 2010. **60**(4): p. 277-86.
14. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
15. Fraga, M.F., et al., *Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(30): p. 10604-9.
16. Szyf, M., *DNA methylation, the early-life social environment and behavioral disorders*. J Neurodev Disord, 2011. **3**(3): p. 238-49.
17. Szyf, M., *The early life social environment and DNA methylation: DNA methylation mediating the long-term impact of social environments early in life*. Epigenetics, 2011. **6**(8): p. 971-8.
18. Meaney, M.J. and M. Szyf, *Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome*. Dialogues Clin Neurosci, 2005. **7**(2): p. 103-23.
19. Sharma, P., et al., *Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients*. DNA Cell Biol, 2008. **27**(7): p. 357-65.
20. Baccarelli, A., et al., *Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study*. Epigenetics, 2010. **5**(3).
21. Heijmans, B.T., et al., *Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17046-9.
22. Movassagh, M., et al., *Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8564.
23. Bogdarina, I., et al., *Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 520-6.
24. Alt, S.R., et al., *Differential expression of glucocorticoid receptor transcripts in major depressive disorder is not epigenetically programmed*. Psychoneuroendocrinology, 2010. **35**: p. 544-556.
25. Lillycrop, K.A., et al., *Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPARalpha promoter of the offspring*. Br J Nutr, 2008: p. 1-5.
26. Lillycrop, K.A., et al., *Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications*. Br J Nutr, 2007. **97**(6): p. 1064-73.
27. Weaver, I.C., et al., *Epigenetic programming by maternal behavior*. Nat Neurosci, 2004. **7**(8): p. 847-54.
28. Reiner, S.L., *Epigenetic control in the immune response*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R41-6.
29. Deng, C., et al., *Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(2): p. 397-407.
30. Zhou, Y. and Q. Lu, *DNA methylation in T cells from idiopathic lupus and drug-induced lupus patients*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(5): p. 376-83.
31. Nile, C.J., et al., *Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(9): p. 2686-93.
32. Sabunciyan, S., et al., *Genome-wide DNA methylation scan in major depressive disorder*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34451.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

33. Mill, J. and A. Petronis, *Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(9): p. 799-814.
34. Milutinovic, S., et al., *Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes*. Carcinogenesis, 2007. **28**(3): p. 560-71.
35. Shimabukuro, M., et al., *Haloperidol treatment induces tissue- and sex-specific changes in DNA methylation: a control study using rats*. Behav Brain Funct, 2006. **2**: p. 37.
36. Kinnally, E.L., et al., *Epigenetic regulation of serotonin transporter expression and behavior in infant rhesus macaques*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(6): p. 575-82.
37. Kinnally, E.L., et al., *DNA methylation as a risk factor in the effects of early life stress*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(8): p. 1548-53.
38. Kinnally, E.L., et al., *Serotonin pathway gene-gene and gene-environment interactions influence behavioral stress response in infant rhesus macaques*. Dev Psychopathol, 2010. **22**(1): p. 35-44.
39. Kinnally, E.L., et al., *Serotonin transporter expression is predicted by early life stress and is associated with disinhibited behavior in infant rhesus macaques*. Genes Brain Behav, 2010. **9**(1): p. 45-52.
40. McGowan, P.O., et al., *Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse*. Nat Neurosci, 2009. **12**(3): p. 342-8.
41. Liu, D., et al., *Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1659-62.
42. Cao-Lei, L., et al., *Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions*. Hum Genet, 2011. **129**(5): p. 533-43.
43. Turner, J.D., et al., *Highly individual methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**: p. 7207-7218.
44. Turner, J.D., et al., *Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1860-8.
45. Jacoby, M., et al., *Interindividual variability and co-regulation of DNA methylation differ among blood cell populations*. Epigenetics, 2012. **7**(12): p. 1421-1434.
46. Liu, D., et al., *Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats*. Nat Neurosci, 2000. **3**(8): p. 799-806.
47. Weaver, I.C., et al., *Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life*. J Neurosci, 2005. **25**(47). p. 11045-54.
48. Weaver, I.C., et al., *The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes*. J Neurosci, 2007. **27**(7): p. 1756-68.
49. Oberlander, T.F., et al., *Hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function in 3-month old infants with prenatal selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressant exposure*. Early Hum Dev, 2008.
50. Oberlander, T.F., et al., *Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses*. Epigenetics, 2008. **3**(2): p. 97-106.
51. de Rooij, S.R., et al., *Associations between DNA methylation of a glucocorticoid receptor promoter and acute stress responses in a large healthy adult population are largely explained by lifestyle and educational differences*. Psychoneuroendocrinology, 2011.
52. Ferketich, A.K., et al., *Depression as an antecedent to heart disease among women and men in the NHANES I study. National Health and Nutrition Examination Survey*. Arch Intern Med, 2000. **160**(9): p. 1261-8.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

53. Glassman, A.H. and P.A. Shapiro, *Depression and the course of coronary artery disease.* Am J Psychiatry, 1998. **155**(1): p. 4-11.
54. Carpenter, L.L., et al., *Effect of childhood physical abuse on cortisol stress response.* Psychopharmacology (Berl), 2011. **214**(1): p. 367-75.
55. Francis, D., et al., *Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat.* Science, 1999. **286**(5442): p. 1155-8.
56. Francis, D.D. and M.J. Meaney, *Maternal care and the development of stress responses.* Curr Opin Neurobiol, 1999. **9**(1): p. 128-34.
57. Meaney, M.J., *Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations.* Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1161-92.
58. McCormick, C.M., et al., *Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats.* Pharmacol Biochem Behav, 2002. **73**(1): p. 77-85.
59. Pesonen, A.K., et al., *Childhood separation experience predicts HPA axis hormonal responses in late adulthood: a natural experiment of World War II.* Psychoneuroendocrinology, 2010. **35**(5): p. 758-67.
60. Chida, Y. and A. Steptoe, *Stress Reactivity and Its Association With Increased Cardiovascular Risk: A Role for the Sympathetic Nervous System?* Hypertension, 2010.
61. Matthews, K.A., et al., *Blood pressure reactivity to psychological stress predicts hypertension in the CARDIA study.* Circulation, 2004. **110**(1): p. 74-8.
62. Jennings, J.R., et al., *Exaggerated blood pressure responses during mental stress are prospectively related to enhanced carotid atherosclerosis in middle-aged Finnish men.* Circulation, 2004. **110**(15): p. 2198-203.
63. Tucker, D.C. and A.K. Johnson, *Influence of neonatal handling on blood pressure, locomotor activity, and preweanling heart rate in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats.* Dev Psychobiol, 1984. **17**(6): p. 587-600.
64. Loria, A.S., et al., *Early life stress downregulates endothelin receptor expression and enhances acute stress-mediated blood pressure responses in adult rats.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **299**(1): p. R185-91.
65. Pariante, C.M. and S.L. Lightman, *The HPA axis in major depression: classical theories and new developments.* Trends Neurosci, 2008. **31**(9): p. 464-8.
66. Falagas, M.E., et al., *Psychosocial factors and susceptibility to or outcome of acute respiratory tract infections.* Int J Tuberc Lung Dis, 2010. **14**(2): p. 141-8.
67. Hewson-Bower, B. and P.D. Drummond, *Psychological treatment for recurrent symptoms of colds and flu in children.* J Psychosom Res, 2001. **51**(1): p. 369-77.
68. Gunnar, M.R., J. Bruce, and H.D. Grotevant, *International adoption of institutionally reared children: research and policy.* Dev Psychopathol, 2000. **12**(4): p. 677-93.
69. Gunnar, M.R., et al., *Moderate versus severe early life stress: associations with stress reactivity and regulation in 10-12-year-old children.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(1): p. 62-75.
70. Gunnar, M.R., M.H. van Dulmen, and T. International Adoption Project, *Behavior problems in postinstitutionalized internationally adopted children.* Dev Psychopathol, 2007. **19**(1): p. 129-48.
71. Smyke, A.T., et al., *The caregiving context in institution-reared and family-reared infants and toddlers in Romania.* J Child Psychol Psychiatry, 2007. **48**(2): p. 210-8.
72. Johnson, J.D., et al., *Prior stressor exposure primes the HPA axis.* Psychoneuroendocrinology, 2002. **27**(3): p. 353-65.
73. Kaler, S.R. and B.J. Freeman, *Analysis of environmental deprivation: cognitive and social development in Romanian orphans.* J Child Psychol Psychiatry, 1994. **35**(4): p. 769-81.

Deleted: V1

Deleted: 12

Deleted: 02

74. Hodges, J. and B. Tizard, *Social and family relationships of ex-institutional adolescents.* J Child Psychol Psychiatry, 1989. 30(1): p. 77-97.
75. Hodges, J. and B. Tizard, *IQ and behavioural adjustment of ex-institutional adolescents.* J Child Psychol Psychiatry, 1989. 30(1): p. 53-75.
76. Rutter, M. and E.J. Sonuga-Barke, *X. Conclusions: overview of findings from the era study, inferences, and research implications.* Monogr Soc Res Child Dev, 2010. **75**(1): p. 212-29.
77. Rutter, M., E.J. Sonuga-Barke, and J. Castle, *I. Investigating the impact of early institutional deprivation on development: background and research strategy of the English and Romanian Adoptees (ERA) study.* Monogr Soc Res Child Dev, 2010. **75**(1): p. 1-20.
78. Kreppner, J., et al., *IV. Developmental course of deprivation-specific psychological patterns: early manifestations, persistence to age 15, and clinical features.* Monogr Soc Res Child Dev, 2010. **75**(1): p. 79-101.
79. Gunnar, M.R., *A commentary on deprivation-specific psychological patterns: effects of institutional deprivation.* Monogr Soc Res Child Dev, 2010. **75**(1): p. 232-47.
80. Kumsta, R., et al., *III. Deprivation-specific psychological patterns.* Monogr Soc Res Child Dev, 2010. **75**(1): p. 48-78.
81. Haensel, A., et al., *The relationship between heart rate variability and inflammatory markers in cardiovascular diseases.* Psychoneuroendocrinology, 2008. 33(10): p. 1305-12.
82. Gunnar, M.R., N.M. Talge, and A. Herrera, *Stressor paradigms in developmental studies: what does and does not work to produce mean increases in salivary cortisol.* Psychoneuroendocrinology, 2009. 34(7): p. 953-67.
83. Naumova, O.Y., et al., *Differential patterns of whole-genome DNA methylation in institutionalized children and children raised by their biological parents.* Dev Psychopathol, 2011: p. 1-13.
84. Schwabe, L., L. Haddad, and H. Schachinger, *HPA axis activation by a socially evaluated cold-pressor test.* Psychoneuroendocrinology, 2008. 33(6): p. 890-5.
85. Schachinger, H., et al., *Cognitive and psychomotor function in hypoglycemia: response error patterns and retest reliability.* Pharmacol Biochem Behav, 2003. **75**(4): p. 915-20.
86. Schwabe, L., et al., *Dehydration does not influence cardiovascular reactivity to behavioural stress in young healthy humans.* Clin Physiol Funct Imaging, 2007. **27**(5): p. 291-7.
87. Philippsen, C., et al., *Cardiovascular reactivity to mental stress is not affected by alpha2 adrenoreceptor activation or inhibition.* Psychopharmacology (Ber.), 2007. **190**(2): p. 181-8.
88. Hines, E.A. and G.E. Brown, *A standard stimulus for measuring vasomotor reactions: its application in the study of hypertension.* Proc. Staff Meet Mayo Clin., 1932. 7: p. 332.
89. Buchanan, T.W., D. Tranel, and R. Adolphs, *Impaired memory retrieval correlates with individual differences in cortisol response but not autonomic response.* Learn Mem, 2006. 13(3): p. 382-7.
90. al'Absi, M., K.L. Petersen, and L.E. Wittmers, *Adrenocortical and hemodynamic predictors of pain perception in men and women.* Pain, 2002. **96**(1-2): p. 197-204.
91. Bertsch, K., et al., *Stability of heart rate variability indices reflecting parasympathetic activity.* Psychophysiology, 2012. 49(5): p. 672-82.
92. Schachinger, H., et al., *Increased high-frequency heart rate variability during insulin-induced hypoglycaemia in healthy humans.* Clin Sci (Lond), 2004. **106**(6): p. 583-8.
93. Buchholz, K., et al., *Reduced vagal activity in salt-sensitive subjects during mental challenge.* Am J Hypertens, 2003. **16**(7): p. 531-6.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

94. Schachinger, H., et al., *Cardiovascular indices of peripheral and central sympathetic activation.* Psychosom Med, 2001. **63**(5): p. 788-96.
95. Glaesmer, H., et al., *[The Childhood Trauma Screener (CTS) - Development and Validation of Cut-Off-Scores for Classificatory Diagnostics.].* Psychiatr Prax, 2013.
96. Chida, Y. and A. Steptoe, *Greater cardiovascular responses to laboratory mental stress are associated with poor subsequent cardiovascular risk status: a meta-analysis of prospective evidence.* Hypertension, 2010. **55**(4): p. 1026-32.
97. Steptoe, A. and C. Vogele, *Methodology of mental stress testing in cardiovascular research.* Circulation, 1991. **83**(4 Suppl): p. II14-24.
98. Flaa, A., et al., *Sympathoadrenal stress reactivity is a predictor of future blood pressure: an 18-year follow-up study.* Hypertension, 2008. **52**(2): p. 336-41.
99. Flaa, A., et al., *Increased sympathetic reactivity may predict insulin resistance: an 18-year follow-up study.* Metabolism, 2008. **57**(10): p. 1422-7.
100. Matthews, K.A., et al., *Blood pressure reactivity to psychological stress and coronary calcification in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study.* Hypertension, 2006. **47**(3): p. 391-5.
101. Menkes, M.S., et al., *Cardiovascular reactivity to the cold pressor test as a predictor of hypertension.* Hypertension, 1989. **14**(5): p. 524-30.
102. Bernstein, D.P., et al., *Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire.* Child Abuse Negl, 2003. **27**(2): p. 169-90.
103. Bartholomew, K. and L.M. Horowitz, *Attachment styles among young adults: a test of a four-category model.* J Pers Soc Psychol, 1991. **61**(2): p. 226-44.
104. Berenson, K.R., et al., *Rejection sensitivity and disruption of attention by social threat cues.* J Res Pers, 2009. **43**(6): p. 1064-1072.
105. Wilhelm, K., et al., *The stability of the Parental Bonding Instrument over a 20-year period.* Psychol Med, 2005. **35**(3): p. 387-93.
106. Alexander, B.B., S.B. Johnson, and R.L. Carter, *A psychometric study of the family adaptability and cohesion evaluation scales.* J Abnorm Child Psychol, 1984. **12**(2): p. 199-207.
107. Lorr, M. and R.A. Wunderlich, *Two objective measures of self-esteem.* J Pers Assess, 1986. **50**(1): p. 18-23.
108. Beck, A.T. and R.A. Steer, *Internal consistencies of the original and revised Beck Depression Inventory.* J Clin Psychol, 1984. **40**(6): p. 1365-7.
109. Ainsworth, B.E., et al., *Comparison of three methods for measuring the time spent in physical activity.* Med Sci Sports Exerc, 2000. **32**(9 Suppl): p. S457-64.
110. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome.* Genome Biol, 2009. **10**(3): p. R25.
111. Down, T.A., et al., *A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis.* Nat Biotechnol, 2008. **26**(7): p. 779-85.
112. Naumann, L., et al., *Potencies of topical glucocorticoids to mediate genomic and nongenomic effects on human peripheral blood mononuclear cells.* Biochem Pharmacol, 2006. **71**(4): p. 530-9.
113. Saied, M.H., et al., *Genome wide analysis of acute myeloid leukemia reveal leukemia specific methylome and subtype specific hypomethylation of repeats.* PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33213.
114. Feber, A., et al., *Comparative methylome analysis of benign and malignant peripheral nerve sheath tumors.* Genome Res, 2011. **21**(4): p. 515-24.
115. Hellhammer, D.H., S. Wust, and B.M. Kudielka, *Salivary cortisol as a biomarker in stress research.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(2): p. 163-71.

CONFIDENTIAL

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

116. Kudielka, B.M., D.H. Hellhammer, and S. Wust, *Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge.* Psychoneuroendocrinology, 2009. 34(1): p. 2-18.
117. Kudielka, B.M. and S. Wust, *Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity.* Stress, 2010. 13(1): p. 1-14.
118. Turner, J.D. and C.P. Muller, *Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1.* J Mol Endocrinol, 2005. 35(2): p. 283-92.
119. Macedo, J.A., et al., *Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased L-selectin on monocytes and neutrophils.* J Neuroimmunol, 2007. 155(1-2): p. 159-166.
120. Macedo, J.A., et al., *Glucocorticoid sensitivity in fibromyalgia patients: Decreased expression of corticosteroid receptors and glucocorticoid-induced leucine zipper.* Psychoneuroendocrinology, 2008. 33(6): p. 799-809.
121. Ruddel, H., et al., *Hemodynamic response patterns to mental stress: diagnostic and therapeutic implications.* Am Heart J, 1988. 116(2 Pt 2): p. 617-27.
122. Schmieder, R., et al., *How to perform mental stress tests.* J Hum Hypertens, 1987. 1(3): p. 223-8.
123. Schwabe, L., et al., *Stress modulates the use of spatial versus stimulus-response learning strategies in humans.* Learn Mem, 2007. 14(1): p. 109-16.
124. Schulz, A., et al., *Cold pressor stress affects cardiac attenuation of startle.* Int J Psychophysiol, 2011. 79(3): p. 385-91.
125. Schwarz, A.M., et al., *Hopelessness is associated with decreased heart rate variability during championship chess games.* Psychosom Med, 2003. 65(4): p. 658-61.
126. Richter, S., et al., *Cardiopulmonary baroreceptors affect reflexive startle eye blink.* Physiol Behav, 2009. 98(5): p. 587-93.
127. Haberthur, C., et al., *Effect of non-hypotensive haemorrhage on plasma catecholamine levels and cardiovascular variability in man.* Clin Physiol Funct Imaging, 2003. 23(3): p. 159-65.
128. Strelzyk, F., et al., *Tune it down to live it up? Rapid, nongenomic effects of cortisol on the human brain.* J Neurosci, 2012. 32(2): p. 616-25.
129. Schachinger, H., et al., *Mental stress increases right heart afterload in severe pulmonary hypertension.* Clin Physiol, 2000. 20(6): p. 483-7.
130. Bohringer, A., et al., *Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress.* Psychoneuroendocrinology, 2008. 33(10): p. 1394-400.
131. Suter, S.E., H.J. Huggenberger, and H. Schachinger, *Cold pressor stress reduces left cradling preference in nulliparous human females.* Stress, 2007. 10(1): p. 45-51.
132. Lass-Hennemann, J., et al., *Stress strengthens memory of first impressions of others' positive personality traits.* PLoS One, 2011. 6(1): p. e16389.
133. Langewitz, W., H. Ruddel, and H. Schachinger, *Reduced parasympathetic cardiac control in patients with hypertension at rest and under mental stress.* Am Heart J, 1994. 127(1): p. 122-8.
134. Schachinger, H., et al., *Increased renovascular response to angiotensin II in persons genetically predisposed to arterial hypertension disappears after chronic angiotensin-converting enzyme inhibition.* J Hypertens, 2004. 22(1): p. 175-80.
135. Schachinger, H., et al., *Angiotensin II decreases the renal MRI blood oxygenation level-dependent signal.* Hypertension, 2006. 47(6): p. 1062-6.

Deleted: V1
Deleted: 12
Deleted: 02

136. Vogele, C. and A. Steptoe, *Emotional coping and tonic blood pressure as determinants of cardiovascular responses to mental stress.* J Hypertens, 1992. **10**(9): p. 1079-87.
137. Vogele, C. and A. Steptoe, *Anger inhibition and family history as modulators of cardiovascular responses to mental stress in adolescent boys.* J Psychosom Res, 1993. **37**(5): p. 503-14.
138. Vogele, C., A. Jarvis, and K. Cheeseman, *Anger suppression, reactivity, and hypertension risk: gender makes a difference.* Ann Behav Med, 1997. **19**(1): p. 61-9.
139. Vogele, C., *Serum lipid concentrations, hostility and cardiovascular reactions to mental stress.* Int J Psychophysiol, 1998. **28**(2): p. 167-79.
140. Vogele, C., et al., *Cardiac autonomic regulation and anger coping in adolescents.* Biol Psychol, 2010. **85**(3): p. 465-71.
141. Sorg, S., et al., *Perseverative thinking in depression and anxiety.* Front Psychol, 2012. **3**: p. 20.
142. Sutterlin, S., et al., *Rumination and age: some things get better.* J Aging Res, 2012. **2012**: p. 267327.
143. Vogele, C. and A. von Leupoldt, *Mental disorders in chronic obstructive pulmonary disease (COPD).* Respir Med, 2008. **102**(5): p. 764-73.
144. Vögele, C., *Psychische Störungen bei HIV-Infektion und Aids: Klinisch-psychologische Diagnostik und Intervention. Psychotherapeut*, 2010. **55**: p. 194-202.

CONFIDENTIAL

Annexe 6

Courrier de réponse favorable du CNER pour l'étude EpiPath

COMITÉ NATIONAL D'ÉTHIQUE DE RECHERCHE

Strassen, le 23 mai 2013

Professeur Claude Muller
et Dr Jonathan Turner
CRP-Santé
Department of Immunology
B.P. 1102
L-1011 Luxembourg

Réf : **1305-171**
Avis N°: **201303/10**

Chers Professeur Muller, Docteur Turner,

Nous vous remercions pour votre courrier du 25 avril 2013 en réponse à l'avis initial du CNER (version 1.0 dd 13 mars 2013).
Nous avons bien pris en compte les changements apportés dans la version révisée de votre protocole (version 2.0 dd 24.04.2013) suite aux remarques émises par le CNER dans ledit avis.
Lors de la réunion du CNER du 15 mai 2013, les réticences éthiques sont restées fortes et d'autres questions et préoccupations ont émergé. L'étude abordant des questions sensibles concernant une population très vulnérable, nous vous invitons à venir rediscuter votre projet, en tant qu'investigateurs principaux, tant avec le CNER qu'avec un certain nombre d'instances et de personnes directement intéressées dont notamment le Ministère de la Famille, le CRP-Santé, le Professeur Claus Vögele et éventuellement aussi les associations concernées, lors d'une réunion qui sera fixée prochainement.

Les points à discuter sont les suivants :

1. le CNER aimerait avoir une explication plus approfondie des buts et de l'importance de l'étude qui puisse justifier cette expérimentation sur une population vulnérable ;
2. le CNER souhaiterait savoir quelle sera l'attitude des investigateurs à l'égard des participants et ce qu'ils leur répondront dans le cas où ceux-ci aimeraient connaître leurs résultats individuels ;
3. le CNER aimerait savoir pourquoi un volume si important de sang est prélevé (200 ml par participant) ;
4. le CNER aimerait avoir des précisions sur ce que couvre l'assurance prévue ;
5. le CNER aimerait avoir plus de précisions sur les critères d'inclusion et modalités de recrutement du groupe contrôle ;
6. le CNER trouverait nécessaire de mieux informer les participants des précautions prévues lors de la prise de sang pour réduire les risques y liés, ainsi que de l'étendue de la partie génétique dans les feuilles d'information qui leur sont destinées (il devrait y être mentionné que seuls les gènes en lien avec la capacité de gérer le stress seraient étudiés) ;

7. le CNER suggère de remplacer le mot « Schwierigkeiten » par « Herausforderungen » à la fin du paragraphe intitulé « Besuch 1 » dans la version allemande de la lettre d'information aux participants, afin que cette traduction corresponde bien au mot « épreuve » de la version française ;
8. le CNER aimerait discuter du fait que la première partie du questionnaire ne puisse être remplie qu'avec l'aide des parents adoptifs, car il semble peu probable qu'une personne ait gardé des souvenirs de ce qu'elle a vécu avant l'âge de 3 ans ;
9. le CNER aimerait discuter de ses craintes par rapport au manque de clarté de l'information qui a été transmise aux associations partenaires du projet (ou de la manière dont elle a été comprise) sur les buts de l'étude et le fait que les participants n'en tireraient aucun bénéfice, étant donnée la nature purement scientifique de l'étude ;
10. le CNER aimerait discuter de ses réserves par rapport à la nécessité d'utiliser le questionnaire BDI, dont certaines questions pourraient avoir un effet anxiogène important sur les participants ;
11. le CNER estime nécessaire d'obtenir un engagement formel de la part de la direction du CRP-Santé pour la conduite de cette étude en son sein, et des Professeurs Claus Vögele (Université du Luxembourg) et Hartmut Schächinger (Université de Trèves) pour leur participation à l'étude.

Notre secrétariat vous contactera dans les meilleurs délais en vue de fixer une date pour la réunion susmentionnée.

Nous vous prions de croire, Professeur Muller, Docteur Turner, à l'expression de nos sincères salutations.

Pour le CNER,

Dr Georges MICHEL
Président

Annexe 7
Avis positif de l'ERP

Prof. Dr. Claus Vögele
Unité de recherche INSIDE
Université du Luxembourg
Route de Diekirch - B.P. 2
L- 7220 Walferdange
Luxembourg

UNIVERSITÉ DU LUXEMBOURG

Luxembourg, 27 March 2013

ERP 13-002

Research project: Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity Acronym: EpiPath

Dear Prof. Dr. Vögele,

The Ethics Review Panel of the University of Luxembourg has received your revision of 17 May 2013 concerning the approval of your project: **Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity Acronym: EpiPath** by the ERP.

Your request and revision included the application form as well as your application for ethics approval by the National Research Ethics Committee (CNER).

After examining all documents, the Ethics Review Panel has decided to approve the project and the related consent form, in the form provided to the Ethics Review Panel.

Kind regards

Prof. Dr. Lucienne Blessing
Chair of the Ethics Review Panel.

Ethic Review Panel of the University of Luxembourg
Campus Limpertsberg
162A, av. de la Faïencerie
L-1511 Luxembourg
erp-submissions@uni.lu

FACULTE DE PHARMACIE **UNIVERSITE DE LORRAINE**

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 27 octobre 2014

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présenté par : Estelle SANDT

Sujet : Relations entre méthylation de l'ADN et facteurs de risque des pathologies liées au stress, pathologies cardio-vasculaires, infectieuses et mentales : une étude épidémiologique

Jury :

Président : Mme THILLY, Maître de Conférences
Co-Directeur : M. TURNER, Chercheur
Mme. NDIAYE, Maître de Conférences

Juge : Mme GILLON, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 9. 10. 2014

Le Président du Jury — Directeur de Thèse

Mme THILLY — Mme NDIAYE

M. TURNER

Vu et approuvé,

Nancy, le 10. 10. 2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,

UNIVERSITE DE LORRAINE — FACULTE DE PHARMACIE

p.o. *Francine PAULUS*

Vu,

Nancy, le 14 OCT. 2014

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation
Le Vice-Président

Université de Lorraine

Martial DELIGNON

Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 6739

N° d'identification :

TITRE

Relations entre méthylation de l'ADN et facteurs de risque des pathologies liées au stress, pathologies cardio-vasculaires, infectieuses et mentales :
une étude épidémiologique

Thèse soutenue le 27 octobre 2014

Par Estelle Sandt

RESUME :

L'expression des gènes est régulée en partie par de nombreux mécanismes endogènes, mais également par des facteurs environnementaux. Les modifications épigénétiques représentent la principale interface entre le génome et l'environnement[1][2][3]. Parmi les différents mécanismes épigénétiques, la méthylation de l'ADN est sans doute la mieux connue. De plus le profil de méthylation de l'ADN est susceptible de subir des modifications induites par des facteurs environnementaux.

Compte tenu de son implication dans la régulation de la transcription et l'inactivation des gènes[4], la méthylation de l'ADN pourrait également jouer un rôle clé dans l'apparition de différentes maladies, incluant les maladies liées au stress.

Le Département d'Immunologie du Centre de Recherche Public de la Santé (CRP-Santé) de Luxembourg a acquis une expérience considérable dans le domaine de l'épigénétique, en particulier concernant les gènes impliqués dans la réponse au stress ainsi que dans la conduite d'études cliniques. Mon stage de Master 2 au sein de ce Département, m'a permis de travailler sur deux études portant sur le niveau de méthylation de l'ADN.

L'étude "Cold Pressor Test" a montré un lien entre la réponse à un stress induite par un test validé- le Cold Pressor Test - et la méthylation du gène du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Durant mon stage, je me suis chargée de l'analyse des données de cette étude.
Ces résultats ainsi que ceux d'études précédentes menées par le groupe PsychoImmunologie du CRP-Santé ont conduit à l'élaboration du protocole de l'étude "Long term epigenetic and physiological effects of early life adversity" (EpiPath). EpiPath analysera l'impact des maltraitances subies durant la petite enfance, ou "Early Life Adversity" (ELA) sur les facteurs de risque de problèmes de santé publiques majeurs: maladies cardiovasculaires, mentales, du système immunitaire et altération de la réponse au stress. Le lien entre des antécédents d'ELA et la survenue de ces pathologies ayant déjà été mis en évidence, l'objectif de cette étude est de fournir une meilleure compréhension de l'impact de l'ELA sur la méthylation de l'ADN et les conséquences cliniques.

MOTS CLES :
épigénétique, réponse au stress, étude clinique exploratoire, analyse de données, dossiers de soumission

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Ndeye Coumba Ndiaye **Jonathan D. Turner**	UMR INSERM- U1122 IGE-PCV Faculté de Pharmacie Nancy LNSI / CRP-Santé de Luxembourg	**Expérimentale** ☐ **Bibliographique** ☐ **Thème** 1

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**
3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**
5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**