

KARINE TREMBLAY

**ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE CERTAINS GÈNES CANDIDATS
ET L'ASTHME DANS UNE COHORTE FAMILIALE
ORIGINAIRE DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN :
Réflexion sur l'analyse d'interaction gène-gène**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
comme exigence partielle du programme de maîtrise en médecine expérimentale
- volet Génétique des populations humaines -
offert à l'Université du Québec à Chicoutimi
en vertu d'un protocole d'entente avec l'Université Laval
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

et

DÉPARTEMENT DES SCIENCES HUMAINES
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
SAGUENAY

DÉCEMBRE 2004



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

RÉSUMÉ

Selon le *Global burden of asthma* (2004), l'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires des plus fréquentes qui affecte environ 300 millions de personnes dans le monde. Cette maladie touche les individus de tous âges et de toutes conditions, bien que de proportion plus élevée chez les enfants. L'asthme est aujourd'hui considéré, dans l'ensemble de la littérature, comme un trait complexe qui apparaît probablement suite à l'influence de facteurs environnementaux chez des individus génétiquement prédisposés. En raison de la grande hétérogénéité phénotypique et génétique observée dans l'asthme, aucun gène de susceptibilité « majeur » à l'asthme n'est reconnu à ce jour. Les objectifs de cette étude sont donc de mettre en évidence des gènes associés à cette affection ainsi que les interactions gène-gène possibles entre eux, en employant l'approche par gènes candidats. La méthodologie repose sur l'emploi d'une population dite à « effet fondateur » (cohorte originaire du Saguenay–Lac-Saint-Jean) dans le génotypage de ces gènes ainsi que d'une démarche statistique originale basée sur la création de *pseudotémoins* à partir des trios familiaux de la cohorte dans l'analyse des interactions (effectuée à l'aide du test de déséquilibre de transmission version haplotype, du *odd ratio* et de l'analyse de régression). Des cinq gènes candidats testés, seulement PPARG a montré une association significative avec l'asthme ($p = 0,016$) et suggestive avec l'atopie ($p = 0,042$). Concernant les analyses d'interaction, les trois approches statistiques ont permis d'identifier des interactions potentielles entre les gènes PPARG et IL13 ou IL4RA et entre les gènes IL4RA et IL4 ou IL1B dans l'asthme, ce qui suggère l'emploi de ce type d'analyse dans la recherche de déterminants génétiques pour l'asthme.

AVANT-PROPOS

J'aimerais profiter de ce court instant pour partager une partie de la réflexion qui a accompagné la rédaction de ce mémoire et qui témoigne de l'évolution professionnelle, et surtout personnelle, dans mon cheminement de vie depuis que j'ai débuté ce projet de maîtrise. D'abord, la rédaction de ce mémoire constitue pour moi le tremplin vers les études doctorales. En effet, je continuerai à travailler sur la génétique de l'asthme, projet auquel je suis énormément attachée et sur lequel je fonde beaucoup d'espoir. D'un autre côté, la rédaction de ce mémoire me fait prendre conscience que toutes ces années n'ont pas été simplement consacrées au travail assidu et à l'acharnement, mais au contraire, elles ont laissée beaucoup de place pour le travail sur soi. En fait, j'en ai appris beaucoup sur moi-même et les gens qui m'entoure ce qui m'a permis d'évoluer et d'acquérir de la maturité, aspect que je considère essentiel et très important dans l'actualisation de toute personne. Bref, la rédaction d'un mémoire est une épreuve ultime. C'est un travail d'endurance, de persévérance, de discipline et de détermination. Mais « le jeu en vaut la chandelle » comme on dit! Et si j'ai pu ressentir cet immense bonheur, cette satisfaction indescriptible de le déposer, c'est bien grâce à vous. Vous qui, du fait de votre présence et à votre manière, avez su changer le cours de mon existence et m'avez permis d'en arriver là où je suis. À vous tous, les mots me manque pour exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude, c'est pourquoi je veux vous rappeler à quel point vous êtes importants pour moi.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche et mentore, *Catherine Laprise*. Mon appréciation à ton égard concerne évidemment ton succès au niveau professionnel, mais aussi et avant tout, la manière dont tu y parviens. En fait, c'est ton talent, ton intégrité, ton ouverture d'esprit et toutes tes qualités humaines qui suscitent tant mon respect et mon admiration et qui font de toi un modèle exemplaire. Du fond du cœur, merci pour tout ce que tu m'as apporté...

Ensuite, je tiens à remercier chaleureusement les participants, sans qui l'existence du projet serait un non sens et pour qui tous ces efforts sont dirigés. Merci également à toute l'équipe du Centre de médecine génique communautaire, particulièrement *Denise Morin*, *Nadia Mior*, *Sébastien Claveau* et *Diane Gagné* pour le soutien technique et pour le recrutement des participants à l'étude. Merci aussi à l'équipe du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, particulièrement *Yannick Renaud* pour le génotypage de certains SNPs et *Mathieu Lemire* pour les analyses statistiques.

Merci aux étudiants: *Anne-Marie Madore*, *Annie Chamberland*, *Josianne Leblanc* et *Tarek Bouhali*. Votre bonne humeur est incontestable. Tous les jours et tous les diners partagés à parler politique, rénovation, impôt, cinéma, actualité, géographie, histoire, etc... sont des moments merveilleux et inoubliables. Je me compte chanceuse de vous avoir connus et je vous souhaite à tous une bonne continuité dans vos projets futurs! Par ailleurs, je tiens à dire un merci spécial à *Nancy Tremblay*, collègue étudiante mais surtout, une grande amie. Ta complicité est à jamais gravé en moi et peu importe ce que l'avenir nous réserve (sûrement de très belles choses!), je serai toujours là pour toi.

Je voudrais également remercier les personnes les plus importantes dans ma vie, ma famille et mes amis. Mes parents *Raymond* et *Céline*, et mes soeurs *Geneviève* et *Marie-Claude*. Votre présence est vitale pour moi et je ne pourrais imaginer ma vie sans vous... Merci pour votre support et vos encouragements, si vous saviez à quel point ils sont appréciés! Je vous aime à l'infini, inconditionnellement.

Finalement, la dernière personne que je veux souligner et non la moindre est mon compagnon de vie *Martin Dallaire*. La richesse de ton être fait de toi l'une de ces personnes qui une fois que l'on s'en approche, on ne peut plus s'en séparer. C'est une loi physique : les planètes gravitent indéniablement autour des étoiles. Tu es de ces étoiles... mon étoile. Ta présence est mon équilibre. Avec tout mon amour, merci pour le bonheur que tu rends si accessible.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
AVANT-PROPOS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : ÉPIDÉMIOLOGIE ET DÉFINITION DE L'ASTHME	5
1.1 Épidémiologie de l'asthme	5
1.1.1 Prévalence	5
1.1.2 Morbidité	6
1.1.3 Mortalité	7
1.2 Définition et physiopathologie de l'asthme	8
1.2.1 Inflammation	9
1.2.2 Remodelage	9
1.2.3 Atopie	10
1.3 Étiologie et facteurs de risque pour l'asthme	11
CHAPITRE 2 : GÉNÉTIQUE DE L'ASTHME	12
2.1 Génétique de l'asthme	12
2.2 Épidémiologie génétique	14
2.2.1 Analyse de liaison	14
2.2.2 Étude d'association	17
2.2.3 Étude d'interaction	20
2.3 Gènes candidats à l'étude	20
2.3.1 Le gène IL4	21
2.3.2 Le gène IL4RA	23

2.3.3	Le gène IL13	24
2.3.4	Le gène IL1B	26
2.3.5	Le gène PPARG	28
2.4	Interactions physiologiques entre les gènes candidats	29
2.4.1	IL4-IL4RA-IL13	30
2.4.2	IL4-IL13-PPARG	30
2.4.3	PPARG-IL1B	32
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODE		35
3.1	Population du Saguenay–Lac-St-Jean	35
3.2	Recrutement des sujets	36
3.3	Évaluation clinique	37
3.4	Évaluation phénotypique et définitions	38
3.5	Évaluation génotypique	39
3.6	Analyses statistiques	42
3.6.1	Qualité des données génotypiques	42
3.6.2	Calcul de puissance	44
3.6.3	Analyse d'association	45
3.6.4	Analyse d'interaction	45
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS		49
4.1	Données cliniques	49
4.2	Données phénotypiques	50
4.3	Données génotypiques	51
4.4	Analyses d'association	52
4.5	Analyses d'interaction	54
CHAPITRE 5 : DISCUSSION		59
5.1	Analyse d'association	59
5.1.1	IL4	60
5.1.2	IL4RA	61
5.1.3	IL13	62
5.1.4	IL1B	63
5.1.5	PPARG	63
5.2	Analyse d'interaction	65
5.2.1	Comparaison entre les trois méthodes d'analyses statistiques	65
5.2.2	Interactions possibles entre les différents gènes candidats	67

5.3 Interprétation générale de l'étude	72
5.4 Perspectives	74
CONCLUSION	77
BIBLIOGRAPHIE	78
ANNEXE A	96
ANNEXE B	103
ANNEXE C	106
ANNEXE D	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant une boucle de régulation inflammatoire présente dans les voies respiratoires de sujets asthmatiques _____	31
Figure 2 : Schéma hypothétique de l'interaction entre l'IL-4 et le PPAR γ et entre l'IL-13 et le PPAR γ _____	32
Figure 3 : Schéma hypothétique de l'interaction entre PPAR γ et l'IL-1 β illustré dans les lymphocytes T _____	33
Figure 4 : Définition des phénotypes relatifs à l'asthme pour les sujets qui composent les 200 trios évalués _____	39
Figure 5 : Résumé des étapes de l'évaluation génotypique _____	40
Figure 6 : Table résumant le calcul du <i>odd ratio</i> _____	47

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Distribution des données cliniques des individus des 200 trios _____	49
Tableau II :	Proportion des différents phénotypes au sein des individus de la cohorte des 200 trios _____	50
Tableau III :	Fréquences génotypiques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg (EHW) pour chacun des gènes à l'étude _____	52
Tableau IV :	Association entre l'allèle muté de chaque SNP testé et l'asthme et l'atopie _____	53
Tableau V :	Association entre PPARG et l'asthme _____	53
Tableau VI :	Interactions entre les allèles de différents gènes analysées par TDT pour l'asthme et l'atopie _____	54
Tableau VII :	Analyse d'interaction entre les différents gènes pour l'asthme en considérant les parents de la cohorte comme des cas-témoins _____	55
Tableau VIII :	Analyse d'interaction entre les différents gènes pour l'atopie en considérant les parents de la cohorte comme des cas-témoins _____	56
Tableau IX :	Analyse de régression linéaire pour tester l'interaction entre deux gènes (A et B) pour l'asthme _____	57
Tableau X :	Analyse de régression linéaire pour tester l'interaction entre deux gènes (A et B) pour l'atopie _____	58
Tableau XI :	Tableau récapitulatif des interactions trouvées selon les approches statistiques employées _____	66
Tableau XII :	Interactions entre les allèles des différents gènes analysées par TDT pour l'asthme et l'atopie _____	109

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP-1 : Protéine d'activation 1

ATS : *American Thoracic Society*

CMGC : Centre de médecine génique communautaire

COX : Cyclooxygénase

CP₂₀ : Concentration de métacholine qui provoque une chute de 20 % du VEMS

ddNTP : didésoxynucléotide triphosphate

ECRHS : *European community respiratory health survey*

EHW : Équilibre de Hardy-Weinberg

FP : Fluorescence par polarisation

GINA : *Global initiative for asthma*

HETE : Acide hydroxyeicosatétraénoïque

HRB : hyperréactivité bronchique

HODE : Acide hydroxyoctadécadiénoïque

IgE : Immunoglobuline E

IL1B : Gène de l'interleukine-1 bêta (IL-1 β)

IL4 : Gène de l'interleukine-4 (IL-4)

IL4RA : Gène du récepteur de l'interleukine-4 alpha (IL-4R α)

IL13 : Gène de l'interleukine-13 (IL-13)

ISAAC : *International study of asthma and allergies in childhood*

JAK : Tyrosine janus kinase

LT : Leukotriènes

LO : Lipooxygénase

MMP : Métalloprotéinases de la matrice cellulaire

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

NFAT : Facteur de transcription nucléaire des cellules T activées

NF- κ B : Facteur de transcription nucléaire kappa B

NO : Oxyde nitrique

NOS : Synthase de l'oxyde nitrique

PCR : *Polymerase chain reaction* (ou amplification polymérisique)

PLA : Phospholipase

PG : Prostaglandines

PPARG : Gène du *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ)

RFLP : Polymorphisme de longueur de fragment de restriction

SLSJ : Saguenay–Lac-St-Jean

SNP : *Single nucleotid polymorphism*

STAT : Signal de transduction et d'activation de la transcription

TDT : Test de déséquilibre de transmission

VEMS : Volume expiratoire maximal en une seconde

INTRODUCTION

Depuis 1998, les Drs Catherine Laprise et Thomas Hudson dirigent un programme de recherche sur la génétique de l'asthme au Saguenay–Lac-St-Jean (SLSJ) dont l'objectif ultime est la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette affection afin d'améliorer son diagnostic et son traitement. La Dre Laprise supervise le présent projet de maîtrise qui se concentre particulièrement sur la recherche de déterminants génétiques et environnementaux dans l'asthme au moyen d'études d'association et d'analyses d'interaction gène-gène.

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires des plus communes qui affecte environ 300 millions de personnes dans le monde (Global burden of asthma, 2004) et qui présente une prévalence, une morbidité et une mortalité en hausse depuis les années 1960 dans tous les pays industrialisés. Le Chapitre 1 présente une définition complète de l'asthme ainsi qu'un état de l'épidémiologie mondiale de cette maladie basé en partie sur des études multicentriques internationales en collaboration avec l'Organisation mondiale de la santé (Beasley et al., 2000).

L'asthme est une affection qui mobilise plusieurs équipes de chercheurs à l'échelle internationale, ce qui a pour effet d'augmenter les connaissances et de mieux comprendre son histoire naturelle. À sa définition de plus en plus spécifique, on superpose maintenant les éléments génétiques et environnementaux à son développement. Ainsi, il est généralement admis par la communauté scientifique que l'asthme est un trait complexe induit par l'interaction d'une multitude de gènes agissant les uns sur les autres et étant modulés par l'environnement. L'identification de ces déterminants génétiques s'effectue par des études d'épidémiologie génétique, comme des analyses de liaison ou des études

d'association qui permettent de trouver des régions chromosomiques liées à l'asthme et des gènes associés à son développement. Parmi ces gènes, certains pourraient avoir un effet protecteur tandis que d'autres contribueraient à la pathogénèse de la maladie (gènes de susceptibilité). La nature complexe des phénotypes de l'asthme, son hétérogénéité génétique et l'effet des facteurs environnementaux font augmenter la difficulté dans la recherche de déterminants génétiques de susceptibilité à cette maladie (Hakonarson et Halapi, 2002). Le Chapitre 2 résume brièvement les études épidémiologiques effectuées par plusieurs équipes de chercheurs à travers le monde dans la génétique de l'asthme et fait état des principales régions chromosomiques liées à l'asthme ainsi que des principaux gènes associés. On y retrouve également les cinq gènes candidats sélectionnés dans cette étude d'association à savoir l'IL4, l'IL4R, l'IL13, l'IL1B et le PPARG et les interactions possibles entre eux.

Mises à part les études de liaison et d'association, une des approches prometteuses dans l'étude des traits complexes est l'étude d'interaction gène-gène et gène-environnement. Comme il est convenu que plusieurs gènes sont impliqués dans le développement de l'asthme, l'effet des uns sur les autres (effet additif) devrait être tenu en compte. Par exemple, dans la cascade inflammatoire qui sous-tend l'asthme, plusieurs molécules agissent et modulent l'effet des uns sur les autres. Les gènes qui codent pour ces protéines sont des candidats intéressants et les interactions entre eux devraient être considérées dans les études génétiques. Cependant, à ce jour, les études qui se concentrent sur les interactions gène-gène et gène-environnement sont relativement rares (quoique de plus en plus à la hausse) bien qu'elles soient nécessaires dans l'avancement des connaissances dans la génétique de l'asthme. En effet, des analyses d'interaction, qui reposent sur des relations hypothétiques entre les gènes, déduites de leur rôle physiologique et/ou de leur association aux phénotypes étudiés, pourraient démontrer l'existence et le rôle réel de ces interactions dans le développement d'un trait complexe comme l'asthme. Ce défi est de taille et constitue le point central de ce mémoire de maîtrise. Le Chapitre 2 se

termine avec la description des interactions proposées entre les cinq gènes candidats à l'étude, ces interactions reposant sur le rôle biologique de chacun des gènes.

En dépit de l'effort intensif de la biologie et de la génétique moléculaires, le progrès dans l'étude des traits complexes est considérablement lent (Keavney, 2000), car aucun gène impliqué dans l'atopie ou dans l'asthme n'a encore été identifié avec certitude (Hakonarson et Halapi, 2002; GINA, 2003). Des gènes dits de « susceptibilité » ont été associés, certes, mais il n'existe présentement aucun consensus quant à la reconnaissance de gènes spécifiques à l'asthme. Plusieurs raisons expliqueraient cette lacune. D'abord, l'asthme étant reconnu comme un trait complexe, il est plus difficile d'établir un phénotype précis et reproductible d'un bout à l'autre de la planète. Ceci rend difficile le recoupage des données entre les populations ou même avec les études antérieures. En effet, les données actuelles peuvent différer de celles des années antérieures où aucun consensus (ou standard) n'existait dans la définition ou le diagnostic de l'asthme. Le manque de puissance statistique des cohortes utilisées dans de nombreuses études pourrait également être une raison de cette inefficacité à identifier des gènes associés à l'asthme.

Plusieurs raisons peuvent donc expliquer que la génétique de l'asthme reste encore aujourd'hui complexe et qu'il demeure plusieurs éléments qui doivent être précisés ou étudiés. La méthodologie employée dans ces études est donc extrêmement importante et doit reposer sur des stratégies de recherche allant du choix de la population à l'emploi d'analyses statistiques variées incluant les analyses d'interaction. Le Chapitre 3 présente la méthodologie utilisée dans la présente recherche de déterminants génétiques d'un trait complexe.

Cette étude d'association utilise l'approche par gènes candidats et se base sur l'hypothèse que les interactions entre ces gènes sont probablement responsables de la susceptibilité à l'asthme. Plus spécifiquement, les principaux objectifs de cette étude sont de :

1. Évaluer l'association entre l'asthme et la présence de variants au sein des gènes candidats sélectionnés;
2. Évaluer les interactions possibles entre ces déterminants génétiques (interactions gène-gène) au moyen de trois nouveaux modèles statistiques.

Ces éléments sont une grande source de motivation non seulement pour ce projet de maîtrise, mais aussi, pour l'avancement de la génétique de l'asthme et des méthodes d'analyse pour d'autres maladies multifactorielles. Les résultats présentés dans le Chapitre 4 ainsi que la discussion qui les accompagne (Chapitre 5) révèlent que l'utilisation des analyses d'interaction dans la recherche de déterminants génétiques de l'asthme est une voie intéressante à suivre et qu'elle pourrait constituer un élément-clé dans l'explication des mécanismes physiologiques qui sous-tendent l'asthme. Ce mémoire s'avère donc un début de réflexion, l'exploration d'une nouvelle méthode statistique dans la recherche des déterminants génétiques impliqués dans ce trait complexe.

CHAPITRE 1

ÉPIDÉMIOLOGIE ET DÉFINITION DE L'ASTHME

1.1 Épidémiologie de l'asthme

L'asthme est une maladie chronique des plus communes et affecte environ 300 millions de personnes dans le monde (Global burden of asthma, 2004). Avec une telle prévalence, plusieurs études comparatives nationales et internationales ont été amorcées afin de comprendre son étiologie (Beasley, 2002). Cette maladie touche les individus de tous âges et de tous les pays du monde, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement (Asher et al., 1995). Les données de l'étude internationale de l'asthme et de l'allergie chez les enfants (ISAAC pour *International study of asthma and allergies in childhood*) et du sondage chez l'adulte de la communauté européenne pour la santé respiratoire (ECRHS pour *European community respiratory health survey*), en collaboration avec l'Organisation mondiale de la santé, constituent à ce jour, la référence mondiale en matière de comparaison de la **prévalence**, de la **morbidité** et de la **mortalité** de l'asthme dans les populations des différents pays (Asher et al., 1995; Janson et al., 2001).

1.1.1 *Prévalence*

La prévalence, ou le pourcentage de la population présentant cette maladie chronique des voies respiratoires, est partout à la hausse, particulièrement chez les enfants (ISAAC, 1998). Au Canada, la prévalence de l'asthme chez les enfants est de 7 à 10 %

(Association pulmonaire du Canada, 2004) et d'environ 25 % chez l'adulte (Global burden of asthma, 2004). L'initiative globale pour l'asthme (GINA pour *Global initiative for asthma*) fait état du fardeau que représente l'asthme dans les pays impliqués. Dans ce rapport, la prévalence de l'asthme est comparée pour plus d'une vingtaine de régions mondiales différentes à partir des données publiées par l'OMS et les projets multicentriques ISAAC et ECHRS (Janson et al., 2001). Ainsi, il est noté que la prévalence de l'asthme varie selon les pays de 0 à 35 % dans l'enfance et de 0 à 30 % chez l'adulte (Global burden of asthma, 2004). La prévalence de l'asthme dans les différentes populations varie énormément, avec une plus grande valeur trouvée dans les pays industrialisés (Beasley et al., 2000). Dans les pays en voie de développement, l'asthme n'est pas rare et semble lié au phénomène d'urbanisation de ces populations (ISAAC, 1998). Les données sont insuffisantes pour déterminer si les différences entre ces populations sont des conséquences en réponse à l'environnement, à l'industrialisation, à l'urbanisation, à la pollution, aux différents styles de vie, à différents allergènes, à de meilleurs diagnostics ou même aux affections parasitaires. Des études épidémiologiques sont nécessaires afin de déterminer la ou les causes exactes de cette augmentation de la prévalence de l'asthme dans pratiquement tous les pays du monde (ISAAC, 1998; GINA, 2003).

1.1.2 *Morbidité*

La morbidité réfère à l'impact socio-économique et le degré auquel la maladie nuit à la qualité de vie des malades (GINA, 2003). Les données disponibles suggèrent que la morbidité de l'asthme est aussi en augmentation si l'on considère le taux d'hospitalisation pour l'asthme chez les enfants (Mitchell, 1985) et les différents symptômes indicateurs de la sévérité de l'asthme (Beasley, 2002). Cette augmentation de la morbidité de l'asthme apparaît comme étant consécutive à de mauvais diagnostics (qui pourraient être dus à un laps de temps trop long pour une consultation médicale), à des traitements inadaptés aux patients avec une surutilisation des bronchodilatateurs ou une absence (ou insuffisance) de thérapie anti-inflammatoire, à un manque d'éducation des asthmatiques ou à la pauvreté

(GINA, 2003). Ce sont les cas les plus sévères qui sont principalement responsables de l'impact socio-économique de l'asthme, qui se mesure en coûts directs et indirects. Les coûts directs incluent les soins médicaux, les médicaments et les séjours à l'hôpital, ce qui représente des milliards de dollars par année que les familles et les sociétés doivent assumer (Smith et al., 1997; GINA, 2003). Quant aux coûts indirects, ils incluent l'absentéisme scolaire et professionnel (perte de productivité) et sont liés au degré d'invalidité que cause la maladie (comme la diminution de la qualité de vie ou une participation réduite à la vie familiale) (GINA, 2003). En 2001, l'asthme se classait au 25^e rang mondial des maladies causant une invalidité, derrière les conditions périnatales, les infections respiratoires, le sida, les troubles bipolaires, l'alcoolisme, la tuberculose, la schizophrénie, le diabète, etc. (Global burden of asthma, 2004).

1.1.3 *Mortalité*

L'asthme, dans les cas les plus sévères, peut être fatal pour l'individu. Les données internationales sur la mortalité associée à l'asthme sont limitées en raison du peu de pays participants et sont rarement disponibles pour différentes populations à l'intérieur d'un même pays (GINA, 2003). Les observations montrent toutefois une hausse qui tend à se stabiliser dans les pays industrialisés. Depuis 1960, les études montrent que le taux de mortalité lié à l'asthme aux États-Unis et au Canada est plus bas que dans d'autres pays (Beasley, 2002; GINA, 2003). Au Canada, par exemple, l'asthme entraîne chaque année le décès d'environ 20 enfants et 500 adultes, car la prévention, l'évaluation et le traitement sont plus adéquats et diminuent la plupart des décès liés à cette maladie (Association pulmonaire du Canada, 2004). Bien que la prévalence de l'asthme ait augmenté depuis les années 60 d'au moins 50 % par décennie quelque soit le pays, il est à noter que la mortalité et la morbidité, malgré la hausse importante qu'elles ont connue, tendent à diminuer dans les pays où l'on applique des recommandations thérapeutiques établies à partir de consensus d'experts (GINA, 2003). Au Canada, par exemple, le diagnostic et le traitement de l'asthme sont standardisés selon les recommandations du consensus canadien sur

l'asthme de 1999 (Boulet et al., 1999). Parallèlement, dans les pays où aucun consensus n'est appliqué, la morbidité et la mortalité de l'asthme sont toujours en croissance (GINA, 2003).

La mise en place d'études épidémiologiques internationales comme l'ISAAC ou l'ECRHS a permis de rendre compte de la gravité de l'asthme (Beasley et al., 2000). Ces études ont également permis la mobilisation de nombreux chercheurs afin d'augmenter les connaissances sur les mécanismes biologiques qui sous-tendent cette maladie et de mieux définir son histoire naturelle.

1.2 Définition et physiopathologie de l'asthme

Dans les années 1860, l'asthme était considéré comme une maladie respiratoire et son diagnostic était basé uniquement sur l'obstruction bronchique que l'on considérait réversible (Davies et al., 2003). Cent ans plus tard, vers la fin des années 1970, on ajoute la notion d'hyperréactivité bronchique (HRB) dans sa caractérisation (Hargreave et al., 1982). Par la suite, grâce à l'avènement de la bronchoscopie à fibre optique, les études fonctionnelles de la physiopathologie de l'asthme se sont perfectionnées, ce qui a permis une meilleure compréhension des mécanismes biologiques qui sous-tendent la maladie (Djukanovic, 1996). Ainsi, aujourd'hui, on définit l'asthme comme une affection pulmonaire chronique caractérisée par une **inflammation** et un **remodelage** de la muqueuse et de la sous-muqueuse bronchiques. On considère que ces mécanismes jouent un rôle important dans l'apparition et la chronicité des caractéristiques physiologiques comme l'hyperréactivité et l'obstruction bronchiques en réponse à divers stimuli et sont influencés par l'**atopie**, reconnue comme l'un des plus importants facteurs de risque (ou de prédisposition) au développement de l'asthme (GINA, 2003). Ces conditions mènent ultimement aux manifestations cliniques (symptômes) de la maladie, les plus fréquentes étant l'essoufflement, l'oppression thoracique, la toux, les sécrétions bronchiques et les sifflements (GINA, 2003).

1.2.1 *Inflammation*

L'inflammation bronchique met en jeu l'ensemble des cellules structurales et immunitaires de l'arbre bronchique en particulier les cellules épithéliales, les fibroblastes, les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes (Bousquet et al., 2000). Les cellules immunitaires sont recrutées de la circulation sanguine vers le foyer d'inflammation par des cytokines, des chimiokines et des molécules d'adhérence secrétées par le tissu touché. Ces médiateurs activent les cellules inflammatoires et diminuent leur apoptose, ce qui fait qu'elles persistent au foyer d'inflammation et libèrent de nombreux médiateurs (leucotriènes, histamine, facteurs nécrosant des tumeurs) et des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines (IL) -4 et -13 par exemple (Bousquet et al., 2000). Le développement et la progression de l'inflammation des voies respiratoires dans l'asthme entraînent le développement de l'HRB et aggravent l'obstruction bronchique, éléments impliqués dans l'apparition des symptômes, dans la sévérité clinique et les exacerbations ainsi que dans sa résistance au traitement (Busse et al., 1999). Lorsque la réponse inflammatoire devient chronique et que la fonction respiratoire diminue malgré un traitement anti-inflammatoire approprié, le remodelage s'installe. Ces changements, qui ont des conséquences potentiellement néfastes sur la fonction respiratoire, peuvent devenir irréversibles (Busse et al., 1999).

1.2.2 *Remodelage*

Le remodelage des voies aériennes touche tous les sujets asthmatiques et est variable d'un sujet à un autre (Bousquet et al., 1999). Ces altérations sont responsables d'un déclin progressif de la fonction respiratoire et chez certains, de l'apparition de l'obstruction bronchique chronique, parfois en partie irréversible, résistant aux thérapies conventionnelles, telles les corticostéroïdes (Benayoun et Pretolani, 2003). Sur le plan histopathologique, le remodelage bronchique se caractérise par une desquamation de l'épithélium, une hypertrophie et une hyperplasie du muscle lisse, une hypertrophie des

cellules glandulaires associée à une hypersécrétion de mucus, et à une fragmentation des fibres d'élastine du tissu conjonctif (Davies et al., 2003). Un épaissement apparent de la membrane basale est causé par une fibrose sous-épithéliale (caractérisée par un dépôt de collagène associé à une augmentation de myofibroblastes) et est également un des éléments importants dans le remodelage des voies respiratoires (Bousquet et al., 1999; Benayoun et Pretolani, 2003; Davies et al., 2003).

1.2.3 *Atopie*

L'atopie, définie comme une production anormalement élevée d'immunoglobuline (Ig) E en réponse aux allergènes, joue un rôle très important dans le développement de l'asthme. Une grande majorité des individus asthmatiques sont sensibilisés à un ou plusieurs allergènes (Holt et al., 1999). Par contre, seulement 10 % des personnes allergiques développent de l'asthme (Holgate et al., 2000). La majorité des données documentées relatives à la pathogénèse de l'asthme se sont concentrées sur l'asthme allergique puisqu'il est reconnu que l'exposition à des allergènes communs peut provoquer chez les sujets sensibilisés l'apparition d'un asthme bronchique symptomatique. La réaction allergique est considérée comme une manifestation exagérée ou inappropriée d'un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions extérieures (Dubé et Boulet, 1996). Les lymphocytes T (de type Th2) sont favorisés dans la réponse locale des formes allergique et non-allergique de l'asthme. Une fois activés, ces lymphocytes relâchent leurs cytokines qui induisent la production d'IgE par les lymphocytes B, le recrutement des mastocytes, des éosinophiles et des basophiles ainsi que l'activation et le relâchement d'une grande variété de médiateurs inflammatoires (Holgate et al., 2000). Le schéma traditionnel de la pathogénèse de l'asthme est donc basé sur une augmentation relative de la réponse Th2 combinée à une diminution de la réponse Th1. L'altération conséquente s'observe au niveau des médiateurs présents dans les bronches qui montrent un excès de produits Th2 (citons à titre d'exemple l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13) et une diminution de produits Th1 (l'IFN- γ ou l'IL-12) (Walter et al., 2002).

1.3 Étiologie et facteurs de risque pour l'asthme

L'étiologie ou les causes de l'asthme sont complexes ou multifactorielles. Elles impliquent l'interaction de plusieurs facteurs de risque (Maddox et Schwartz, 2002) comme les **facteurs internes** qui prédisposent les individus ou les protègent du développement de l'asthme et les **facteurs externes** qui influencent la susceptibilité à l'asthme chez les individus prédisposés, précipitent ses exacerbations et/ou causent la persistance des symptômes (GINA, 2003).

Parmi les **facteurs internes**, ou propres aux individus, on retrouve les prédispositions génétiques (pour l'asthme, l'atopie ou l'HRB), le sexe, l'ethnie (GINA, 2003) et même l'environnement utérin de la mère durant la grossesse (Maddox et Schwartz, 2002). Pour ce qui est des **facteurs externes**, ou environnementaux, on reconnaît principalement l'exposition aux allergènes domestiques (poussière, acariens, animaux, moisissures, etc.) et extérieurs (pollens, moisissures, etc.), le tabagisme actif ou passif, la pollution atmosphérique, les infections respiratoires virales, le régime alimentaire, le statut socio-économique, la grandeur de la famille et la consommation de médicaments (Maddox et Schwartz, 2002; GINA, 2003).

CHAPITRE 2

GÉNÉTIQUE DE L'ASTHME : ÉTAT DES RECHERCHES

2.1 Génétique de l'asthme

Plusieurs évidences indiquent que l'asthme est une maladie sous l'influence de facteurs génétiques (Bleecker et al., 1997; Cookson, 1999). Un nombre considérable d'études familiales ont montré une prévalence importante d'asthme et de ses phénotypes au sein des enfants de parents atteints comparativement aux enfants de parents non atteints (GINA, 2003). En fait, le risque qu'un enfant développe de l'asthme est trois fois plus élevé si l'un de ses parents est asthmatique et ce risque double (six fois plus élevé) si les deux parents sont atteints (Illig et Wjst, 2002). Les études de jumeaux et les analyses de ségrégation sont deux approches utilisées pour mesurer la contribution relative des gènes et de l'environnement dans la susceptibilité à l'asthme (Sandford et al., 1996). Plusieurs études de jumeaux ont déjà démontré que le taux de concordance pour l'asthme est significativement plus élevé chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes et que l'héritabilité de l'asthme est d'environ 75 % (Duffy et al., 1990). Comme l'on suppose que les jumeaux partagent le même environnement, ce taux de concordance suggère une forte contribution génétique pour l'asthme (Duffy et al., 1990; Cookson, 1999; Huss et Huss, 2000; GINA, 2003). En ce qui concerne les analyses de ségrégation, elles recherchent le mode de transmission génétique qui explique la ségrégation d'un trait (phénotype) au sein d'une famille (Sandford et al., 1996). Dans l'asthme, les analyses de ségrégation confirment son bagage génétique, mais ne sont pas concluantes quant au mode de transmission de la maladie. Elles permettent toutefois de remarquer une transmission polygénique (Illig et Wjst, 2002).

Ces études familiales montrent que l'asthme ne présente pas un mode de transmission mendélien classique récessif ou dominant normalement attribuée aux maladies à caractère monogénique (c'est-à-dire lorsqu'un seul gène est impliqué) (Sandford et al., 1996). Elles montrent plutôt que l'asthme nécessite l'action de plusieurs gènes influencés ou non par les facteurs environnementaux (Elston, 1995; Sandford et al., 1996). Ainsi l'ensemble de la littérature considère l'asthme comme un **trait complexe** puisque son expression clinique est dictée par l'effet combiné de plusieurs gènes dans des conditions environnementales particulières (Silverman et Palmer, 2000; Cookson, 2002). En général, la complexité vient de l'absence de correspondance entre le phénotype et le génotype soit parce que le génotype résulte en différents phénotypes (par chance, par l'environnement ou par l'interaction avec d'autres gènes), soit différents génotypes résultent en un seul phénotype (Lander et Schork, 1994). Il est souvent impossible de trouver un gène qui montre une parfaite coségrégation avec un trait complexe. Plusieurs raisons expliquent ce problème, comme la pénétrance incomplète du gène (un individu porteur ne développera pas la maladie), les phénocopies (un individu qui n'est pas porteur mais présente la maladie), l'hétérogénéité génétique (plusieurs mutations sur des gènes différents peuvent résulter au même phénotype) ou la transmission polygénique (plusieurs gènes doivent être transmis simultanément pour voir l'apparition de la maladie) (Lander et Schork, 1994; Hoffjan et Ober, 2002).

De manière plus précise, les traits complexes sont causés par l'interaction d'une multitude de gènes les uns avec les autres de même qu'avec les facteurs environnementaux pour créer un gradient de susceptibilité à la maladie (Weeks et Lathrop, 1995). Pour ces raisons, il est difficile de trouver des déterminants génétiques qui sous-tendent la maladie (Hakonarson et al., 2002). L'épidémiologie génétique, avec ses différentes approches, a donc pour rôle de déterminer la contribution relative de chacun de ces facteurs dans l'expression de la maladie.

2.2 Épidémiologie génétique

Les **analyses de liaison**, les **études d'association** et les **analyses d'interaction** permettent d'identifier et de déterminer l'importance des déterminants génétiques d'un trait complexe.

2.2.1 *Analyse de liaison*

L'analyse de liaison (ou analyse de linkage) identifie les régions chromosomiques transmises dans les familles en relation avec un phénotype d'intérêt (comme l'asthme, l'HRB ou l'atopie). L'analyse de liaison a été et est toujours extrêmement utile dans l'identification des gènes responsables des maladies à transmission mendélienne classique (monogénique) comme la fibrose kystique (Rommens et al., 1989). Toutefois, l'application des analyses de liaison aux maladies complexes comme l'asthme n'est pas aussi efficace, car les traits complexes sont influencés par de nombreux paramètres comme l'hétérogénéité génétique, les phénocopies, la pénétrance incomplète, les interactions gène-gène et gène-environnement (Lander et Schork, 1994; Palmer et Cookson, 2000).

À ce jour, plusieurs criblages génomiques (ou *full genome-scan*) pour l'asthme et les phénotypes liés à l'asthme (atopie, taux élevés d'IgE ou HRB) ont été publiés chez l'humain et les modèles animaux. Ces publications rapportent une liaison positive entre l'asthme et plusieurs régions chromosomiques différentes, lesquelles varient en fonction des études et des populations étudiées. De ces régions chromosomiques, quelques-unes ont été répliquées dans plus d'une étude et les plus rapportées se situent dans les chromosomes 5, 6, 11, 12, 13, et 16.

- En ce qui concerne le **chromosome 5**, il est l'une des régions chromosomiques les plus étudiées pour l'asthme et l'atopie et les évidences d'une liaison génétique ont été d'abord publiées en 1994 par deux équipes de chercheurs (Marsh et al., 1994; Meyers et al., 1994). Cette région chromosomique contient

plusieurs gènes qui sont importants dans la régulation des IgE et dans le développement ou la progression de l'inflammation qui a lieu dans l'asthme et l'allergie. Parmi ces gènes, sont retrouvés ceux de plusieurs cytokines inflammatoires (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13), du récepteur β 2-adrénérique (ADRB2), de la synthase du leucotriène C4 (LTC4) (Bleecker et al., 1997), du facteur stimulant des colonies de granulocytes/macrophages (GM-CSF) et du marqueur de cellules CD14 (Cookson et Moffatt, 2000).

- Le **chromosome 6** montre aussi une liaison avec l'asthme et ses phénotypes (Daniels et al., 1996) et contient plusieurs loci impliqués dans la régulation immunitaire, notamment des loci importants dans les maladies allergiques, comme l'antigène des leucocytes humains DRB1 (HLA-DRB1) (Young et al., 1994; Moffatt et al., 2001) et le facteur nécrosant des tumeurs alpha ($TNF\alpha$) (Moffatt et Cookson, 1997).
- Le **chromosome 11q13** a été décrit comme une région génétique liée à l'atopie pour la première fois en 1989 par Cookson et ses collègues (Cookson et al., 1992). Les études d'association qui s'en suivirent montrèrent que le gène du récepteur de haute affinité pour le IgE (FCER1B) est localisé dans cette région et que certains variants étaient associés à l'asthme (Shirakawa et al., 1996). D'autres gènes ont aussi été liés dans cette région comme le CC16 (Laing et al., 2000) et le GSTP1 (Fryer et al., 2000).
- Le **chromosome 12q** a été lié à l'asthme initialement par les travaux de Barnes (1999) et a été confirmé par la suite par de nombreuses études d'association et par d'autres criblages génomiques (Barnes et al., 1999). Plusieurs gènes de l'inflammation y sont localisés comme le NOS1 (Grasemann et al., 2000) ou l'IFNG (Nakao et al., 2001). Actuellement, une méta-analyse est en cours, dirigée par le Dr Lyle Palmer, qui utilise les résultats des criblages génomiques de divers groupes de recherche incluant ceux de la Dre Laprise et collègues sur la cohorte originaire du SLSJ.

- Le **chromosome 13q** a été lié à l'asthme et à l'atopie dans au moins trois criblages génomiques distincts (Daniels et al., 1996; The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA), 1997; Kimura et al., 1999) et il contient plusieurs gènes candidats à l'asthme comme le RANTES, le récepteur de l'endothéline de type B ou le STAT5 (Deloukas et al., 1998).
- Le **chromosome 16** a été lié à l'atopie (Deichmann et al., 1998; Ober et al., 1999). Le gène du récepteur du IL-4 est localisé sur ce chromosome et certains de ses variants ont été associés à l'atopie (Deichmann et al., 1998). La liaison à la région 16p12 est d'un grand intérêt non seulement parce qu'elle renferme le gène IL4RA, mais aussi parce qu'elle contient une série d'autres gènes dont les protéines sont possiblement impliquées dans l'inflammation allergique, comme la phospholipase A2, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, le CD19, le CD43 ou le CD11a (UCSC Genome Browser, 2004).

Ces études montrent que les régions chromosomiques liées à l'asthme ou l'atopie contiennent des gènes de fonctions biologiques importantes dans le développement de la maladie. Bien que cette description des principales régions chromosomiques liées à l'asthme ne soit pas exhaustive, ces analyses de liaison permettent de noter une contribution des gènes impliqués dans la présentation des antigènes, dans l'activation des cellules T et dans d'autres processus immunologiques impliqués dans la pathogénèse de l'asthme (Hakonarson et Halapi, 2002).

En ce qui concerne la population du SLSJ, un criblage génomique a été effectué par Laprise et collègues en 2002 et les régions chromosomiques qui ont été mises en évidence sont 5q, 6p, 9q, 11q, 12q, 13q et 14p (Laprise et al., 2002). Par ailleurs, il est possible d'obtenir une liste complète et détaillée des études de liaison effectuées jusqu'au 31 décembre 2003 pour l'asthme et ses conditions reliées. Cette liste est contenue dans une banque de données informatisée nommée *Asthma and allergy database*, disponible sur le site internet <http://cooke.gsf.de/asthmagen/main.cfm>, et elle présente tous les marqueurs

généétiques utilisés, les phénotypes liés, les valeurs p ainsi que les références des différentes études concernant l'asthme.

2.2.2 *Étude d'association*

Les études d'association génotypes/phénotypes sont des méthodes statistiquement très puissantes pour trouver des déterminants génétiques dans les traits complexes comme l'asthme (Risch et Merikangas, 1996) et sont basées sur deux types d'approche : le clonage positionnel ou les gènes candidats (Palmer et Cookson, 2001). Le clonage positionnel tente d'isoler des loci (ou gènes) de susceptibilité à l'asthme à l'intérieur des régions chromosomiques identifiées par les analyses de liaison (Moffatt et Cookson, 1998). Quant à la seconde approche, elle est basée sur l'étude des variations présentes à l'intérieur de gènes candidats (Hoffjan et Ober, 2002). Les gènes candidats sont sélectionnés pour leur expression dans les tissus (suite à des études fonctionnelles) ou pour leur fonction connue et leur rôle biologique potentiellement important dans la pathophysiologie relative à la maladie (Sandford et al., 1996; Hoffjan et Ober, 2002). Par exemple, des gènes impliqués dans l'inflammation (activation et recrutement des cellules inflammatoires), des gènes qui codent pour des protéines effectrices (incluant celles qui interagissent avec les agents thérapeutiques), des gènes impliqués dans la reconnaissance et la régulation immunitaire, des gènes qui régulent et entretiennent les composantes structurales du tissu pulmonaire (Anderson et Cookson, 1999) ou des facteurs de transcription (Hoffjan et al., 2003) seraient de bons candidats pour l'asthme.

Une fois que le gène est sélectionné le ou les polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs pour *Single Nucleotide Polymorphisms*), qui serviront de marqueur génétique, sont choisis (Gray et al., 2000). Dans la présente étude, ces SNPs sont préférentiellement choisis, à partir de la base de données du Centre national d'information sur les biotechnologies (NCBI, 2004), selon qu'ils se situent dans la région du promoteur (5'UTR pour *untranslated region*), dans la région terminale (3'UTR) ou dans les régions codantes

(exons) du gène (Murthy et al., 1996; Rosenwasser, 1996). Cette sélection est faite sur la base (1) qu'une mutation au niveau du 5'UTR (qui contient des sites d'initiation à la transcription) ou du 3'UTR (qui contient des sites de polyadénylation) d'un gène joue un rôle dans son niveau d'expression (Dreyfuss et al., 1996; Murthy et al., 1996) et (2) qu'une mutation codante dans les exons d'un gène affecte la conformation de la protéine synthétisée, laquelle sera plus ou moins efficace selon la mutation. Un SNP sera également sélectionné s'il a été identifié ou associé à l'asthme ou à ses conditions dans d'autres études.

Les études d'association utilisent les allèles des différents SNPs et vérifient le déséquilibre de transmission qu'ils provoquent dans le développement d'une maladie (Gray et al., 2000). Ainsi, une association statistiquement significative entre un variant d'un gène candidat et le phénotype d'une maladie sera le résultat d'une de ces trois explications : 1) l'allèle a des conséquences fonctionnelles et affecte l'expression du phénotype; 2) l'allèle est en déséquilibre de liaison avec un autre locus lequel affecte l'expression du phénotype et; 3) l'association est un faux-positif qui résulte d'une erreur de type I (erreur de génotypage, de phénotypage ou d'échantillonnage) (Silverman et Palmer, 2000; Hoffjan et al., 2003).

Plus d'une centaine d'études d'association génétique sur l'asthme et ses phénotypes ont été effectuées dans différentes populations. À ce jour, des variants dans 64 gènes ont été rapportés associés avec l'asthme ou ses phénotypes reliés dans au moins une étude. De ces 64 gènes, 33 associations ont été répliquées dans une deuxième étude, neuf n'ont pas été répliquées dans une seconde étude ou dans un deuxième échantillon de la même étude et 22 associations ont été rapportées dans une seule publication (Hoffjan et al., 2003). Hoffjan et collègues ont publié en décembre 2003 la liste complète des gènes qui ont fait l'objet d'une étude d'association et qui ont été associés ou non avec l'asthme ou l'atopie et les conditions reliées dans au moins une étude. La liste complète est disponible sur internet à l'adresse suivante : <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1465-9921-4-14-s1.doc>.

Dans cette liste de gènes associés aux phénotypes de l'asthme, on retrouve les variants à l'intérieur des gènes ainsi que les références des études dans lesquelles ils ont été répertoriés. Parmi ces gènes, huit ont été publiés dans au moins cinq études. Il s'agit de l'interleukine-4 (IL4), de l'interleukine-13 (IL13), du récepteur β 2 adrénergique (ADRB2), de l'antigène des leucocytes humains DRB1 (HLA-DRB1), du facteur nécrosant des tumeurs (TNF), de l'alpha lymphotoxine (LTA), du récepteur à haute affinité des IgE (Fc ϵ RI β) et du récepteur de l'interleukine-4 (IL4RA). Ces loci représentent donc des loci potentiellement importants dans le développement de la maladie (Hoffjan et al., 2003) et les études fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer s'ils sont des gènes de « susceptibilité » ou des gènes « majeurs » dans le développement de l'asthme.

La banque de données des associations génétiques de NCBI archive les études d'association génétiques des traits complexes publiées dans les articles scientifiques. Le but de cette banque de données est d'identifier rapidement les SNPs dans un contexte d'une nomenclature standardisée avec les numéros de référence de chaque gène et des liens directs sur leur description et leurs références (Genetic Association Database, 2004).

Parfois, les associations positives peuvent ne pas être confirmées soit parce que les réplicats ont été effectués dans d'autres populations (ce qui est souvent le cas) soit parce que le modèle de la maladie est trop complexe. En effet, il est plus probable que la susceptibilité d'un variant particulier ait un effet mineur sur le phénotype et que l'amplitude de son effet soit influencée par des gènes situés sur d'autres loci ou par des facteurs environnementaux. En fait, quelques variants confèrent une susceptibilité seulement en combinaison avec d'autres gènes ou dans un environnement particulier (Hoffjan et al., 2003). C'est pourquoi les études visant à identifier les interactions entre facteurs génétiques et environnementaux prennent de plus en plus d'importance et qu'il s'avère de plus en plus pressant de découvrir des modèles mathématiques afin de trouver des explications aux résultats observés depuis maintenant plusieurs années dans les analyses de liaison et d'association (Hoffjan et al., 2003).

2.2.3 *Étude d'interaction*

Les études d'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux dans le développement de l'asthme prennent de plus en plus d'ampleur depuis les dernières années (Wong et al., 2004), mais elles sont confrontées à la puissance statistique des cohortes étudiées (Luan et al., 2001). Il a été répété à plusieurs reprises que l'asthme est la résultante entre l'interaction des facteurs génétiques et environnementaux dans son développement, chaque gène possédant sa propre tendance à être exprimé, certains ayant un effet protecteur, d'autres contribuant au développement de la maladie (Hakonarson et Halapi, 2002). Or, à ce jour, la recherche dans le développement de modèles mathématiques considérant l'effet cumulatif de ces deux facteurs de risque est en exploration. Pour ce qui est du statut et de l'importance grandissante de ces interactions, Barnes conclut, dans ses travaux sur les interactions gène-gène et gène-environnement dans l'analyse génétique moléculaire de l'asthme et de l'atopie, que les interactions des différents gènes sont sans aucun doute un préalable pour l'expression d'une maladie atopique telle l'asthme (Barnes, 1999). En d'autres mots, une mutation dans un seul gène ne peut résulter à l'apparition des phénotypes de l'asthme ou de l'atopie. C'est l'interaction des gènes qui déterminera l'expression de la maladie. En bref, les gènes et l'environnement sont nécessaires mais pris isolément, sont insuffisants pour induire l'expression de la maladie (Barnes, 1999).

Étudier les interactions entre les gènes représente un défi. Il est donc très important de sélectionner des gènes candidats dont le rôle physiologique est connu afin de trouver leur association, mais surtout afin de déterminer quelle est leur relation avec le développement de la maladie.

2.3 **Gènes candidats à l'étude**

Les gènes candidats sélectionnés pour la présente étude sont présentés dans les prochaines pages. Chacune des sous-sections suivantes présentera donc les gènes (IL4,

IL4RA, IL13, IL1B et PPARG), leur expression, leur fonction biologique ainsi que leur association avec l'asthme.

2.3.1 *Le gène IL4*

Le gène IL4 est localisé sur le chromosome 5q31-33, région chromosomique liée aux IgE sériques totaux rapportée dans deux populations différentes (Marsh et al., 1994; Meyers et al., 1994). La région 5q31 a également été associée à l'HRB (Postma et al., 1995; Doull et al., 1996), à l'éosinophilie (Martinez et al., 1998) et à d'autres conditions reliées à l'asthme ou l'atopie (The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA), 1997; Martinez et al., 1998; Palmer et al., 1998). Le gène IL4 code pour l'interleukine-4 (IL-4), une cytokine pro-inflammatoire pléiotrope (qui peut agir de façon indépendante sur plusieurs cibles) impliquée dans de nombreuses activités biologiques (Kabesch et al., 2003). L'IL-4 est un peptide composé de 153 acides aminés produit par les lymphocytes T activés, les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles, cellules qui jouent un rôle crucial dans le développement de l'asthme (Paul, 1991). L'IL-4 est présent en excès dans les voies aériennes des patients asthmatiques en comparaison avec des patients non asthmatiques, la quantité d'ARN_m du gène IL4 étant augmentée dans la sous-muqueuse et les cellules inflammatoires des patients asthmatiques (Humbert et al., 1996).

L'IL-4 contribue au développement de l'inflammation allergique et de l'asthme par une variété de mécanismes. D'abord, il joue un rôle important dans la régulation et la production des IgE, car il cause la commutation (ou changement) des isotypes IgM et IgG en IgE dans les lymphocytes B, ce qui stimule la sensibilisation allergique (Coffman et al., 1986; Zhu et al., 2000). Par ailleurs, l'IL-4 stimule l'expression de chimiokines (comme l'éotaxine), de cytokines inflammatoires et de molécules de surface comme le récepteur IL-4R α , le récepteur de haute affinité aux IgE (Fc ϵ RI β) dans les mastocytes et les basophiles (Pawankar et al., 1997), le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II dans les lymphocytes B ou les récepteurs de faible affinité (Fc ϵ RII ou CD23) dans les

lymphocytes B et les cellules phagocytaires mononucléées (Defrance et al., 1987). Cette habilité de l'IL-4 à promouvoir l'expression de différentes molécules contribue à l'inflammation et au remodelage du tissu pulmonaire dans l'asthme chronique (Doucet et al., 1998; Kabesch et al., 2003). D'autres molécules dont l'expression et la production est induite par IL-4 sont les molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) dans l'endothélium vasculaire. Ces molécules permettent le recrutement et la migration des lymphocytes T, des monocytes, des basophiles et des éosinophiles au site d'inflammation dans la sous-muqueuse et la lumière bronchiques, ce qui confère une fois de plus un rôle important à l'IL-4 dans la pathogénèse de l'asthme (Briscoe et al., 1992; Moser et al., 1992; Spoelstra et al., 1999). Une dernière activité exclusive à l'IL-4 dans le développement de l'inflammation allergique est sa capacité de diriger la différenciation des lymphocytes T (Th0) en lymphocytes Th2, cellules productrices de cytokines pro-inflammatoires telles l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 (Paul, 1991; Steinke et Borish, 2001).

Plusieurs études d'association ont été effectuées entre l'asthme et ses phénotypes et les différents SNPs connus du gène de l'IL-4. Le SNP IL4C-589T (rs2243250 (NCBI, 2004)) est le plus connu et il consiste en la substitution d'une cytosine (C) en une thymine (T) à la position -589 du promoteur. Ce polymorphisme a été associé à l'asthme dans une cohorte cas-témoins composée d'un groupe de sujets asthmatiques (n = 306) et de sujets témoins provenant de la population générale japonaise (n = 215) (Noguchi et al., 1998). D'après ces travaux, l'allèle muté (IL4*-589T) serait responsable d'une augmentation de l'expression du gène IL4 *in vitro* (Noguchi et al., 1998). Différentes études dans d'autres populations caucasiennes (Australie, Canada, Etats-Unis) ont également montré que l'allèle IL4*-589T est associé à la respiration sifflante (Walley et Cookson, 1996), à l'asthme, à l'atopie (Zhu et al., 2000) et à de faibles valeurs de VEMS (volume expiratoire maximal en une seconde) chez des sujets asthmatiques (Burchard et al., 1999). Bref, ces données et plusieurs autres suggèrent que le polymorphisme IL4C-589T influencerait la sévérité de l'asthme (Rosenwasser et al., 1995; Suzuki et al., 2000; Beghe et al., 2003), c'est pourquoi il a été sélectionné pour la présente étude.

2.3.2 *Le gène IL4RA*

Le gène IL4RA est localisé sur le chromosome 16p12 et code pour la chaîne alpha (α) du récepteur de l'IL-4 (ou IL-4R α) (Idzerda et al., 1990; Pritchard et al., 1991). La région chromosomique 16p12 a été liée à l'asthme et l'atopie (Deichmann et al., 1998; Ober et al., 1999). Les récepteurs de l'IL-4 sont présents dans les tissus hématopoïétiques, endothéliaux, épithéliaux, musculaires, dans les fibroblastes, les hépatocytes et dans le cerveau et sont habituellement exprimés entre 100 et 5000 exemplaires par cellules (Nelms et al., 1999). Le récepteur de l'IL-4 est une protéine transmembranaire de 825 acides aminés (avec une masse moléculaire de 140 kDa) formée d'un hétérodimère d'une chaîne alpha (α), de haute affinité et spécifique à l'IL-4, et d'une chaîne gamma (γ), commune aux récepteurs de plusieurs cytokines (Deichmann et al., 1997; Hershey et al., 1997; Shirakawa et al., 2000). La chaîne IL-4R α lie l'IL-4 et la chaîne IL-4R γ forme un autre hétérodimère avec le IL-13R α que l'on nomme récepteur de l'IL-13 (IL-13R) (Shirakawa et al., 2000). Comme pour d'autres récepteurs de cytokines, les parties cytoplasmiques des sous-unités α et γ du récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13 sont associés avec les tyrosines kinases de la famille Janus. La liaison de l'IL-4 avec son récepteur provoque l'activation de ces kinases, lesquelles permettent la phosphorylation des tyrosines du signal de transduction et d'activation STAT-6 (un facteur de transcription cytoplasmique). On appelle cette cascade de signalisation JAK-STAT qui, une fois activée, permet au STAT-6 de migrer jusqu'au noyau des cellules et de s'attacher aux séquences consensus trouvées dans les régions « promoteur » des gènes régulés par l'IL-4 et l'IL-13 (Kelly-Welch et al., 2003).

Le IL-4R α est un élément essentiel dans la pathophysiologie de l'asthme, car il permet à l'IL-4 et à l'IL-13 d'exercer leurs effets biologiques par leur attachement avec leur(s) récepteur(s) respectif(s) dans les différentes cellules cibles. L'activation des voies de signalisation résulte en une voie unique de réponse cellulaire à l'IL-4 (Nelms et al., 1999). Le gène IL4RA est un candidat idéal parce qu'il active la signalisation intra-cellulaire de ses principaux ligands, IL-4 et IL-13 (cytokines importantes dans la pathogénèse de

l'asthme), ce qui lui permet de jouer un rôle-clé dans l'inflammation allergique (Risma et al., 2002).

IL4RA est un gène exceptionnellement polymorphe avec un nombre important de SNPs qui ont été rapportés (Ober et al., 2000; Hackstein et al., 2001). Parmi eux, quelques-uns ont été associés à l'asthme et à l'atopie (Izuhara et Shirakawa, 1999; Shirakawa et al., 2000; Beghe et al., 2003) et huit sont codants et décrits comme résultant en un changement de conformation de la protéine mature (Deichmann et al., 1997; Hershey et al., 1997; Shirakawa et al., 2000). Ces altérations structurales dans la région extracellulaire du IL-4R α résultent en des capacités de signalisation altérées. Par exemple, le polymorphisme Ile50Val, qui résulte de la substitution d'une Isoleucine (Ile) pour une Valine (Val) au 50^e codon, a été isolé chez les individus atopiques et associé à une plus grande activité du signal de transduction provoquant une augmentation de la production d'IgE (Nelms et al., 1999). Le SNP utilisé pour la présente étude est le rs1805013, lequel résulte du changement de base (Cytosine pour Thymine) au 2^e nucléotide du 436^e codon. Cette mutation est codante puisqu'elle consiste en la substitution d'une sérine en une leucine (NCBI, 2004).

2.3.3 *Le gène IL13*

Le gène IL13 est situé dans la portion proximale du chromosome 5q31, région liée à l'asthme et l'atopie dans plusieurs études de liaison (The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA), 1997; Ober et al., 1999). Étant donné que le gène IL13 est situé à seulement 25 kilobases (kb) en amont du gène IL4 dans la même orientation, cela mène à la spéculation que ces deux gènes seraient nés d'une duplication au cours de l'évolution (McKenzie et al., 1993; Wills-Karp, 2000). D'ailleurs, ces deux gènes codent pour des cytokines (IL-13 et IL-4) qui partagent 25 % d'homologie au niveau de leurs acides aminés (Minty et al., 1993). Le gène IL13 code pour la cytokine inflammatoire, interleukine-13 (ou IL-13). L'IL-13 est une protéine de 132 acides aminés (avec une masse moléculaire de 12 kDa) (Nelms et al., 1999) produite par une variété de types

cellulaires incluant les lymphocytes T activés, les lymphocytes B, les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (Wills-Karp et Chiaramonte, 2003). L'importance de l'IL-13 dans l'asthme est supportée par plusieurs études rapportant un niveau élevé d'IL-13 dans les poumons de patients asthmatiques avec ou sans atopie (Huang et al., 1995; Humbert et al., 1997). L'IL-13 est considéré comme un médiateur critique de la phase tardive de la réponse allergique et de l'asthme (Wills-Karp et Chiaramonte, 2003).

Plusieurs évidences supportent l'implication de l'IL-13 dans la pathogénèse de l'allergie et de l'asthme bien que les mécanismes physiologiques qui la sous-tendent soient encore incertains. L'IL-13 possède plusieurs fonctions similaires à celles de l'IL-4, mais possède quand même ses particularités (Wills-Karp et Chiaramonte, 2003). Ce regroupement de fonctions biologiques de l'IL-4 et de l'IL-13 est dû au fait que leur récepteur, respectivement IL-4R et IL13R, partagent la chaîne IL-4R α (Wills-Karp, 2000), ce qui induit l'activation du STAT6 par la voie de signalisation JAK-STAT (Izuhara et Shirakawa, 1999). Donc, tout comme pour l'IL-4, l'IL-13 active cette cascade de signalisation dans les cellules cibles pour exercer ses effets. Ainsi, l'IL-13 joue un rôle dans la commutation et la production d'IgE, dans l'induction de l'expression des chimiokines (éotaxine), des molécules d'adhésion (VCAM-1) ou du CMH de classe II dans le recrutement des cellules immunitaires du tissu pulmonaire asthmatique (Schnyder et al., 1996; Nelms et al., 1999; Zhu et al., 1999). L'IL-13 régule aussi l'infiltration des éosinophiles et l'activation des mastocytes et favorise la fibrose sous-épithéliale (Wills-Karp et Chiaramonte, 2003). Finalement, l'IL-13 favorise l'hypersécrétion de mucus (ce qui contribue à l'obstruction bronchique) (Dabbagh et al., 1999) et module le développement de l'HRB en agissant directement sur les cellules épithéliales des voies respiratoires (Kuperman et al., 2002), activités qu'il ne partage pas avec l'IL-4.

Les associations génétiques de l'IL-13 avec l'asthme à travers diverses populations ethniques supportent la candidature de l'IL-13 comme un locus majeur pour l'asthme et l'atopie sur le chromosome 5q31 (Wills-Karp, 2000). À cet effet, plusieurs groupes ont

rapporté des associations entre des polymorphismes de la région du promoteur (position -1111) et des régions codantes (position +1923, +2044, +2525, +2580 et +2749) du gène IL13 avec les phénotypes de l'asthme (van der Pouw Kraan et al., 1999; Graves et al., 2000; Heinzmann et al., 2000). Le SNP utilisé comme marqueur génétique dans la présente étude est le rs1295685 qui consiste au changement de base d'une cytosine pour une thymine au 2525^e (ou +2525) nucléotide, à partir du cadre d'ouverture de la lecture, dans la région terminale 3'UTR de l'exon 4 du gène (NCBI, 2004).

2.3.4 *Le gène IL1B*

Le gène IL1B est localisé dans le chromosome 2q12-21, région chromosomique qui inclut les autres gènes de la famille du IL1 et leurs récepteurs, soit l'IL1A, l'IL1B et le IL1RN (récepteur antagoniste de l'IL-1 ou IL-1R α) (Nicklin et al., 1994; Bensen et al., 2001) et qui a été liée à l'asthme dans plus d'un criblage génomique (The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA), 1997; Wjst et al., 1999; Hakonarson et Wjst, 2001). Le gène IL1B code pour une cytokine multifonctionnelle, l'interleukine-1 bêta (ou IL-1 β), de 269 acides aminés (avec une masse moléculaire de 16 kDa) produite et sécrétée en majorité par les macrophages (Pociot et al., 1992) bien que plusieurs types cellulaires sécrètent aussi de l'IL-1 β dans les muqueuses (Dinarello, 1996; Chung et Barnes, 1999). Un haut niveau d'IL-1 β a été rapporté dans des biopsies bronchiques d'asthmatiques comparativement aux non-asthmatiques (Mitsuyasu et al., 1999), ce qui suggère que l'IL-1 β serait probablement impliqué dans la pathogénèse de l'asthme bronchique (Hakonarson et Wjst, 2001).

L'IL-1 β est une cytokine hautement inflammatoire et affecte plusieurs types de cellules qui possèdent ses récepteurs (Hogquist et al., 1991). La production et l'activité de l'IL-1 β sont des événements de régulation, d'expression, de synthèse et de sécrétion des gènes (Dinarello, 1996). L'IL-1 β s'attache à deux récepteurs membranaires distincts. Le récepteur de type I (80 kDa) est la forme prédominante dans les lymphocytes T et dans les

cellules du tissu conjonctif. Le récepteur de type II (67 kDa) est situé dans les lymphocytes B, les neutrophiles, les monocytes et les cellules de la moelle osseuse (Dower et al., 1985; Chizzonite et al., 1989). La liaison de l'IL-1 β à ses récepteurs dans ces cellules a pour effet d'initier une cascade d'évènements de signalisation intra-cellulaire (Bensen et al., 2001) menant à l'activation de facteurs de transcription comme le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B) ou la protéine d'activation 1 (AP-1), lesquels stimulent à leur tour la transcription (ou l'augmentation du niveau d'ARN_m) des gènes inflammatoires. Parmi ces gènes, on retrouve ceux qui codent pour des enzymes spécialisées comme la synthase de l'oxyde nitrique (NOS), la cyclooxygénase (COX) ou la phospholipase (PLA). Les produits qui sont sécrétés par l'activation de ces enzymes (oxyde nitrique (NO), prostaglandines (PGs), leukotriènes (LTCs), métalloprotéinases de la matrice cellulaire (MMP) et facteur d'activation des plaquettes) sont des médiateurs pro-inflammatoires importants (Dinarello, 1996) impliqués dans le remodelage tissulaire (Dinarello, 1998).

Le gène de l'IL-1 β est associé à l'asthme ainsi qu'à d'autres maladies inflammatoires ou cardiovasculaires (Bensen et al., 2001). Les polymorphismes identifiés ont été décrits comme ayant un effet sur la quantité de cytokines produites, leur conférant donc un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire (Hurme et al., 1998). Les substitutions nucléotidiques aux position +3953 et -511 du gène IL1B ont une influence sur le niveau d'IL-1 β produit *in vitro* par les cellules mononucléées activées périphériques (Pociot et al., 1992). Le SNP utilisé dans la présente étude comme marqueur génétique du gène IL1B est le rs1143634, lequel résulte du changement de base (cytosine pour thymine) au 3953^e nucléotide (+3953 à partir du cadre d'ouverture de la lecture), situé dans le 105^e codon. Cette mutation, bien que située dans le 5^e exon du gène, est non-codante puisqu'elle consiste en la substitution d'une phénylalanine en une phénylalanine, ce qui n'a pas d'effet sur la conformation de la protéine (NCBI, 2004). Toutefois, ce SNP a été identifié initialement comme une substitution nucléotidique à la position +3953 du gène

IL1B dont l'allèle « normal » influence le niveau d'IL-1 β produit *in vitro* par les cellules sanguines mononuclées (Santtila et al., 1998).

2.3.5 *Le gène PPAR γ*

Le gène *PPARG*, localisé sur le chromosome 3p25 (Greene et al., 1995), code pour le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (ou PPAR γ), membre de la superfamille des récepteurs nucléaires de facteurs de transcription activés par des ligands généralement hormonaux. Il existe trois isoformes de ce récepteur nucléaire. Dans le présent cas, il s'agit de l'isoforme 2 ou PPAR γ 2. Le PPAR γ est un peptide composé de 505 acides aminés et est exprimé de façon prédominante dans le tissu adipeux où il régule les gènes reliés au métabolisme des lipides, à l'homéostasie du glucose ou à la différenciation et à la prolifération des adipocytes (Berger et Moller, 2002). Le PPAR γ est également actif dans d'autres tissus où il régulerait la réponse inflammatoire (Delerive et al., 2001; Clark, 2002), l'infiltration et l'activation des éosinophiles et le système immunitaire dans l'asthme allergique (Mueller et al., 2003; Trifilieff et al., 2003; Woerly et al., 2003). D'autres études ont également identifié le PPAR γ comme un facteur hautement exprimé dans les cellules structurales et la sous-muqueuse pendant l'inflammation et le remodelage dans l'asthme (Benayoun et al., 2001). Le PPAR γ est exprimé dans les macrophages (Huang et al., 1999; Asada et al., 2004), les lymphocytes T activés (Yang et al., 2000; Yang et al., 2002), les cellules épithéliales (Wang et al., 2001) et les cellules du muscle lisse (Patel et al., 2003) dans le tissu pulmonaire humain.

L'action du PPAR γ est essentiellement anti-inflammatoire. Une fois activé, le PPAR γ forme un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) sur les membranes nucléaires afin de réguler négativement la transcription de gènes variés. Le mécanisme par lequel PPAR γ exerce ce rôle anti-inflammatoire est le résultat de l'inhibition de l'expression de différents médiateurs pro-inflammatoires comme le iNOS, la gélatinase B ou le *scavenger receptor* (Ricote et al., 1998) et de différentes cytokines

incluant l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α (Jiang et al., 1998) et l'IL-2 (Yang et al., 2002). Cette inhibition résulte en partie de l'activité antagoniste de PPAR γ sur les facteurs de transcription de ces gènes, c'est-à-dire NF- κ B, STAT6, AP-1 (Ricote et al., 1998) et le facteur de transcription nucléaire des cellules T activées (NFAT) (Yang et al., 2000; Yang et al., 2002).

Le polymorphisme Pro12Ala (rs1801282) résulte de la mutation d'une cytosine (C) pour une guanine (G) au 1^e nucléotide du 12^e codon. Ce SNP est codant puisqu'il résulte en la substitution d'une proline (Pro) pour une alanine (Ala), ce qui cause des altérations significatives au niveau de la conformation de la protéine PPAR γ (Yen et al., 1997). Ce polymorphisme a été associé avec des phénotypes métaboliques comme la diminution de la sensibilité à l'insuline, l'indice de masse corporelle, l'obésité ou le diabète de type 2 (Deeb et al., 1998; Altshuler et al., 2000; Hegele et al., 2000; Doney et al., 2002). En dépit des études fonctionnelles qui ont montré un haut niveau d'expression du PPAR γ dans les voies aériennes d'asthmatiques et son effet anti-inflammatoire, aucune étude d'association n'a été rapportée entre l'asthme ou ses phénotypes et le polymorphisme PPAR γ -Pro12Ala.

2.4 Interactions physiologiques entre les gènes candidats

Plusieurs études d'association entre l'asthme et différents déterminants génétiques ont été faites à ce jour, mais très peu ont considéré les interactions entre les gènes. Malgré l'importance de ces interactions dans l'asthme et l'atopie (Barnes, 1999), l'étude d'Howard et collègues sur les gènes de l'IL-13 et du IL-4R α (Howard et al., 2002) est l'une des seules à avoir publié des résultats d'interaction génétique (elle servira d'ailleurs d'étude « comparative » pour la présente dans la section Discussion). La plupart du temps, les interactions entre les gènes relèvent des études fonctionnelles qui déterminent l'influence d'une molécule sur l'expression d'une autre dans la pathophysiologie relative à l'asthme. C'est pourquoi les interactions ici proposées entre les différents gènes candidats à l'étude reposent sur le rôle de leurs protéines et l'effet qu'elles ont les unes sur les autres, ce qui

laisse poser les hypothèses suivantes (prochaines sous-sections) quant à l'interaction entre leurs gènes.

2.4.1 *IL4-IL4RA-IL13*

Comme il a été vu plus tôt, ces trois gènes codent pour des protéines impliquées dans la physiopathologie de l'asthme, soit l'IL-4, le IL-4R α et l'IL-13. L'IL-4 et l'IL-13 ont des fonctions biologiques similaires et ils partagent le même récepteur (soit le IL-4R α). La Figure 1 montre un schéma résumant les principales fonctions de l'IL-4 dans la cascade inflammatoire (actions partagées par l'IL-13, mais absent du schéma) qui sous-tend le développement de l'asthme. Il est à noter que l'IL-4 et l'IL-13 régulent leur propre expression, créant une boucle de régulation qui jouerait un rôle dans l'exacerbation de la maladie. De plus, étant donné que ces deux cytokines activent le même récepteur membranaire, il est probable qu'il existe une interaction génétique entre leur gène respectif (IL4 et IL13) ainsi qu'avec le gène du récepteur (IL4RA).

2.4.2 *IL4-IL13-PPARG*

Des études ont rapporté que l'IL-4 stimule la régulation du PPAR γ dans les cellules des voies respiratoires comme les macrophages (Huang et al., 1999) et les cellules épithéliales (Wang et al., 2001). Le mécanisme par lequel l'IL-4 agirait est présenté dans le schéma de la Figure 2. Lorsque l'IL-4 se lie à son récepteur, il déclenche la voie de signalisation JAK-STAT, laquelle initie la transcription et la production de la 15-lipoxygénase (15-LO), enzyme responsable de la production de ligands de PPAR γ comme 13-HODE (acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque), 12-HETE ou 15-HETE (acides 12 ou 15-hydroxyeicosatétraénoïque) (Clark, 2002). L'enzyme 15-LO est également responsable de l'hydrolyse des acides gras de la membrane cytoplasmique en acide arachidonique qui, une fois catalysé par une autre enzyme (COX), produit des métabolites des prostaglandines comme le 15d-PGJ2 (15 déoxy-prostaglandine J2), ligand naturel du PPAR γ (Huang et al.,

1999; Vamecq et Latruffe, 1999). Bref, l'IL-4 semble réguler l'expression de PPAR γ ce qui rend intéressante la vérification de l'interaction au sein de cette voie métabolique. Même si

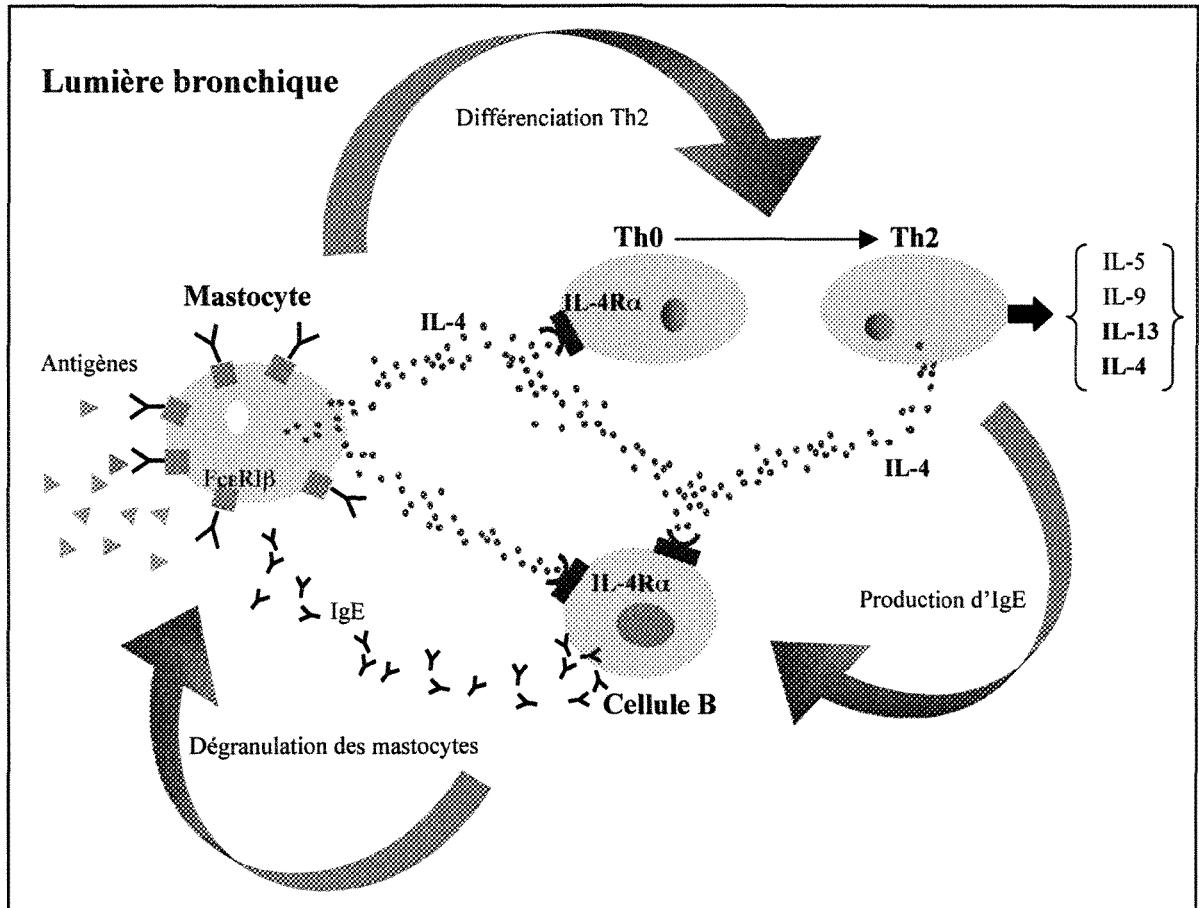


Figure 1 : Schéma représentant une boucle de régulation inflammatoire présente dans les voies respiratoires de sujets asthmatiques. Dans l'asthme allergique, la liaison de l'antigène à son anticorps (IgE), situé sur le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRIβ) des mastocytes, stimule la dégranulation de ces derniers afin de libérer l'IL-4. L'IL-4 induit par la suite la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2 sécréteurs de médiateurs inflammatoires tels l'IL-4 lui-même, l'IL-13, l'IL-5 ou l'IL-9. L'IL-4 exerce également son action dans les lymphocytes B où il induit la commutation et la production d'IgE, lesquels iront ensuite s'attacher sur leurs récepteurs FcεRIβ ce qui a pour effet d'augmenter la sensibilité aux antigènes.

aucune étude n'a montré que l'IL-13 stimule la régulation de PPAR γ , l'IL-13 étant une molécule nouvellement impliquée dans l'asthme comparativement à l'IL-4, on pourrait penser que l'IL-13 influence le PPAR γ . Compte tenu qu'il présente des actions biologiques

similaires, qu'il partage le récepteur IL-4R α et du fait qu'il active la même voie de signalisation JAK-STAT que l'IL-4, il est aussi probable que l'IL-13 régule l'expression du PPAR γ , ce qui suggère que ces deux gènes sont hypothétiquement en interaction.

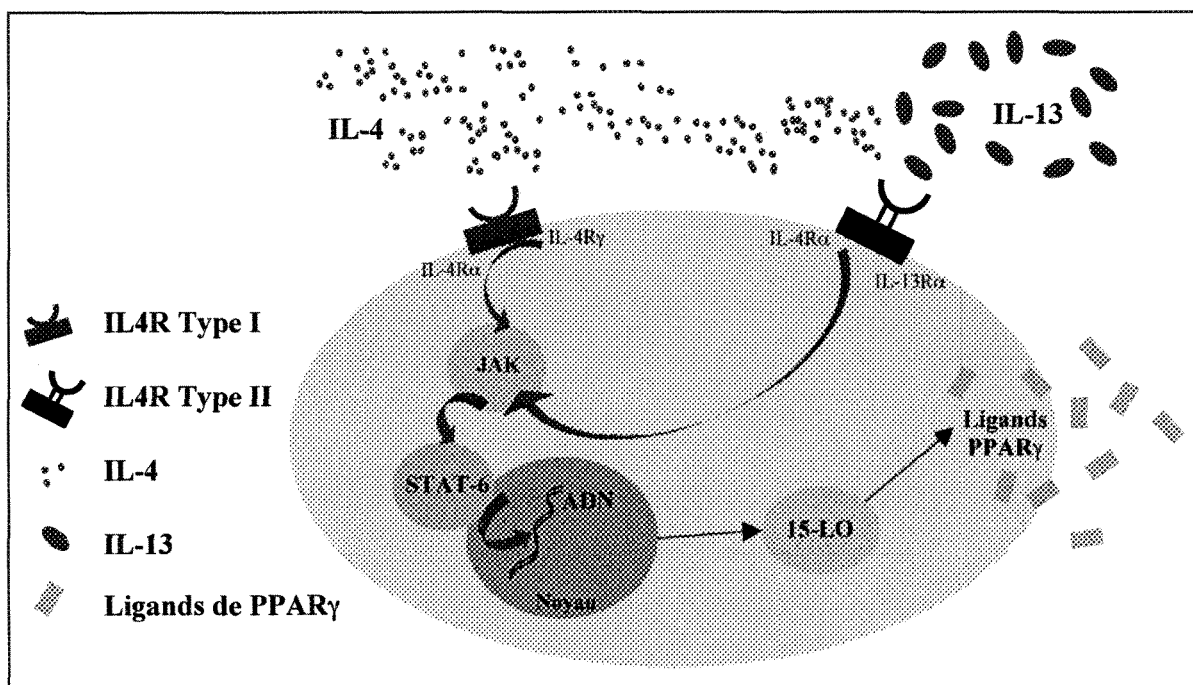


Figure 2 : Schéma hypothétique de l'interaction entre l'IL-4 et le PPAR γ et entre l'IL-13 et le PPAR γ . Les mastocytes activés par les antigènes libèrent une grande quantité d'IL-4 et d'IL-13 dans le tissu pulmonaire. Par la suite, l'IL-4 ou l'IL-13 s'attachent à leurs récepteurs situés sur les macrophages ou les cellules épithéliales ce qui déclenche la voie de signalisation intracellulaire JAK-STAT. Cette cascade initie la transcription des enzymes de dégradation (comme la 15-lipooxygénase (15-LO)) qui une fois activées catalysent la synthèse des ligands du PPAR γ (comme 15d-PGJ2 ou 15-HETE). La liaison de ces ligands au PPAR γ permet l'activation de ce dernier.

2.4.3 *PPARG-IL1B*

Une des actions anti-inflammatoires du PPAR γ est d'inhiber la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels l'IL-1 β dans les lymphocytes T activés par exemple (Jiang et al., 1998). Cette inhibition résulte de l'antagonisme qu'exerce PPAR γ sur le

facteur de transcription responsable d'initier la synthèse d'IL-1 β (Ricote et al., 1998). Le schéma de la Figure 3 montre l'interaction physiologique entre le PPAR γ et les différents facteurs de transcription dans l'inhibition des médiateurs inflammatoires. L'interaction physiologique de ces deux types de molécules pourrait être expliquée, du moins en partie, par une interaction gène-gène entre PPAR γ et IL1B.

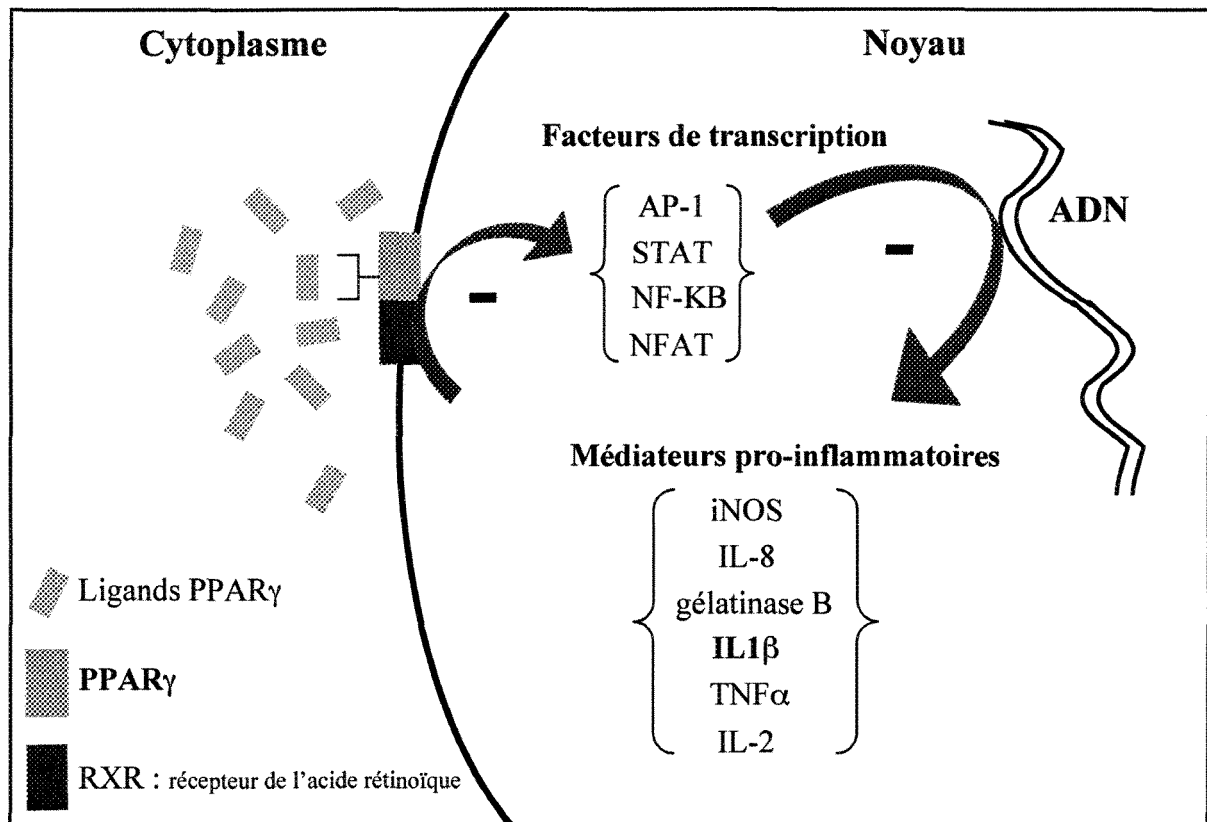


Figure 3 : Schéma hypothétique de l'interaction entre PPAR γ et l'IL-1 β illustré dans les lymphocytes T. Les ligands naturels (comme 15d-PGJ2 ou 15-HETE) produits par la liaison de l'IL4 ou de l'IL-13 au IL-4R α , activent le PPAR γ . Le PPAR γ activé se lie ensuite au récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) pour former un hétérodimère. Cet hétérodimère migre ensuite jusqu'aux *PPAR response elements* (PPREs) (non illustrés) qui permettent au PPAR γ de s'attacher à l'ADN afin d'inhiber la transcription de différents gènes qui produisent des médiateurs inflammatoires tels le iNOS, l'IL-8, l'IL-1 β , la gélatinase B, le TNF α ou l'IL-2. L'inhibition de la transcription de ces médiateurs est le résultat de l'antagonisme, physique ou par compétition des coactivateurs, que PPAR γ exerce sur les facteurs de transcription de ces gènes (AP-1, STAT, NF-kB ou NFAT). Il est à noter que le signe « - » dans le schéma est un symbole qui représente l'inhibition.

Bien entendu, les interactions génétiques proposées entre les différents gènes candidats reposent sur des hypothèses formulées à partir des notions théoriques. De la même manière, l'on pourrait supposer que tous ces gènes sont en interaction, car rien n'indique le nombre de gènes impliqués dans une interaction d'autant plus que leurs protéines semblent toutes impliquées dans une même cascade. Cependant, cette hypothèse ne pourra être testée car premièrement, le nombre de sujets est une limite et deuxièmement, les tests statistiques ne permettent pas l'analyse de plus de trois gènes à la fois sans facteur de correction pour les analyses multiples. Les analyses statistiques tenteront donc de déterminer quels gènes pris deux à deux sont en interaction.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODE

La méthodologie employée dans la recherche de déterminants génétiques d'un trait complexe repose sur certaines étapes primordiales et débute avec le choix de la population et le recrutement des sujets pour l'étude. Une fois cette étape franchie, on effectue l'évaluation clinique de chacun des sujets pour permettre la caractérisation de leur phénotype (le plus finement possible) et on prélève un échantillon sanguin, nécessaire à l'extraction de l'ADN. Cette étape est essentielle, car c'est à partir de l'ADN que la détermination du génotype des polymorphismes est rendu possible pour chaque individu. L'analyse statistique des données phénotypiques et génotypiques constitue la dernière étape de cette recherche de facteurs génétiques liés à l'affection et elle est basée sur des approches statistiques variées visant toutes l'association et l'étude d'interactions entre chacun des gènes et l'asthme ou les phénotypes reliés à l'asthme.

3.1 Population du Saguenay–Lac-St-Jean

La population ciblée dans cette étude est celle du Saguenay–Lac-St-Jean (SLSJ), reconnue comme une population dite à « effet fondateur » (Labuda et al., 1996; Heyer, 1997; Laitinen et al., 2001; Scriver, 2001). Une telle population est préférentiellement choisie dans les études de traits complexes (Peltonen et al., 2000; Newman et al., 2004). De par leur définition, ces populations sont celles où peu de mélanges ethniques se sont produits depuis leur établissement et où plusieurs générations (entre 12 et 25 idéalement) sont disponibles (Laitinen et al., 2001). Aussi, les gens originaires d'une telle population ont généralement un environnement, une culture, une religion et un langage communs, ce

qui limite l'influence de l'environnement sur les paramètres héréditaires dans l'expression clinique de l'affection. Comparativement à des populations cosmopolites, où les mélanges ethniques ont contribué à hétérogénéiser le bagage génétique, les populations dite à effet fondateur conservent des haplotypes « originels », ces blocs ancestraux communs dans leur génome, de taille considérable (environ un mégabase), se retrouvent même après plusieurs générations, contribuant à la conservation d'une certaine homogénéité. C'est cette homogénéité qui est utile et exploitée dans l'étude multicentrique sur la génétique de l'asthme au SLSJ, dirigée par les Drs Laprise et Hudson, car elle devrait faciliter l'identification de régions chromosomiques et de polymorphismes d'intérêt (Peltonen et al., 2000).

3.2 Recrutement des sujets

La cohorte étudiée représente 600 individus originaires du SLSJ (vérifié à l'aide du fichier de population BALSAC (Bouchard et al., 1986)) et ayant participé sur une base volontaire. Leur recrutement s'est fait grâce aux messages publicitaires (journaux, radio ou télévision) et aux cliniques spécialisées (pédiatriques et respiratoires). Les 600 individus sont répartis en 200 trios familiaux, contenant un probant (enfant atteint d'asthme) accompagné de ses deux parents. Pour leur inclusion, les probants devaient remplir au moins un de ces critères : 1) un minimum de trois visites médicales dans une année pour un asthme aigu ou mal contrôlé (exacerbation); 2) au moins deux admissions à l'hôpital pour l'asthme en une année ou; 3) une dépendance aux corticostéroïdes, définie par six mois de thérapies orales ou un an de thérapie aux corticostéroïdes inhalés. Quant aux parents, leur statut clinique devait être connu, ils devaient accepter de se soumettre à l'évaluation phénotypique, au moins un des deux ne devait pas être asthmatique et leurs parents (grands-parents du probant) devaient être originaires du SLSJ. Le comité d'éthique du Complexe hospitalier de la Sagamie a approuvé cette étude en 1998 ainsi que son renouvellement annuel.

3.3 Évaluation clinique

La première implication des participants au projet était de se présenter au Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal situé au Complexe hospitalier de la Sagamie pour leur évaluation clinique. Cette évaluation s'est déroulée en deux visites supervisées par une infirmière de recherche qui a effectué les tests standardisés pour le diagnostic de l'asthme selon les critères de l'ATS (American Thoracic Society, 1995).

La première visite (d'environ une heure) consistait d'abord pour les participants à compléter un questionnaire sur leur santé respiratoire, actuelle et passée, standardisé selon les critères de l'*American Thoracic Society* (ATS), modifié pour inclure la sévérité de l'asthme et de l'atopie ainsi que l'histoire familiale de l'asthme et des autres maladies respiratoires (American Thoracic Society, 1987) (questionnaire disponible à l'Annexe A). Les tests de fonction respiratoire ont ensuite été effectués, incluant le volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) et la capacité vitale forcée (CVF), mesurés à l'aide d'un spiromètre Morgan (Morgan Spiro 232, P.K. Morgan Ltd). La réponse à l'inhalation d'un bronchodilatateur (significative si une augmentation du VEMS 15 minutes après inhalation de 200 mg de Salbutamol était observée) ainsi que la variation du débit expiratoire de pointe (par la mesure biquotidienne sur une période de deux semaines) ont été effectuées à l'aide d'un débitmètre de pointe *mini-Wright peak flow meter* (Armstrong Medical). La mesure des débits expiratoires de pointe permet de caractériser la variabilité de l'obstruction bronchique sur une plus longue période. Suite aux tests de fonction respiratoire, une ponction sanguine a été effectuée chez tous les participants afin de doser les IgE sériques par immunoenzymofluométrie (Ouanticlone total IgE kit #839), de faire le décompte des éosinophiles (Coulter STKS) ainsi que l'extraction de l'ADN (pour l'évaluation génotypique). Finalement, des tests d'allergie cutanés à la piqûre (SPT pour *skin prick test*) ont été réalisés à l'aide d'une batterie de 26 aéroallergènes communs.

Pour la deuxième visite (d'environ une heure), les participants avaient un test de provocation bronchique à la métacholine. Ce test consiste à faire inhaler, pendant deux minutes, une solution saline suivie d'une concentration progressive de métacholine (doublée à chaque reprise) entre 0,03 et 128 mg/ml. La concentration de métacholine qui provoque une chute de 20 % du VEMS permet de déterminer la CP₂₀ (American Thoracic Society, 1995).

3.4 Évaluation phénotypique et définitions

Les deux phénotypes étudiés sont l'asthme et l'atopie, et sont définis selon les critères de l'ATS (American Thoracic Society, 1995). Ainsi, le sujet est **asthmatique** s'il présente les symptômes respiratoires associés à l'asthme (toux, dyspnée, oppression thoracique) en plus d'une hyperréactivité bronchique (HRB), définie ici comme une CP₂₀ < 8 mg/ml (pour éviter d'inclure des patients pour lesquels la réactivité aurait été trop limitée entre 8 et 16 mg/ml) (American Thoracic Society, 1995). Si la CP₂₀ n'est pas mesurable, comme c'est parfois le cas chez de jeunes enfants, l'HRB est définie comme une augmentation supérieure ou égale à 15 % du VEMS après l'inhalation d'un bronchodilatateur ou comme une variation du débit expiratoire de pointe plus grand ou égal à 12 % de la valeur de base sur une période de deux semaines (American Thoracic Society, 1995). Un sujet est **atopique** (allergique) s'il présente un taux anormalement élevé d'IgE (estimé supérieur à 100 mg/l suivant la distribution logarithmique au sein de la cohorte étudiée) et que son test d'allergie cutanée à la piqûre (SPT) est positif pour au moins un allergène (c'est-à-dire ≥ 3 mm d'induration après 10 minutes). Finalement, on dira qu'un sujet est **asthmatique allergique** s'il présente les symptômes respiratoires, l'hyperréactivité bronchique et un SPT positif. Parallèlement, les **sujets témoins** (qui ne souffrent pas d'asthme ou de maladies associées à l'asthme) ne présentent aucune réaction positive au test d'allergie, aucune hyperréactivité bronchique (CP₂₀ > 8 mg/ml) et leur quantité d'IgE sériques est dite normale (American Thoracic Society, 1995). La Figure 4 présente un schéma de la classification des différents phénotypes, basé sur les caractéristiques cliniques observées.

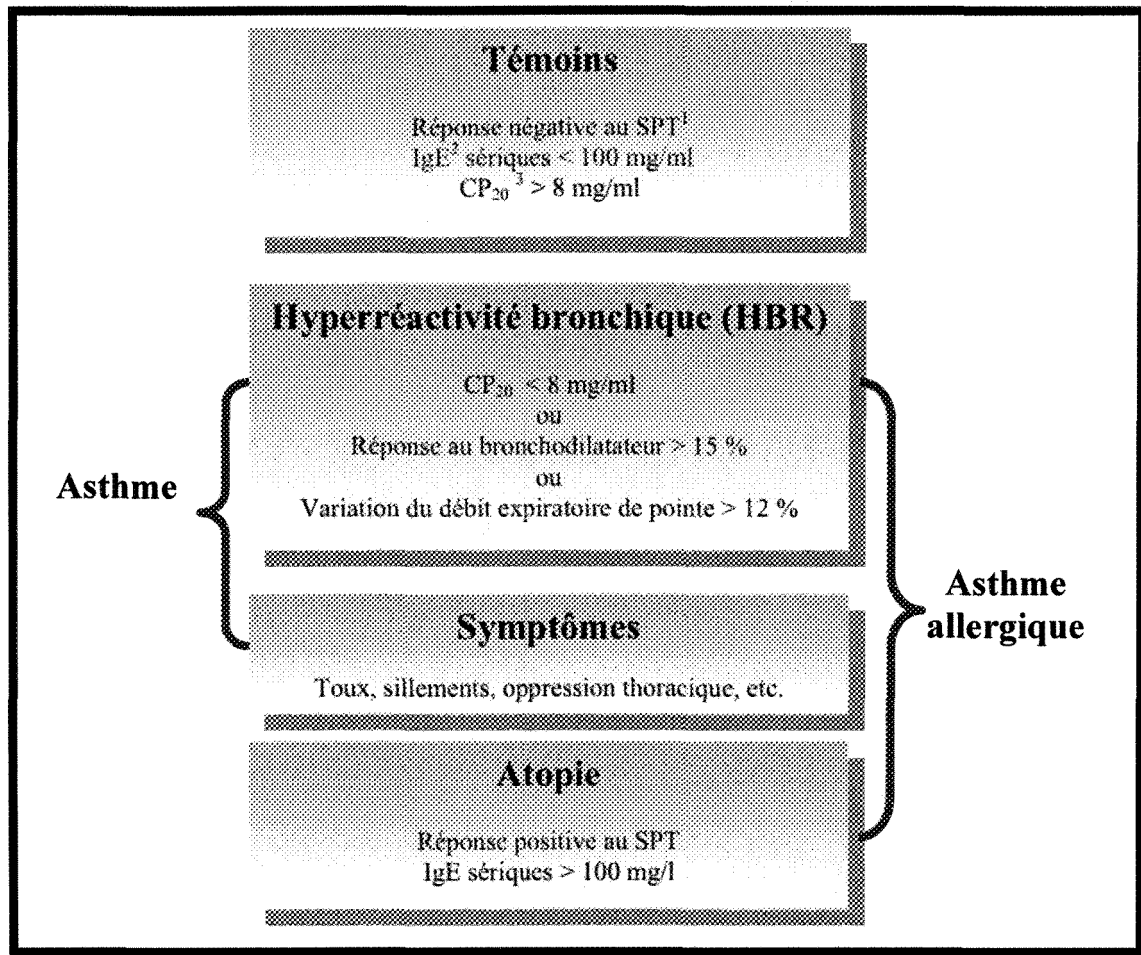


Figure 4 : Définition des phénotypes relatifs à l'asthme pour les sujets qui composent les 200 trios évalués. ¹ SPT = Test d'allergie cutanée à la piqûre; ² IgE = Immunoglobuline E; ³ CP₂₀ = Concentration de méthacholine qui provoque une chute de 20 % du VEMS

3.5 Évaluation génotypique

La première étape de l'évaluation génotypique (génotypage) consiste à extraire l'ADN des globules blancs présents dans les prélèvements sanguins, prélevés sur les sujets lors de la première visite, par le procédé des colonnes Qiagen® Genomic-tip 100/G (#13343). Une fois l'ADN extrait, le génotypage est effectué pour chacun des 600 échantillons d'ADN afin de déterminer la présence ou l'absence des polymorphismes ciblés. Le génotypage repose sur l'amplification PCR (pour *polymerase chain reaction*) qui, avec l'utilisation d'amorces spécifiques, permet d'amplifier la section d'ADN qui

contient le polymorphisme d'intérêt. Ce fragment d'ADN amplifié permet ensuite la détection du polymorphisme au moyen de techniques variées. Dans le présent cas, deux techniques ont été utilisées pour la détection des SNPs des cinq gènes candidats, il s'agit de la technique **RFLP** (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*) pour le gène PPARG et de la technique **SNPstream[®] UHT** (UHT pour *Ultra-High Throughput*) utilisant la fluorescence par polarisation pour les gènes IL4, IL4R, IL13 et IL1B. La Figure 5 présente de façon schématique les étapes de l'évaluation génotypique qui permettent de déterminer le génotype de chaque individu pour chacun des gènes de la présente étude.

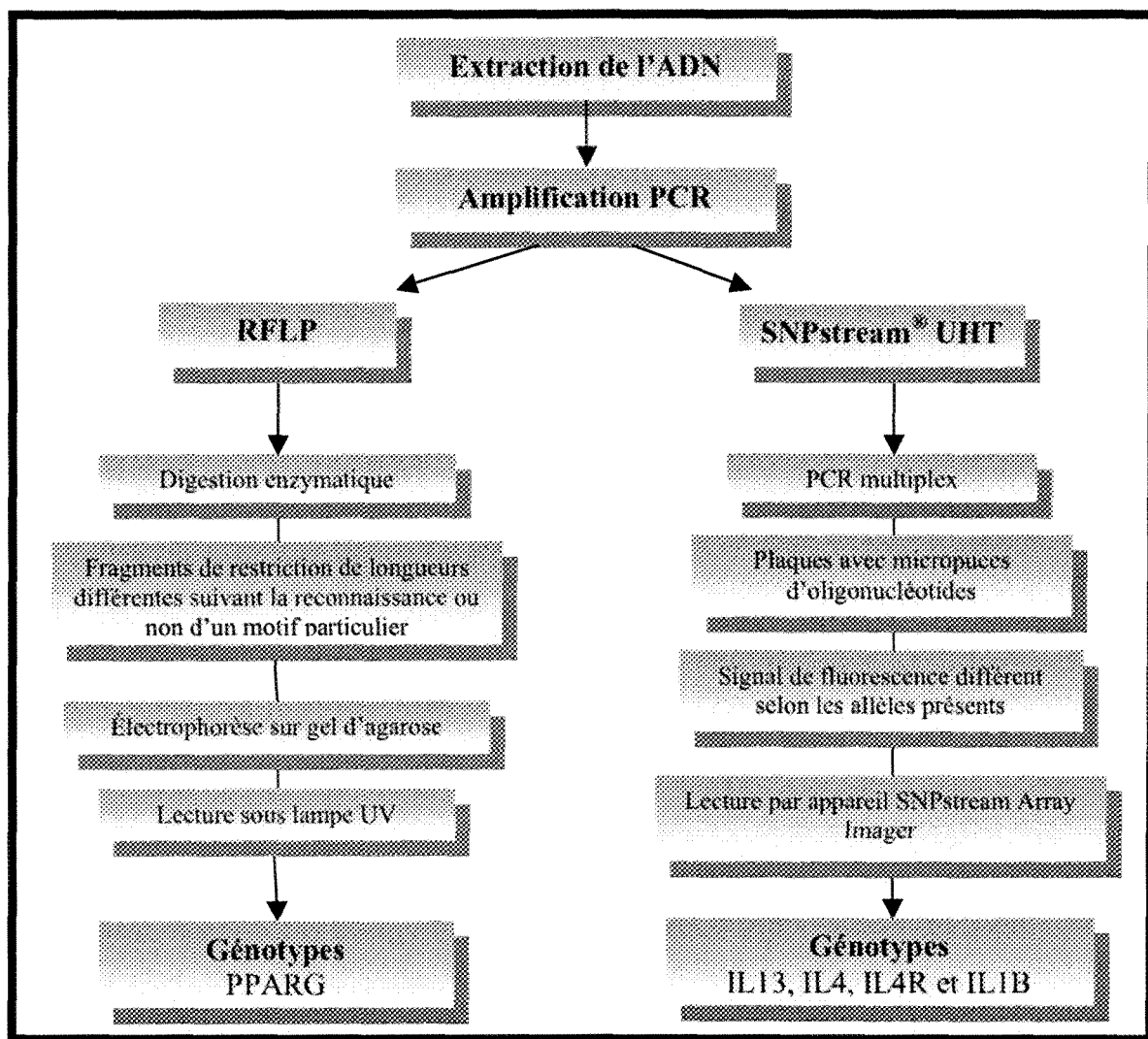


Figure 5 : Résumé des étapes de l'évaluation génotypique.

La technique qui utilise les longueurs des fragments de restriction dans la reconnaissance des polymorphismes ou RFLP est utilisée pour déterminer la présence ou l'absence du polymorphisme PPARG-Pro12Ala (rs1801282) à l'intérieur des 600 échantillons d'ADN. Cette technique a été mise au point par Yen et ses collaborateurs en 1997 pour ce polymorphisme et a été modifiée dans le laboratoire du Centre de médecine génique communautaire (CMGC) (Yen et al., 1997). La technique repose sur l'utilisation d'une enzyme de restriction spécifique, la BstU1, dont la fonction est de parcourir chacun des brins d'ADN amplifiés et de « couper » si le motif de reconnaissance (CG//CG) est présent dans le fragment. L'action de cette enzyme permet de scinder l'ADN en plusieurs fragments de restriction de longueurs différentes (c'est-à-dire le nombre de paires de bases), ce qui permet leur reconnaissance sur un gel d'agarose après une migration électrophorétique. Selon que l'ADN ait été fragmenté ou non, il est possible d'établir le génotype de chacun des individus porteurs de la mutation (hétérozygote), non porteurs de la mutation (homozygote normal) et porteurs de deux allèles mutés (homozygote muté).

SNPstream[®] UHT est un système de génotypage automatisé à haut rendement développé par Orchid Biosciences afin de diminuer les coûts et d'augmenter l'efficacité du génotypage des SNPs, qui jouent un rôle de plus en plus important dans la cartographie du génome, dans la pharmacogénétique et dans la découverte de médicaments. La plateforme de génotypage du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill est munie de ce système et peut génotyper jusqu'à 480 000 SNPs par jour (soit 105 plaques de 384 puits) (Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, 2004). Le matériel et la méthode de ce système de génotypage à la fine pointe de la technologie ont été décrits par Bell et ses collègues en 2002, technique reprise et adaptée au Centre d'innovation Génome Québec, où le génotypage des polymorphismes des gènes IL4 (rs2243250), IL4RA (rs1805013), IL13 (rs1295685) et IL1B (rs1143634) a été effectué. En bref, les étapes du génotypage consistent en une réaction PCR en multiplex (jusqu'à 12 SNPs à la fois) suivie d'une réaction d'extension d'un seul nucléotide au moyen de didésoxynucléotide triphosphate (ddNTP) colorés avec des marqueurs fluorescents (*TAMRA* et *Bodipy-*

Fluorescein). Les échantillons sont ensuite transférés dans une plaque de 384 puits contenant des micropuces d'oligonucléotides d'ADN des SNPs testés. De cette manière, il est possible d'analyser séparément chacun des SNPs du système multiplex. La fluorescence émise par les colorants est ensuite détectée par un appareil nommé « *SNPstream Array Imager* » branché à un ordinateur contenant les logiciels d'interprétation développés par Beckman Coulter. Ces logiciels sont utilisés pour mesurer l'intensité de la fluorescence « *UHTimage* » et pour déceler le signal des génotypes « *UHTGEtGenos* » (Bell et al., 2002; Poon et al., 2004). Le système SNPstream® UHT d'Orchid Biosciences a un taux de conversion d'environ 85 %. La plupart des problèmes d'essai sont liés à l'échec de la réaction PCR en multiplex. Le taux de réussite du génotypage est de 96 %, pour un taux d'erreur de moins de 0,5 % (Bell et al., 2002).

3.6 Analyses statistiques

Le traitement de toutes les données obtenues (cliniques, phénotypiques et génotypiques) a nécessité l'utilisation de plusieurs outils statistiques. Pour ce qui est des données cliniques et phénotypiques, les analyses descriptives ont été effectuées avec le logiciel Statview®, version 5.0, dont les résultats sont présentés dans les Tableaux I et II du Chapitre 4. Concernant les données génotypiques, la vérification de leur **qualité** ainsi que de leur **puissance statistique** est l'étape qui précède les **analyses d'association** phénotypes/génotypes et les **analyses d'interaction**.

3.6.1 *Qualité des données génotypiques*

Pour toute étude génétique, la qualité des données utilisées est « cruciale ». Une trop grande variabilité dans les données génotypiques, des phénotypes mal définis ou des données manquantes affectent la puissance de la cohorte étudiée en plus d'augmenter le risque d'association artéfactuelle entre phénotypes et génotypes (Rousseau et Laflamme, 2003). La qualité des données phénotypiques repose sur l'utilisation d'une démarche

standardisée dans l'établissement des phénotypes de chaque individu (tel que vu précédemment) et la qualité des données génotypiques peut être vérifiée par plus d'un moyen. Dans la présente étude, la qualité des génotypes a été mesurée par le **taux de réussite du génotypage**, par la vérification des **erreurs mendéliennes** et finalement, par la vérification de l'**équilibre de Hardy-Weinberg** (EHW).

Le **taux de réussite du génotypage** pour chaque SNP représente le pourcentage (%) de génotypes obtenus sur le total d'échantillons évalués. Ce taux de réussite doit être supérieur à 95 % pour limiter les biais provoqués par les erreurs de type I.

Les **erreurs mendéliennes** se définissent comme les impossibilités de transmission des allèles des parents aux enfants (possibles en raison de l'utilisation des trios familiaux). Par exemple, deux parents homozygotes pour les allèles « normaux », ne peuvent pas transmettre d'allèles « mutés »; l'enfant ne pourra donc pas être hétérozygote ou homozygote muté. Ces erreurs peuvent survenir suite à des problèmes au niveau de l'interprétation des génotypes ou dans l'étiquetage des tubes d'ADN par exemple.

Les erreurs de génotypage peuvent modifier de façon notable la fréquence allélique des polymorphismes à l'étude et causer une perte de l'**équilibre de Hardy-Weinberg** (Rousseau et Laflamme, 2003). Ceci est particulièrement évident dans les études cas-témoins où les individus ne sont pas apparentés et où les erreurs mendéliennes ne peuvent être vérifiées (Hoffjan et al., 2003). La vérification de l'équilibre de Hardy-Weinberg commence avec la détermination des fréquences alléliques observées « p » (pour l'allèle majeur ou le plus fréquent) et « q » (pour l'allèle mineur ou le moins fréquent) à partir des fréquences génotypiques observées dans l'échantillon. Avec les fréquences alléliques, il est possible d'établir les proportions génotypiques attendues (dans la population générale) sous Hardy-Weinberg en appliquant la formule suivante :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Où les fréquences génotypiques sont représentées par p^2 (homozygote normal), $2pq$ (hétérozygote) et q^2 (homozygote muté). Ainsi, on compare les proportions génotypiques observées et attendues et on effectue un test d'hypothèse du chi-deux (χ^2) pour accepter ou non l'hypothèse de départ (H_0 = les proportions génotypiques sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg) (Hartl et Clark, 1997). Le Tableau III (Chapitre 4) présente les résultats de la vérification de l'équilibre de Hardy-Weinberg pour chacun des SNPs à l'étude.

3.6.2 *Calcul de puissance*

Les études familiales de type « trios » (père-mère-proband), comme la présente étude, sont un des profils expérimentaux permettant d'identifier les gènes impliqués dans les traits complexes (Rousseau et Laflamme, 2003). Afin que les probabilités de trouver des associations positives soient significatives, il est essentiel de calculer la puissance statistique de la cohorte utilisée et ceci, par simulation à l'aide de différents modèles. Ces modèles doivent prendre en compte la fréquence allélique (par exemple 2,5 %), la pénétrance et la prévalence de la maladie dans la population étudiée. Ainsi, il est possible d'estimer le nombre de trios à inclure dans l'étude qui permettra de voir s'il y a des associations entre l'asthme et les marqueurs génétiques sélectionnés. Mathieu Lemire, mathématicien du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, a effectué ces calculs de puissance à l'aide du modèle de simulation développé par Monte Carlo (Borenstein et al., 1987). Pour la présente étude, les calculs présentés à l'Annexe B montrent que l'utilisation de 200 trios offre une puissance satisfaisante en utilisant une prévalence d'asthme de 15 % (observée dans la population générale) et une fréquence allélique de 2,5 % (Lemire, 2004). Ces paramètres sont sévères, puisque la prévalence d'asthme observée dans la cohorte étudiée est d'environ 60 % et la fréquence allélique, selon les variants (Tableau III), au-dessus de 10 %.

3.6.3 *Analyse d'association*

Le test statistique utilisé pour évaluer l'association entre l'asthme et les déterminants génétiques et environnementaux est le Test de Déséquilibre de Transmission (TDT). Ce test vise à évaluer le nombre de fois où l'allèle de susceptibilité (contenant le polymorphisme) est transmis ou non chez les enfants atteints. Donc, lorsqu'un déséquilibre survient dans la transmission de cet allèle de susceptibilité des parents vers le probant, c'est que l'allèle dit de susceptibilité est transmis à plus de 50 % chez les enfants atteints lorsqu'un parent est hétérozygote pour ce variant. L'analyse TDT résultera alors en une valeur p significative inférieure à 0,05, signifiant que l'allèle est associé à la maladie. Dans le cas où l'allèle de susceptibilité ne serait pas lié à la maladie, alors le test n'aura pas de valeur p significative (supérieure à 0,05) (Spielman et Ewens, 1996; Peltonen et al., 2000). Ce test est effectué à l'aide du logiciel FBAT version 1.4 (pour *Family Based Tests of Association*), outil développé par Horvath et collègues en 2001 et largement utilisé dans les études d'association utilisant le TDT (Horvath et al., 2001). Les résultats des TDT sont présentés dans les Tableau IV et V du Chapitre 4.

3.6.4 *Analyse d'interaction*

Étant donné que peu d'études rapportant des analyses d'interaction gène-gène sont répertoriées dans la littérature et qu'aucun modèle mathématique n'a encore été développé pour démontrer les interactions entre les gènes dans des cohortes familiales de type « trios », trois approches ont été explorées pour tester l'effet des gènes les uns sur les autres.

La première approche consiste en l'utilisation du **logiciel FBAT**, version 1.4 et sa nouvelle mise à jour qui permet les analyses haplotypiques (Horvath et al., 2004). Cette extension du logiciel permet d'effectuer des TDT pour plus d'un locus dans un même gène (haplotype). Comme il est maintenant possible d'analyser deux loci ou plus en même

temps, la présence de deux SNPs non liés (situés sur des régions chromosomiques différentes) a été testée. Bien que les SNPs non liés ne représentent pas un haplotype mais une combinaison d'allèles, cette analyse permet de voir la transmission simultanée de deux marqueurs génétiques spécifiques, sans toutefois déterminer l'effet additif des gènes les uns sur les autres. Puisque la fonction de ce logiciel repose sur l'étude haplotypique et que la présente étude porte plutôt sur l'interaction de SNPs dans différents gènes, cette analyse est imparfaite et mène inévitablement à l'utilisation d'autres approches. Le Tableau VI présentent les résultats TDT du FBAT pour les combinaisons d'allèles des différents gènes étudiés.

La deuxième approche utilisée fut le **rapport des cotes d'exposition** (*odds ratio*) au facteur étudié chez les cas et les témoins. Étant donné que la cohorte étudiée représente des trios familiaux apparentés à un probant asthmatique et que pour effectuer un *odds ratio* il faut une cohorte cas-témoins non apparentés, il a été envisagé de construire une cohorte cas-témoins à partir de ces trios. Pour ce faire, tous les trios parmi les 200 qui présentaient le profil suivant (un probant, un parent asthmatique et un parent non asthmatique) ont été sélectionnés. Ensuite, les probants ont été supprimés pour ne considérer que les parents. De cette manière, on se retrouve avec une cohorte contenant des cas (parents asthmatiques) et des témoins (parents non asthmatiques) non apparentés entre eux, certes, mais liés à un probant asthmatique. Ceci amène un biais statistique en ce sens où les témoins sont plus susceptibles de contenir des éléments génétiques communs avec les probants asthmatiques étant donné qu'ils auront transmis la moitié de leur génome à ces dits probants. Les sujets témoins seront donc génétiquement plus semblables aux sujets atteints qu'à des témoins qui proviendraient de la population générale. Malgré cette limitation statistique, les *odds ratio* ont été effectués à titre « exploratoire » pour fournir une estimation de la force de l'association entre l'exposition et la survenue de l'événement (Kahn et Sempos, 1989). Concrètement, on veut voir l'effet de l'exposition d'un paramètre (par exemple un gène) en fonction de la présence ou de l'absence d'une maladie. La Figure 6 montre l'adaptation d'un *odds ratio* « classique » effectuée dans la présente étude afin de pouvoir évaluer les

interactions entre deux gènes. Les Tableaux VII et VIII du Chapitre 4 montrent les résultats du *odd ratio* pour l'interaction entre différents gènes pris deux à deux pour l'asthme et l'atopie. Les *odds ratio* et les valeurs *p* qui leur sont rattachées ont été effectués à l'aide du logiciel SPSS version 11.0 pour Mac OS X.

				Maladie	
				Cas (asthmatiques)	Témoins (non asthmatiques)
Gène A	+	Gène B	Allèle 1	A	B
			Allèle 2	C	D
Préalable (1 2 ou 2 2)		Facteur de risque			

Figure 6 : Table résumant le calcul du *odd ratio*. Sous des conditions d'échantillonnage et de mesure adéquate, le rapport AD/BC estime le *odd ratio* pour un cas (asthmatique ou atopique) de présenter l'allèle normal « 1 » du gène B lorsque l'allèle muté « 2 » du gène A est présent (individus hétérozygotes « 1 2 » ou homozygotes mutés « 2 2 »). Adapté de (Kahn et Sempos, 1989).

Une dernière approche a été employée, il s'agit d'une **analyse de régression multiple**, utilisée dans le but de mesurer l'effet additif de deux gènes dans le cas où le premier est associé (Lemire, 2004). Ces statistiques reposent sur le concept de *pseudotémoins* où le génotype des cas (probants asthmatiques) est apparié à trois *pseudotémoins*, lesquels consistent aux trois génotypes qui peuvent être transmis par les parents. L'analyse de régression logistique conditionnelle permet de tester les interactions entre des polymorphismes non liés (Cordell et Clayton, 2002). Concrètement, ce modèle de régression part d'un SNP déjà associé pour en rajouter un autre afin de voir comment le second modifie la signification des données en fonction de la signification du premier (celle qui tient compte du SNP associé). Alors, en tout temps, les résultats ne peuvent être confondus par le premier SNP (Cordell et Clayton, 2002). Les résultats des Tableaux IX et X du Chapitre 4 présentent l'analyse de régression effectuée à l'aide du logiciel SAS sur Sun pour les phénotypes de l'asthme et l'atopie respectivement (Lemire, 2004). Pour garder

le nombre de paramètres bas (ainsi que le degré de liberté) deux gènes à la fois ont été considérés. Pour deux gènes, A et B, le modèle de régression est le suivant et présenté dans l'Annexe C :

$$\text{Log (odds)} = A + B + A * B$$

Où A et B dénotent l'effet de chacun des gènes respectivement et où A * B dénote l'interaction entre les deux gènes. Pour tester l'existence d'une interaction, le premier gène devait être associé (valeur $p < 0,10$) afin de voir l'effet de l'autre gène en mode additif ou dominant (Lemire, 2004).

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

Les résultats seront présentés de manière à suivre l'ordre établi dans la section Matériel et Méthode. Ainsi, les analyses d'association et d'interaction seront précédées par la présentation des données cliniques et phénotypiques que représentent les échantillons de la cohorte du Saguenay-Lac-Saint-Jean.

4.1 Données cliniques

Les données cliniques sont présentées dans le Tableau I et sont disponibles pour les probants (n = 200) et les parents (n = 400).

Tableau I : Distribution des données cliniques des individus des 200 trios.

	Probants n = 200	Parents n = 400
Ratio Homme : Femme	1 : 1,1	1 : 1
Âge moyen en années (Intervalle)	17,4 (3-46)	45,5 (27-79)
Tabagisme		
Non-fumeur (%)	83	33
Ex-fumeur (%)	6	40
Fumeur (%)	11	27
VEMS ¹ (% de la valeur prédite (SD ²))	92,2 (15,9)	93,1 (18,6)
CP ₂₀ ³ (mg/ml (SD))	2,7 (3,2)	12,1 (5,4)
IgE ⁴ sériques (mg/l (SD))	243,2 (4,6)	104,5 (4,1)

¹ VEMS = Volume expiratoire maximal en une seconde; ² SD = Déviation standard; ³ CP₂₀ = Concentration de métacholine qui provoque une chute de 20 % du VEMS; ⁴ IgE = Immunoglobuline E.

Il est à noter que les données du Tableau I montrent une valeur de CP₂₀ moyenne de 2,7 mg/ml pour les probants et de 12,1 mg/ml pour les parents. Il est logique de noter une hyperréactivité plus importante chez les probants qui sont tous asthmatiques que chez leurs parents qui ne sont pas tous asthmatiques, augmentant par le fait même leur CP₂₀ moyenne. On remarque toutefois que la CP₂₀ moyenne des parents est inférieure à celle que l'on pourrait observer dans la population générale (se situant en moyenne aux alentours de 32 mg/ml) (Laprise et Boulet, 1996; Laprise et al., 1999). Concernant les IgE sériques, on remarque aussi des valeurs plus élevées chez les probants (243,3 mg/l) comparativement aux parents (104,5 mg/l). Encore une fois, le statut atopique est plus fréquent chez les probants asthmatiques que chez les parents.

4.2 Données phénotypiques

Les données cliniques ont permis de déterminer le phénotype de chaque individu (tel que décrit dans la section Matériel et Méthode, Chapitre 2). La distribution des principaux phénotypes (en pourcentage) dans la cohorte du SLSJ est présentée dans le Tableau II.

Tableau II : Proportion des différents phénotypes au sein des individus de la cohorte des 200 trios.

Phénotypes (%)	Probants n = 200	Parents n = 400
Asthme	100	41
Atopie	83	57
HRB ¹	89	43
IgE ² > 100 mg/l	72	48

¹ HRB = Hyperréactivité bronchique; ² IgE = Immunoglobuline E

Il est à noter que les deux phénotypes analysés sont l'asthme et l'atopie. Étant donné que le critère de sélection des probants est l'asthme, 100 % sont asthmatiques, comparativement à 41 % qui sont des parents. Concernant l'atopie, 83 % des probants sont

allergiques comparativement à 57 % pour les parents. Concernant l'HRB, on remarque que seulement 89 % des probants ont une CP₂₀ inférieure à 8 mg/ml. Quant aux autres 11 %, c'est que la CP₂₀ n'est pas disponible, mais ils ont une histoire d'asthme bien documentée, ce qui permet de définir leur phénotype.

4.3 Données génotypiques

Le premier traitement des données génotypiques consiste au calcul des fréquences alléliques et génotypiques. Ces données permettent ensuite d'évaluer l'équilibre de Hardy-Weinberg au moyen d'un test du chi-deux (χ^2). Le Tableau III présente les cinq gènes avec leur SNP (#rs) et la mutation responsable de ce SNP. Les allèles sont présentés en allèle le plus fréquent « 1 » et en allèle le moins fréquent « 2 » et les génotypes en « 1 1 », « 1 2 » et « 2 2 » afin de faciliter la compréhension de la table. Cette forme sera d'ailleurs utilisée plus loin dans les analyses d'association et d'interaction.

Avant de commenter les données du Tableau III, mentionnons le taux de réussite respectif pour chaque gène, soit de 99,8 % (PPARG), 96 % (IL4), 97,5 % (IL4RA), 97,2 % (IL13) et 96,7 % (IL1B). Ces taux de réussite, combiné au fait qu'aucune erreur mendélienne n'est présente dans les trios, témoignent de la qualité du génotypage et permet d'effectuer les analyses statistiques comme le test du χ^2 dans l'évaluation de l'EHW. Les résultats du test du χ^2 (Tableau III) montrent des probabilités toutes supérieures à 5 % (entre 15,5 et 89,2 %), ce qui permet d'accepter l'hypothèse H₀, soit que les fréquences alléliques sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg et que par conséquent, il est possible de croire que la distribution allélique au sein de la cohorte (ou de l'échantillon) représente celle de la population du SLSJ.

Tableau III: Fréquences génotypiques attendues sous l'équilibre de Hardy-Weinberg (EHW) pour chacun des gènes à l'étude.

Gène SNP ¹	IL4 ³ rs2243250	IL4RA ⁴ rs1805013	IL13 ⁵ rs1295685	IL1B ⁶ rs1143634	PPARG ⁷ rs1801282
Mutation	C/T	C/T	C/T	C/T	C/G
Fréquence allélique *					
1	0,843	0,898	0,739	0,750	0,864
2	0,157	0,102	0,261	0,250	0,136
Fréquences génotypiques observées **					
1 1	412	473	318	325	443
1 2	147	105	226	220	149
2 2	17	7	39	35	7
Total	576	585	583	580	599
Fréquences génotypiques attendues					
1 1	409	472	319	326	447
1 2	153	107	225	218	141
2 2	14	6	40	36	11
Total	576	585	583	580	599
EHW²					
Test du chi-deux (χ^2)	0,765	0,184	0,018	0,077	2,020
Probabilité (dl=1)	0,382	0,668	0,892	0,782	0,155

* « 1 » correspond à l'allèle le plus fréquent (p); « 2 » correspond à l'allèle le moins fréquent (q);

** « 1 1 » correspond à un génotype homozygote normal (p²); « 1 2 » correspond à un génotype hétérozygote (2pq); « 2 2 » correspond à un génotype homozygote muté (q²);

¹ SNP = polymorphisme d'un seul nucléotide; ² EHW = Équilibre de Hardy-Weinberg; ³ IL4 : gène de l'interleukine-4; ⁴ IL4RA = gène du récepteur de l'interleukine-4 alpha; ⁵ IL13 = gène de l'interleukine-13; ⁶ IL1B = gène de l'interleukine-1bêta; ⁷ PPARG = gène du *Peroxisome proliferator activated-receptor gamma*.

4.4 Analyses d'association

Les analyses d'association (génotypes/phénotypes) ont été effectuées à l'aide du logiciel FBAT et les résultats sont présentés dans le Tableau IV. Ce logiciel effectue un test TDT qui résulte en une valeur Z et la valeur p qui lui est associée. Les résultats sont en fonction de l'allèle muté. Une valeur Z négative indique que l'allèle muté est moins fréquent chez les probands atteints et vice versa pour une valeur Z positive (Horvath et al., 2004).

Tableau IV : Association entre l'allèle muté de chaque SNP testé et l'asthme et l'atopie.

Phénotypes	Données	IL4	IL4RA	IL13	IL1B	PPARG
Asthme	Fréquence	0,157	0,102	0,261	0,250	0,136
	Trios (n)	79	58	118	115	83
	Valeur Z	0,209	1,75	0,412	-0,839	2,411
	Valeur <i>p</i>	0,8348	0,0801	0,6800	0,4014	0,0159
Atopie	Fréquence	0,157	0,102	0,261	0,250	0,157
	Trios (n)	65	50	99	96	71
	Valeur Z	-0,465	1,753	0,091	-1,375	2,038
	Valeur <i>p</i>	0,6419	0,0796	0,9276	0,1691	0,0415

Les résultats du Tableau IV montrent une seule association positive avec le gène PPARG. En effet, l'allèle muté « 2 » de PPARG est plus fréquent (valeur Z positive) chez les probants asthmatiques avec une valeur *p* de 0,0159. Cette valeur *p* est de 0,0415 lorsqu'il s'agit de l'atopie. Ces deux valeurs *p* suggèrent l'association de ce variant avec l'asthme et l'atopie. Afin de mieux visualiser les différences de transmission allélique observées avec le variant de PPARG chez les asthmatiques, un TDT « classique » a été effectué dans les trios où au moins un parent est hétérozygote tel que décrit par (Spielman et Ewens, 1996). Le Tableau V présente les résultats de ce TDT.

Tableau V : Association entre PPARG et l'asthme.

		Transmis	Non Transmis
PPARG	Allèle 1	34	57
	Allèle 2	57	34

Les données du Tableau V corroborent celles du FBAT et permettent de voir que l'allèle « 2 » est plus souvent transmis (57 fois) que non transmis (34 fois) chez les probants atteints, ce qui montre le déséquilibre dans la transmission (s'éloigne du 50 : 50

théorique). Suite à un test du χ^2 effectué à l'aide d'une table de contingence, les données du Tableau V présentent une valeur de χ^2 de 5,8 qui, avec un de degré de liberté, correspond à une valeur p située entre 0,01 et 0,025. La valeur p inférieure à 0,05 valide les résultats.

4.5 Analyses d'interaction

Tel que mentionné dans la section analyse statistique du Matériel et Méthode (Chapitre 2), les interactions gène-gène ont été effectuées selon plusieurs méthodes. La première, consiste en l'utilisation du logiciel FBAT version haplotype lequel permet d'effectuer un TDT pour la transmission de deux allèles considérés comme une combinaison d'allèles plutôt que d'un haplotype. Le Tableau VI présente les analyses d'interaction entre deux gènes pour l'asthme et l'atopie. Les résultats présentés sont ceux considérés significatifs. Les analyses complètes sont présentées dans l'Annexe D.

Tableau VI : Interactions entre les allèles de différents gènes analysées par TDT pour l'asthme et l'atopie.

Phénotypes Interactions	Asthme		Atopie	
	Valeur Z	Valeur p	Valeur Z	Valeur p
PPARG / IL4 2 / 1	2,331	0,0198	2,033	0,0420
PPARG / IL4R 1 / 1	-2,789	0,0053	-2,458	0,0140
PPARG / IL1B 1 / 2	-1,653	0,0984	-2,072	0,0382
PPARG / IL13 1 / 1 2 / 1	-2,223	0,0262	-1,602	0,1092
	3,016	0,0026	2,436	0,0149
IL4 / IL4R 1 / 2	2,346	0,0790	2,425	0,0153
IL4R / IL1B 2 / 1	2,355	0,0185	2,077	0,0378

La présentation des interactions entre les gènes à l'intérieur des différents tableaux suit la forme du Tableau VI. Les gènes sont d'abord présentés (par exemple : PPARG /

IL4) et en-dessous, on retrouve l'allèle testé pour chaque gène (par exemple : 2 / 1). À titre d'exemple, lorsque l'allèle « 2 » de PPARG est transmis en même temps que l'allèle « 1 » de IL4, on se retrouve avec une combinaison d'allèles plus souvent transmise chez les probants atteints avec une valeur Z positive et une valeur p de 0,0198. Ainsi, on peut remarquer dans ce tableau que l'allèle « 2 » de PPARG en combinaison avec l'allèle « 1 » de IL13 sont transmis plus souvent chez les probants asthmatiques avec une valeur Z positive et une valeur p significative de 0,0026.

Les résultats de la deuxième approche qui utilise les *odds ratio* sont présentés dans les Tableaux VII (pour l'asthme) et VIII (pour l'atopie).

Tableau VII : Analyse d'interaction entre les différents gènes pour l'asthme en considérant les parents de la cohorte comme des cas-témoins.

Gène A *	Gène B ** (exposition)	Parents Asthmatiques (cas)	Parents non Asthmatiques (témoins)	Odd ratio	Valeur p
IL4RA	IL1B (1 1)	28	15	2,9867	0,034
	IL1B (1 2 ou 2 2)	10	16		
IL4RA	IL4 (1 1)	28	23	1,0821	0,888
	IL4 (1 2 ou 2 2)	9	8		
PPARG	IL1B (1 1)	23	29	0,9600	0,922
	IL1B (1 2 ou 2 2)	19	23		
PPARG	IL13 (1 1)	23	27	1,1657	0,711
	IL13 (1 2 ou 2 2)	19	26		
PPARG	IL4 (1 1)	29	36	1,0985	0,841
	IL4 (1 2 ou 2 2)	11	15		
PPARG	IL4RA (1 1)	31	47	0,3598	0,067
	IL4RA (1 2 ou 2 2)	11	6		

* Les gènes A sont considérés lorsque l'allèle « 2 » est présent (i.e « 1 2 » ou « 2 2 »).

** « 1 1 » correspond à un génotype homozygote normal; « 1 2 » correspond à un génotype hétérozygote; « 2 2 » correspond à un génotype homozygote muté.

Ainsi, on peut remarquer qu'aucun résultat n'est significatif sauf celui de l'interaction entre IL4RA et IL1B (valeur $p = 0,034$) pour l'asthme et une tendance suggestive pour l'interaction de PPARG et IL4RA (valeur $p = 0,067$). La manière dont le

test est effectué permet d'interpréter ces résultats de la manière suivante. Dans le cas du IL4RA et du IL1B, on dira que chez les asthmatiques, lorsqu'ils sont porteurs de l'allèle « 2 » de IL4RA, c'est l'allèle « 1 » du IL1B qui est plus fréquente (28 fois) comparativement à l'allèle « 2 » (10 fois) avec un *odd ratio* atteignant presque 3. Ce qui suggère que cette combinaison d'allèle est plus souvent présente chez les individus asthmatiques (cas). Par contre, chez les individus non asthmatiques (témoins), il ne semble pas y avoir d'interaction entre l'allèle « 2 » de IL4RA avec l'un ou l'autre des allèles de IL1B puisqu'ils sont aussi fréquents dans un cas comme dans l'autre (15 versus 16 fois). En ce qui concerne PPARG et IL4RA, la valeur *p* n'est pas significative mais peut être considérée comme suggestive (0,067). On observe un *odd ratio* de 0,36, ce qui suggère un effet protecteur de l'allèle normal de IL4RA. En ce qui concerne les résultats du Tableau VIII pour l'atopie, aucune valeur significative n'est observée, donc aucune interaction ne peut être montrée.

Tableau VIII : Analyse d'interaction entre les différents gènes pour l'atopie en considérant les parents de la cohorte comme des cas-témoins.

Gène A *	Gène B ** (exposition)	Parents Atopiques (cas)	Parents non Atopiques (témoins)	<i>Odd ratio</i>	Valeur <i>p</i>
IL4RA	IL1B (1 1)	21	18	0,8922	0,815
	IL1B (1 2 ou 2 2)	17	13		
IL4RA	IL4 (1 1)	29	22	1,1717	0,778
	IL4 (1 2 ou 2 2)	9	8		
PPARG	IL1B (1 1)	28	24	0,7000	0,406
	IL1B (1 2 ou 2 2)	25	15		
PPARG	IL13 (1 1)	25	24	0,5952	0,221
	IL13 (1 2 ou 2 2)	28	16		
PPARG	IL4 (1 1)	37	27	1,0767	0,877
	IL4 (1 2 ou 2 2)	14	11		
PPARG	IL4RA (1 1)	44	32	1,2222	0,709
	IL4RA (1 2 ou 2 2)	9	8		

* Les gènes A sont considérés lorsque l'allèle « 2 » est présent (i.e « 1 2 » ou « 2 2 »).

** « 1 1 » correspond à un génotype homozygote normal; « 1 2 » correspond à un génotype hétérozygote; « 2 2 » correspond à un génotype homozygote muté.

La troisième et dernière approche consiste en l'utilisation d'une analyse de régression linéaire. Afin de garder un degré de liberté assez bas, les gènes ont été considérés deux à deux pour l'asthme et l'atopie dont les résultats sont présentés dans les Tableaux IX et X respectivement. Dans ces tableaux, la diagonale indique la valeur p du gène A considéré seul (par exemple, la valeur p de IL13 est de 0,68). Pour vérifier l'existence d'une interaction, il faut que le gène A soit associé à la maladie (valeur $p < 0,10$). Dans le présent cas, seulement IL4R et PPARG pourront être testés. De cette manière, on peut vérifier l'effet du gène B sur la signification du gène A. Cet effet est mesuré avec la formule « $A + B + A * B$ » où $A * B$ est l'interaction entre les deux. Le modèle a été décrit par Mathieu Lemire (Lemire, 2004) et les résultats sont présentés pour l'effet additif, parce que pour l'effet dominant, ils sont similaires. Ainsi, plusieurs situations où le fait d'ajouter un second gène et un effet d'interaction au modèle de base améliorent de manière significative l'effet du premier locus.

Tableau IX : Analyse de régression linéaire pour tester l'interaction entre deux gènes (A et B) pour l'asthme.

A \ B	IL13	IL1B	IL4RA	IL4	PPARG
IL13	$p = 0,68$		+ B : $p = 1$ + B + A * B : $p = 0,34$		+ B : $p = 0,99$ + B + A * B : $p = 0,00010$
IL1B		$p = 0,4$	+ B : $p = 0,51$ + B + A * B : $p = 0,0066$		+ B : $p = 0,41$ + B + A * B : $p = 0,13$
IL4RA			$p = 0,083$		+ B : $p = 0,29$ + B + A * B : $p = 0,012$
IL4			+ B : $p = 0,87$ + B + A * B : $p = 0,053$	$p = 0,83$	+ B : $p = 0,98$ + B + A * B : $p = 0,04$
PPARG					$p = 0,015$

Si l'on considère IL4RA en premier lieu, les résultats du Tableau IX montrent l'effet du IL1B qui diminue la valeur p de départ du IL4RA (0,083 versus 0,0066). Concernant le PPARG, on peut remarquer que c'est IL13 qui a le plus d'effet étant donné

qu'il fait diminuer la valeur p de départ de 0,015 à 0,00010. Les effets de IL1B et de IL13 sur IL4RA et PPARG respectivement dans l'asthme sont significatifs et suggèrent l'interaction entre ces gènes.

De la même manière, on peut déduire les interactions pour l'atopie (Tableau X) entre IL4RA et IL1B ($p = 0,0088$) et entre PPARG et IL13 ($p = 0,00084$) et IL4RA ($p = 0,021$).

Tableau X : Analyse de régression linéaire pour tester l'interaction entre deux gènes (A et B) pour l'atopie.

A B	IL13	IL1B	IL4RA	IL4	PPARG
IL13	$p = 0,93$		+ B : $p = 0,95$ + B + A * B : $p = 0,48$		+ B : $p = 0,93$ + B + A * B : $p = 0,00084$
IL1B		$p = 0,17$	+ B : $p = 0,22$ + B + A * B : $p = 0,0088$		+ B : $p = 0,18$ + B + A * B : $p = 0,039$
IL4RA			$p = 0,083$		+ B : $p = 0,30$ + B + A * B : $p = 0,021$
IL4			+ B : $p = 0,54$ + B + A * B : $p = 0,073$	$p = 0,64$	+ B : $p = 0,73$ + B + A * B : $p = 0,042$
PPARG					$p = 0,043$

CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1 Analyse d'association

Les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'il n'existe aucune association entre l'asthme et l'atopie et la présence des polymorphismes ciblés pour les gènes IL4, IL4RA, IL13 et IL1B dans la cohorte étudiée, tel que démontré par les résultats du Tableau IV. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces absences d'association. D'abord, l'effectif de l'échantillon pourrait être insuffisant. Bien que la taille de la cohorte soit statistiquement puissante (avec une prévalence d'asthme de beaucoup supérieure à 15 % et des fréquences alléliques toutes supérieures à 2,5 % (Tableau III et Annexe B)), le nombre de trios participant aux analyses est relativement faible, étant en plus réduit selon les variants géniques et le phénotype étudiés (entre 65 et 118 dans le Tableau IV). Cette réduction de l'effectif (c'est-à-dire cette perte de trios informatifs) est attribuable à la nature du TDT qui nécessite la présence d'au moins un parent hétérozygote dans le trio pour qu'il soit utilisé dans le test. Cependant, selon les travaux de Lander et Kruglyak, un TDT doit reposer sur au moins 200 trios pour espérer mesurer une association avec une puissance statistique significative (Lander et Kruglyak, 1995) et la cohorte étudiée correspond à la base à cette recommandation. Dans un autre ordre d'idée, la structure génétique particulière de la population du SLSJ (population dite à effet fondateur) pourrait faire en sorte que les gènes associés à l'asthme dans les autres populations ne soient pas les mêmes au SLSJ. Ober et collègues soulignaient à cet effet que les SNPs associés aux maladies diffèrent selon les populations et leur histoire naturelle ou leur structure génétique (Ober et al., 2000). Une autre explication logique à ces absences d'association concerne la sélection de SNPs. En

effet, les SNPs choisis pourraient ne pas être suffisants à eux seuls ou être en déséquilibre de liaison avec d'autres SNPs. Advenant un tel cas, une analyse haplotypique pourrait être plus concluante pour trouver des associations positives. C'est ce que concluent les travaux de Risma et collègues (2002) lorsqu'ils démontrent que des altérations fonctionnelles dans le IL-4R α requièrent la coexistence de deux SNPs en combinaison; ni l'un ni l'autre de ces SNPs n'étant suffisant lorsque présent de façon isolée (Risma et al., 2002).

La seule association positive dans la cohorte concerne le SNP Pro12Ala de PPARG avec l'asthme et l'atopie (Tableaux IV et V), ce qui représente une nouveauté dans l'asthme, car aucune étude jusqu'à présent n'a montré l'association entre PPARG et l'asthme ou ses phénotypes reliés.

5.1.1 *IL4*

La sélection du gène IL4 a été motivée par plusieurs raisons, telle sa surexpression dans la muqueuse bronchique des patients asthmatiques (Humbert et al., 1996), pour les travaux génétiques et fonctionnels que l'on retrouve abondamment dans la littérature ou pour valider les études d'association génétique antérieures. L'allèle muté du SNP C-589T du gène IL4 n'est pas associé à l'asthme ($p = 0,8348$) ni à l'atopie ($p = 0,6419$) dans la cohorte étudiée. Ces résultats ne permettent pas de confirmer les associations observées dans d'autres populations comme celles de Noguchi et Burchard et leurs collègues respectifs (Noguchi et al., 1998; Burchard et al., 1999), mais permettent de se rallier aux autres études où ce variant de l'IL4 n'a pas été associé à l'asthme ou à ses phénotypes reliés (Walley et Cookson, 1996; Graves et al., 2000; Heinzmann et al., 2000).

Dans la plupart des études d'association rapportées, l'allèle muté du gène IL4 est associé à une augmentation de l'expression du gène (Noguchi et al., 1998). L'explication serait que la dite mutation (C-589T) favoriserait l'activité du promoteur afin de permettre la surproduction d'IL-4 dans les différents tissus (Kawashima et al., 1998). Ainsi, on pourrait

déduire que cette mutation serait responsable de la surproduction d'IL-4 observée dans les tissus bronchiques de sujets asthmatiques (tel que décrit par Humbert et al. (1996) par exemple). Il est possible que la mutation C-589T soit suffisante, mais non nécessaire à une surexpression d'IL-4 dans le tissu bronchique d'asthmatique. Des études génétiques haplotypiques utilisant d'autres SNPs et des études fonctionnelles supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer le rôle exact du IL-4 dans l'asthme et aussi, afin de confirmer si ce gène est réellement un gène de susceptibilité à l'asthme.

5.1.2 *IL4RA*

La principale motivation dans la sélection du gène *IL4RA* repose sur son rôle dans la signalisation cellulaire, suite à l'attachement de ses ligands naturels, IL-4 et IL-13, qui stimulent l'inflammation allergique (Risma et al., 2002). Dans la présente étude, le variant S436L du gène *IL4RA* n'est pas associé à l'asthme ($p = 0,08$) ni à l'atopie ($p = 0,0796$) au SLSJ bien que les valeurs p pourraient indiquer une certaine tendance (près du seuil d'acceptation 0,05). Ces résultats ne permettent pas de conclure que l'*IL4RA* est un gène de susceptibilité dans l'asthme et ne permettent pas non plus d'appuyer l'association de Beghé et collègues avec les SNPs I50V et Q576R du *IL4RA* (Beghe et al., 2003). Il se pourrait que le S436L ne soit pas suffisant à lui seul pour induire le développement de la maladie, mais ceci pourrait être possible s'il était en déséquilibre de liaison avec un ou plusieurs autres SNPs (des analyses haplotypiques seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse).

Des études suggèrent que l'activité altérée du récepteur IL-4R α dans les cellules bronchiques de sujets asthmatiques peut être due à différents SNPs ou à une combinaison de SNPs dans le gène *IL4RA* (Kruse et al., 1999; Wang et al., 1999; Ober et al., 2000). Les altérations dans le gène codant pour l'IL-4R α qui résultent en l'augmentation de la capacité de signalisation peuvent avoir un effet majeur sur la réponse immunitaire étant donné que ce récepteur est nécessaire dans la signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13 (Wills-Karp, 2000). Plusieurs SNPs codants ont été identifiés (Ober et al., 2000; Hackstein et al., 2001) et

seraient responsables d'altérations structurales dans la région extracellulaire de l'IL-4R α (Deichmann et al., 1997; Shirakawa et al., 2000). Ces altérations résulteraient en une plus grande activité du signal de transduction, comme ce qui est observé pour les SNPs Ile50Val (Nelms et al., 1999) ou Q576R (Hershey et al., 1997) du gène IL4RA, favorisant la réponse inflammatoire. Ces altérations pourraient aussi se manifester en une plus faible capacité de signalisation du récepteur, ce qui pourrait avoir un effet protecteur (hypothèse à vérifier). Chez les sujets asthmatiques et atopiques, la valeur Z est positive, ce qui signifie que l'allèle muté est plus fréquent chez ces individus et suggère une plus grande activité de signalisation provoquée par le SNP S436L tout comme les autres SNPs déjà identifiés (Ile50Val et Q576R). Des études génétiques supplémentaires (comme des analyses haplotypiques) et des études fonctionnelles (comme l'immunohistochimie ou l'hybridation *in situ*) qui caractériseraient la distribution et le rôle du IL-4R α (et de ses polymorphismes) dans les tissus bronchiques de sujets asthmatiques sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse.

5.1.3 *IL13*

Dans l'asthme, plusieurs études rapportent un niveau élevé d'IL-13 dans le tissu pulmonaire et ce, avec ou sans présence d'atopie (Humbert et al., 1997; Naseer et al., 1997). Les rôles biologiques de cette cytokine sont nombreux et semblables à l'IL-4, ce qui suggère également son implication dans l'inflammation et permet de le considérer comme un bon gène candidat pour l'asthme et l'atopie. L'accumulation des évidences biologiques dans la pathogénèse de l'asthme ainsi que les associations génétiques supportent l'IL-13 comme un agent important dans la promotion de l'asthme bronchique chez l'humain (Wills-Karp, 2000). Bien qu'il existe une association entre des SNPs du promoteur de l'IL13 et un risque accru de développer de l'asthme allergique (van der Pouw Kraan et al., 1999; Heinzmann et al., 2000), les présents résultats (Tableau IV) ne permettent pas de confirmer ces observations ($p = 0,6800$ pour l'asthme et $p = 0,9276$ pour l'atopie). Le SNP (C+2525T) sélectionné pour cette étude est situé dans la région 3'UTR, région pour

laquelle des travaux ont montré qu'un SNP pourrait influencer positivement ou négativement le niveau d'expression du gène (au même titre que dans le promoteur) (Dreyfuss et al., 1996). Ce SNP augmenterait ou diminuerait l'expression du gène IL13 dans le tissu asthmatique (hypothèse à vérifier).

5.1.4 *IL1B*

L'IL-1 β est une cytokine inflammatoire (Hogquist et al., 1991), surexprimée dans les muqueuses bronchiques d'asthmatiques (Mitsuyasu et al., 1999) et dont les rôles biologiques sont des événements de régulation, d'expression, de synthèse et de sécrétion de gènes (Dinarelo, 1996). Les résultats du Tableau IV montrent que le gène IL1B n'est pas associé à l'asthme ($p = 0,4014$) ni à l'atopie ($p = 0,1691$), ce qui écarte ce gène en tant que gène de susceptibilité à l'asthme dans la cohorte étudiée du SLSJ.

D'après les travaux de Pociot et collègues, le SNP C+3953T a une influence sur le niveau d'expression de l'IL-1 β dans les cellules mononucléées périphériques bien qu'il ne soit pas codant (Pociot et al., 1992). Dans la présente étude, il n'est pas possible de confirmer ces observations, étant donné que le SNP n'est pas associé. On ne peut donc pas émettre des hypothèses quant au rôle possible de cette mutation dans l'asthme. L'allèle muté pourrait aussi bien être responsable d'une surproduction que d'une sous-production d'IL-1 β dans le tissu bronchique des individus asthmatiques. Des études génétiques et fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires afin de s'assurer de trouver d'autres SNPs qui pourraient, par exemple, être associés ou en déséquilibre de liaison avec C+3953T afin de permettre de soutenir la candidature de IL1B en tant que gène candidat à l'asthme ou à l'atopie.

5.1.5 *PPARG*

La sélection du gène PPARG a été motivée sur la base de son expression dans les macrophages et les cellules épithéliales des voies respiratoires (Huang et al., 1999; Wang et al., 2001; Yang et al., 2002) et pour son rôle d'agent anti-inflammatoire dans des maladies

à composante inflammatoire (Chinetti et al., 2000). Les résultats des Tableaux IV et V montrent une association positive entre la présence de l'allèle 12A1a de PPARG et l'asthme ($p = 0,0159$) et une valeur suggestive pour l'atopie ($p = 0,0415$). Cette association se traduit par une fréquence plus élevée de l'allèle muté chez les sujets asthmatiques et atopiques (valeurs Z positives) signifiant que l'allèle muté est plus souvent transmis chez les individus asthmatiques (ou atopiques) que ceux non atteints.

Bien que PPAR γ fut décrit comme un facteur d'importance dans les maladies lipidiques (diabète de type 2, sensibilité à l'insuline) (Deeb et al., 1998; Altshuler et al., 2000) et initialement associé à une augmentation du degré d'obésité (Beamer et al., 1998), de plus en plus de travaux montrent les implications physiologiques du PPAR γ dans les maladies à composantes inflammatoires, comme la régulation de l'inflammation (Mueller et al., 2003; Trifilieff et al., 2003), l'infiltration des éosinophiles (Woerly et al., 2003) ou le remodelage bronchique (Benayoun et al., 2001). Toutefois, aucune étude à ce jour n'a montré une association génétique entre PPARG et l'asthme, peu importe la population. Cette étude, à notre connaissance, est donc la première à considérer le gène de PPAR γ comme un candidat potentiel et de surcroît, la première à trouver une association positive avec l'asthme et l'atopie.

Des études fonctionnelles additionnelles sont nécessaires pour déterminer le rôle exact de la mutation dans la physiopathologie de l'asthme. Il faudrait également valider cette association dans d'autres cohortes et tester d'autres SNPs afin de voir si Pro12A1a a un impact réel sur la maladie ou s'il est en déséquilibre de liaison avec un autre SNP situé dans la région promoteur de ce gène. Cependant, en se basant sur les études fonctionnelles effectuées avec PPAR γ qui montrent son rôle anti-inflammatoire (Jiang et al., 1998; Yang et al., 2000), l'étude qui montre que ce SNP cause des altérations significatives au niveau de la protéine (Yen et al., 1997) et les conclusions des études d'association effectuées avec d'autres maladies comme le diabète de type 2 (Deeb et al., 1998; Altshuler et al., 2000), l'allèle muté de PPARG résulterait en la perte de capacité « anti-inflammatoire » ou

« protecteur » de son récepteur nucléaire. Autrement dit, la mutation 12A1a causerait la perte d'efficacité du récepteur (perte d'effet inhibiteur), ce qui permettrait aux facteurs de transcription des médiateurs inflammatoires de s'activer, à l'inflammation d'avoir lieu et par conséquent, favoriser le développement de l'asthme. Ces résultats observés dans la population du SLSJ permettent de conclure que le gène PPARG serait un gène de susceptibilité à l'asthme, car les individus porteurs de l'allèle muté sont asthmatiques comparativement à ceux qui ont l'allèle normal qui ne le sont pas. Les études génétiques ultérieures dans d'autres populations renseigneront quant à la spécificité de cette association, à savoir si elle n'existe qu'au SLSJ ou si elle peut être transposée à la population générale québécoise. Par ailleurs, de tels résultats pourraient avoir des avenues intéressantes dans la recherche pharmacologique du traitement de l'asthme par exemple, où PPAR γ pourrait être considéré comme une cible anti-inflammatoire potentielle.

Bref, compte tenu qu'au moins une association positive a été trouvée, le premier objectif de l'étude a été atteint, permettant la poursuite du deuxième objectif, à savoir l'analyse des interactions possibles entre ces gènes.

5.2 Analyse d'interaction

Cette analyse d'interaction a été effectuée avec les mêmes SNPs sélectionnés pour l'analyse d'association à l'intérieur des mêmes gènes candidats. Étant donné le caractère complexe de cette analyse, trois approches statistiques ont été utilisées. La comparaison et l'interprétation ainsi que les interactions qu'elles ont pu fournir feront l'objet des prochaines sous-sections.

5.2.1 Comparaison entre les trois méthodes d'analyses statistiques

Les trois approches présentées ont toutes le même but, c'est-à-dire trouver les interactions plausibles sur la base des connaissances physiopathologiques relatives à l'asthme afin d'ultimement développer le meilleur outil dans les analyses d'interaction gène-gène dans les trios familiaux et les analyses multigènes. Les approches utilisées

avaient toutes leurs limitations comme le fait de considérer les SNPs en tant que combinaison d'allèles au lieu qu'en tant qu'haplotype pour FBAT, de créer un cohorte cas-témoins à partir d'individus apparentés pour les *odds ratio* ou d'utiliser les *pseudotémoins* pour l'analyse de régression.

En dépit de ces limitations, les analyses d'interaction révèlent des interactions positives (présentées dans le Tableau XI) pour chaque approche.

Tableau XI : Tableau récapitulatif des interactions trouvées selon les approches statistiques employées.

Interaction	Approche		FBAT		Odd ratio		Régression linéaire	
	Asthme	Atopie	Asthme	Atopie	Asthme	Atopie	Asthme	Atopie
PPARG / IL13	X	X					X	X
PPARG / IL4RA	X	X						X
IL4RA / IL1B	X	X	X				X	X
IL4RA / IL4		X					X	X

Plusieurs affirmations peuvent être émises en regard des résultats obtenus des trois types d'analyses employées dans la présente méthode statistique. Ainsi, les analyses sont : 1) efficaces, puisqu'elles ont permis de trouver des interactions statistiquement significatives; 2) fiables, puisque deux approches sur trois ont mis en évidence les mêmes interactions et; 3) concluantes, puisqu'elles auront permis de trouver des interactions logiques, explicables à un niveau physiologique et conséquentes aux études d'associations.

Si les analyses d'interaction étaient à refaire, la question serait de savoir quelle approche utiliser ou combien en utiliser? Faut-il en sélectionner une au détriment d'une autre? Dans l'état actuel des résultats, il est permis de conclure que l'utilisation du logiciel FBAT combinée à une analyse de régression multiple est la plus efficace, car ces deux approches mettent en lumière les mêmes interactions. Quant à l'approche utilisant le *odd*

ratio, elle est probablement trop « restrictive », car elle ne permet pas la détection de toutes les interactions trouvées par les deux autres approches.

Quoi qu'il en soit, cette approche statistique variée et exploratoire est avant tout comme un début de réflexion sur la méthode à employer dans la recherche d'interactions gène-gène dans l'asthme, spécialement pour les cohortes familiales comme celle de la présente étude. D'après les résultats, aucune conclusion définitive ne peut être apportée car, statistiquement, le modèle d'analyse proposé n'est pas encore validé. Toutefois, ce dernier a permis d'observer des interactions logiques et significatives, qui peuvent s'expliquer à un niveau physiologique, et d'ouvrir la voie au développement des modèles mathématiques dans ce domaine de recherche sur la génétique de l'asthme.

5.2.2 Interactions possibles entre les différents gènes candidats

Les interactions retrouvées concernent surtout l'IL4RA avec l'IL1B ou l'IL4 et le PPARG avec l'IL13 ou l'IL4RA, car elles sont les seules à présenter une meilleure signification statistique. La mise en évidence de ces interactions repose sur les situations où la valeur p d'association de l'IL4RA ou de PPARG est modifiée, voire améliorée, par l'ajout d'un deuxième gène. Cette restriction fait partie de notre interprétation et nous permet d'éliminer des interactions significatives qui ne le sont pas réellement. Par exemple, PPARG seul est associé à 0,015 et lorsqu'on lui ajoute IL4, la valeur p reste à 0,0198. La valeur p est significative, certes, mais identique (ou presque) à celle de PPARG. On ne considère donc pas ces situations comme des interactions plausibles. Cette manière d'interpréter a été utilisée pour tous les résultats d'interaction, peu importe le type d'analyse statistique.

Des interactions hypothétiques proposées dans le Chapitre 3, seulement quelques-unes ont pu être rapportées dans nos analyses et d'autres non envisagées au départ sont apparues, comme celles IL4RA et IL1B, faisant émettre de nouvelles hypothèses.

PPARG-IL13

Pour ces deux gènes, on remarque que la combinaison de l'allèle muté « 2 » de PPARG et de l'allèle normal « 1 » de IL13 est plus souvent transmise (valeur Z positive) chez les probants asthmatiques ($p = 0,0026$) et atopiques ($p = 0,0149$) (Tableau VI). L'analyse de régression montre également une interaction significative pour l'asthme ($p = 0,0001$) et pour l'atopie ($p = 0,0008$) (Tableaux IX et X), suggérant une forte interaction entre ces deux gènes. L'explication physiologique de cette relation pourrait être que dans l'asthme, lorsque PPARG est muté, il y a perte d'efficacité du récepteur résultant en la perte d'activité anti-inflammatoire (Deeb et al., 1998) et que l'allèle normal de IL13 favorise le processus inflammatoire (Wills-Karp, 2000). Donc, IL13 favorisant l'activité inflammatoire et PPARG permettant l'inflammation (en raison de sa perte d'activité anti-inflammatoire), cette interaction mènerait à une augmentation de l'inflammation contribuant à l'asthme. Cependant, cette hypothèse simpliste reste à être confirmée et raffinée par des études fonctionnelles, tout comme l'interaction génétique, qui d'ailleurs, devra être validée dans la cohorte totale du SLSJ ($n = 1700$ sujets) et ultimement, dans d'autres populations.

PPARG-IL4RA

Pour ces deux gènes, on remarque que ce sont les deux allèles normaux « 1 » mis ensemble qui sont associés à l'asthme ($p = 0,0053$) et à l'atopie ($p = 0,0140$) (Tableau VI). La présence des allèles normaux de ces deux gènes est moins fréquente chez les sujets asthmatiques et atopiques (valeurs Z négatives), ce qui suppose un effet protecteur de cette interaction. En effet, si chez les sujets asthmatiques l'on retrouve moins souvent l'allèle normal « anti-inflammatoire » de PPARG et l'allèle normal de IL4RA, cela voudrait dire que chez les sujets non asthmatiques, la présence des allèles normaux serait plus fréquente et les protégerait contre le développement de l'asthme. Cette réflexion doit être confirmée par des études génétiques supplémentaires qui évalueraient si chez les sujets non

asthmatiques, les allèles normaux sont effectivement plus fréquents. Si tel est le cas, cela voudrait dire que chez les sujets asthmatiques, les allèles mutés sont les plus fréquents. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait effectuer ces analyses d'interaction sur des cohortes de milliers de sujets (provenant de la mise en commun de cohortes de sujets asthmatiques déjà existantes, par exemple). De cette manière, il serait possible d'augmenter les chances d'obtenir un nombre suffisant de sujets asthmatiques porteurs à la fois des deux allèles mutés (car dans la cohorte actuelle, ces individus doubles porteurs pour PPARG et IL4RA sont très rares et ne permettent pas d'effectuer les analyses).

Concernant l'analyse effectuée avec le *odd ratio*, elle concerne cette fois-ci l'allèle muté de PPARG et l'allèle normal de IL4RA avec un *odd ratio* de 0,3598. Si on l'inverse pour que le facteur de risque soit l'allèle muté du IL4RA au lieu de l'allèle normal, on se retrouve avec un *odd ratio* de 2,78 (en effectuant CB/AD). Ce qui indique que la combinaison des deux allèles mutés de PPARG et IL4RA serait associée au développement de l'asthme au SLSJ et supporterait l'hypothèse de l'effet protecteur des allèles normaux de l'interaction trouvée avec FBAT chez les non asthmatiques. Il faudrait toutefois refaire cette analyse en tenant compte de l'allèle normal de PPARG et l'allèle normal de IL4RA pour supporter complètement cette hypothèse.

IL4RA-IL1B

IL4RA tout seul n'est pas associé à l'asthme ni à l'atopie ($p = 0,0801$ et $0,0796$) tout comme IL1B tout seul ne l'est pas non plus ($p = 0,04014$ et $0,1691$) (Tableau IV), mais pris ensemble (c'est-à-dire l'allèle muté « 2 » de IL4RA et l'allèle normal « 1 » de IL1B), les valeurs p deviennent significatives pour les deux phénotypes ($0,0185$ et $0,0378$ respectivement pour l'asthme et l'atopie) (Tableau VI). Le *odd ratio* corrobore ces résultats pour l'asthme ($p = 0,034$) (Tableau VII) et l'analyse de régression corrobore pour l'asthme ($p = 0,0066$) et l'atopie ($p = 0,0088$) (Tableaux IX et X). Comment expliquer leur relation? En fait, selon l'hypothèse que l'allèle muté de IL4RA altérerait probablement la

conformation du récepteur (Shirakawa et al., 2000) (ce qui augmenterait ou diminuerait l'activité de signalisation intracellulaire), la relation physiologique du IL4RA avec le IL1B n'est pas nécessairement une relation de cause à effet. Autrement dit, l'hypothèse stipule qu'une mutation au niveau du gène du récepteur IL-4R α augmenterait la signalisation intracellulaire, ce qui provoquerait la transcription et la synthèse de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires, dont l'IL-1 β , et que l'allèle normal de ce gène est simplement un marqueur témoignant de la présence de cette cytokine dans cette voie biologique. En regard de cette hypothèse et en se rapportant aux schémas présentant les différentes interactions hypothétiques dans l'asthme (Figures 1, 2 et 3), on peut remarquer que si ces deux gènes sont vraiment en interaction dans une même cascade physiopathologique, tous les gènes présentés seraient dans la même cascade. Étant donné que l'IL4RA est impliqué en début de cascade et que l'IL-1 β est le résultat final ou la conséquence, cette interaction engloberait donc plusieurs autres aspects et gènes, ce qui pourrait être vérifié en effectuant d'autres analyses d'interactions multigènes.

IL4RA-IL4

Ces gènes pris individuellement ne sont pas associés mais en modèle additif, ils sont associés à l'atopie ($p = 0,0153$) (Tableau VI). L'analyse de régression montre également cette interaction pour l'asthme ($p = 0,053$) et pour l'atopie ($p = 0,073$) (Tableaux IX et X). Cette interaction était attendue compte tenu de leur relation physiologique très étroite (Figure 1), de l'importance de cette cytokine Th2 dans l'atopie et du fait que l'attachement du IL-4 à son récepteur déclenche la commutation des IgM en IgE dans les lymphocytes B (Rosenwasser, 1997). De la même manière, les analyses pour l'IL13 et l'IL4RA n'ont montré aucune association concernant ces deux gènes (Tableau XII, Annexe D), laissant supposer que l'IL-13 a peut-être plus d'affinité avec la chaîne IL-13R α du récepteur que la chaîne IL-4R α (hypothèse à vérifier). Par ailleurs, l'allèle muté « 2 » de IL4RA en compagnie de l'allèle normal « 1 » de IL4 sont associés à l'atopie. Physiologiquement, cette observation pourrait s'expliquer par le fait que la mutation codante du gène IL4RA

provoque une altération dans l'activité du récepteur, laquelle augmenterait la transcription et la production de médiateurs inflammatoires (via la cascade de signalisation intracellulaire JAK-STAT). Cette action serait déclenchée par l'attachement du IL-4 à son récepteur, dont l'allèle normal « 1 » désignerait qu'en présence d'un niveau physiologique « normal » d'IL-4, une mutation dans le récepteur peut provoquer un déséquilibre dans la production de médiateurs pro-inflammatoires, favorisant l'installation de l'inflammation et ultimement, le développement de l'asthme symptomatique. D'autres études génétiques sont nécessaires pour valider cette interaction et des études fonctionnelles seraient nécessaires pour valider l'hypothèse de leur relation physiologique.

Les analyses d'interaction entre deux gènes effectuées dans le cadre de ce projet de maîtrise, ne permettent pas de confirmer des relations déjà documentées comme celle entre les gènes IL4RA et IL13 (Howard et al., 2002) ou celle entre les protéines PPAR γ et IL-4 (Wang et al., 2001). En comparant les caractéristiques de l'étude de Howard et collègues à la présente étude, l'on peut voir des différences majeures entre les deux qui expliqueraient pourquoi nous n'avons pas pu confirmer cette interaction entre IL4RA et IL13. D'abord, les sujets participants à l'étude sont originaires de la Hollande (population qui n'est pas reconnu comme étant une population dite à effet fondateur comme celle du SLSJ) et forment une cohorte de 400 individus qui consiste en un « vrai » cas-témoins (200 probants asthmatiques et leur conjoint). Ensuite, le critère d'évaluation pour l'HRB est une $CP_{20} \leq 32$ mg/ml (tandis que pour la présente étude, il est plus restrictif avec une $CP_{20} \leq 8$ mg/ml). Concernant les analyses statistiques, l'analyse d'association a été effectuée avec une analyse de régression multiple (pour la présente étude, c'est le logiciel FBAT). Pour ce qui est de l'analyse d'interaction gène-gène, elle a été effectuée à l'aide d'un « vrai » *odd ratio* (c'est-à-dire non modifié tel que présenté dans la Figure 6) dont la valeur p (0,0004) est très significative (Howard et al., 2002). Comme cette étude est actuellement l'une des seules publiées sur les interactions gène-gène, il n'est pas possible de comparer les résultats étant donné toutes les différences entre les deux. Néanmoins, notre méthode statistique aura

permis de trouver et de suggérer certaines pistes d'interactions (Tableau XI), ce qui contribue certainement à l'atteinte du deuxième objectif.

5.3 Interprétation générale de l'étude

À la lumière de tous les résultats, on se rend compte que les analyses d'association et d'interaction effectuées chez des sujets asthmatiques de la population du SLSJ ont permis l'atteinte des objectifs de l'étude tout en contribuant à l'avancement des connaissances. Désormais, les interactions entre les gènes doivent être considérées dans la recherche de déterminants génétiques dans l'asthme, ce qui supporte les travaux de Barnes sur l'importance des interactions gène-gène dans l'asthme (Barnes, 1999).

De manière générale, les points faibles de cette étude pourraient reposer avant tout sur l'absence d'outil statistique validé dans l'étude des trios familiaux pour appuyer nos analyses d'interaction. Plusieurs approches ont été employées, mais aucune n'a montré de résultats permettant de conclure hors de tout doute quant aux interactions trouvées. Ceci pourrait s'expliquer par le petit effectif disponible pour chaque approche tentée. Bien que la cohorte comporte 600 individus au total (ce qui en soit est statistiquement puissant, Annexe B), dans certaines analyses, comme le *odd ratio* (Tableaux VII et VIII), un minimum de 37 cas et de 30 témoins ont servi pour les analyses. C'est ce que l'on entend par petit effectif, nettement insuffisant pour atteindre des puissances statistiques significatives. En effet, comme il a été vu plus tôt, de petits effectifs peuvent souvent être combinés à une perte de puissance statistique, à une diminution des chances de trouver des associations ou des interactions positives (Lander et Kruglyak, 1995) et à l'impossibilité d'effectuer des analyses d'interaction multigènes (trois gènes et plus à la fois). Par conséquent, il faudra attendre des cohortes de milliers de sujets pour atteindre les puissances statistiques significatives souhaitées dans la recherche des interactions gène-gène pour l'asthme. Un autre point faible à souligner concerne le choix des gènes candidats, basé en majeure partie sur les études génétiques et fonctionnelles antérieures que l'on retrouve dans la littérature

pour d'autres cohortes que celle du SLSJ. Cette méthode de sélection a permis de trouver une seule association positive avec PPARG. Éventuellement, il faudra sélectionner les gènes sur d'autres bases, comme pour leur patron d'expression dans les tissus bronchiques de sujets asthmatiques originaires du SLSJ. Finalement, il faudra effectuer des analyses haplotypiques, car elles offrent plus de chances de trouver des associations positives avec les gènes candidats sélectionnés. Par conséquent, les chances de trouver des interactions positives entre les gènes associés seront augmentées.

Bien que la méthode statistique des analyses d'interaction gène-gène ne soit pas validée parce qu'exploratoire, de nombreux points positifs ressortent de cette étude comme la découverte d'une nouvelle association génétique entre l'asthme et le gène PPARG puis l'identification d'interactions gène-gène intéressantes pour l'asthme. De manière plus spécifique, les points forts de cette étude concernent d'abord l'emploi d'une cohorte familiale originaire d'une population dite à effet fondateur. D'ailleurs, plusieurs autres populations de ce type sont actuellement utilisées dans d'autres études génétiques de maladies communes et les avantages de leur utilisation sont bien connus (Lander et Schork, 1994; Peltonen et al., 2000; Ober et al., 2001). Citons à titre d'exemple, le fait qu'une population dite à effet fondateur permet d'obtenir des fréquences alléliques équivalentes à celles d'une population générale et ce, avec un plus petit échantillonnage et les mêmes puissances statistiques, tel qu'il a été démontré par les travaux de Newman et collègues (Newman et al., 2004). Sur la base de ces travaux, des associations significatives au SLSJ pourraient être extrapolées à l'ensemble de la population québécoise, par exemple. Un autre point fort que l'on doit mentionner est la qualité des données génotypiques et phénotypiques. En effet, le génotypage est appuyé par des pourcentages de réussite très élevés ainsi que l'atteinte de l'équilibre de Hardy-Weinberg, et les données phénotypiques reposent sur des critères très stricts, précis, reproductibles et plusieurs fois vérifiés. Finalement, la plus grande force de cette étude est qu'elle est l'une des premières à considérer l'importance des interactions gène-gène dans la recherche de déterminants génétiques pour l'asthme. Ainsi, elle aura permis de suggérer des pistes d'analyses pour y

arriver, en plus de permettre l'avancement des connaissances, l'émission de nouvelles hypothèses et surtout, de nouvelles perspectives de recherche.

5.4 Perspectives

Pour le gène PPAR γ , qui est associé à l'asthme, les étapes subséquentes à une telle découverte sont: 1) de valider cette association génétique dans la cohorte entière et ensuite dans d'autres populations; 2) de caractériser le gène par des analyses de séquence; 3) d'effectuer les études fonctionnelles afin de déterminer le rôle exact de la mutation et les différences dans les statuts de porteurs de cette mutation et ultimement; 4) d'effectuer des études pharmacologiques afin de voir si ce récepteur nucléaire est une cible thérapeutique potentielle dans le développement de médicaments anti-inflammatoires. Dans l'asthme, le PPAR γ commence à peine à être connu, mais son association est encourageante et à long terme, pourrait servir à toute la communauté de cliniciens et de scientifiques.

Une autre étape concerne les prochaines analyses d'association. Les gènes seront choisis de la même manière, c'est-à-dire pour leur implication pathophysiologique connue dans l'asthme, pour leur localisation dans des régions chromosomiques liées à l'asthme ou à ses conditions cliniques et pour leur expression dans les tissus bronchiques d'asthmatiques telle que démontrée par des études d'expressivité réalisées avec des puces à ADN (Laprise et al., 2004). L'emploi des analyses haplotypiques sera également priorisé afin d'augmenter les chances de trouver des associations positives. Finalement, pour effectuer ces études, l'effectif de la cohorte de trios devra être augmenté (d'ailleurs, le recrutement est toujours en cours au SLSJ). Idéalement, une cohorte de milliers de sujets serait un atout dans les études d'association pour l'asthme. À cet effet, l'étude canadienne sur la prévention de l'asthme, qui a pour objectif de trouver des déterminants génétiques impliqués dans l'asthme, regroupe les cohortes de différents chercheurs qui oeuvrent dans ce domaine pour former une grande cohorte d'envergure nationale. Les cohortes regroupées sont formées de sujets provenant de Vancouver (Drs Peter Paré et Moira Chan-Yeung), de

Winnipeg (Drs Allan Becker et Kent Hayglass) ainsi que du SLSJ (Drs Catherine Laprise et Thomas Hudson) et totalisent plus de 4000 individus.

D'autres avancées possibles reliées à cette étude concernent les prochaines analyses d'interactions gène-gène. En fait, il faudra sélectionner d'autres gènes candidats potentiellement en interaction avec les présents gènes. Par exemple, il a été noté dans la revue de la littérature que plusieurs gènes sont importants dans la voie biologique impliquant le PPARG. On n'a qu'à penser à tous les facteurs de transcription (STAT-6, AP-1, NFAT), au récepteur de l'acide rétinoïque qui forme l'hétérodimère avec PPAR γ , aux enzymes impliquées (comme la lipooxygénase ou les kinases) ou même à ses ligands (métabolites des prostaglandines). Tous ces gènes seraient très prometteurs, car ils sont directement reliés au PPARG et nous croyons que cette voie est très intéressante à analyser d'autant plus que non connue, ce qui augmente son intérêt. D'autre part, il ne faut pas oublier les gènes qui ont déjà été associés à l'asthme dans la population du SLSJ, comme le récepteur de la vitamine D (VDR) (Poon et al., 2004) ou le récepteur de la fractalkine (CX3CR1) (manuscrit en préparation). Étant donné leur association, il sera approprié de vérifier leurs interactions avec les gènes compris dans leur voie biologique respective.

Les prochains travaux sur les interactions gène-gène permettront de regrouper les gènes qui interagissent entre eux pour favoriser l'évolution de l'asthme, certes, mais ils reposeront avant tout sur le développement et la validation d'outils statistiques adaptés aux cohortes de trios familiaux. Les résultats de la présente étude sont encourageants, car en plus d'avoir mis en évidence des interactions physiologiques logiques et significatives, ils constituent un premier pas dans cette voie de recherche, laquelle sera sûrement utile aux chercheurs (précisément les mathématiciens et les biostatisticiens) qui oeuvrent dans l'élaboration de ces dits outils statistiques.

Finalement, bien que l'accent n'ait pas été mis sur les facteurs environnementaux pour ce travail, leur importance est fondamentale dans le développement du trait complexe

que représente l'asthme. À cette effet, il faudra effectuer des analyses d'interaction gène-environnement afin de mesurer l'impact que représente leur exposition. Par exemple, quel est l'effet de l'exposition aux allergènes domestiques chez des probants asthmatiques lorsqu'ils sont porteurs de variants associés à l'asthme dans un gène associé à la maladie. Des modèles statistiques validés seront également nécessaires dans cette avenue de recherche.

CONCLUSION

En conclusion, étant donné la nature complexe de l'asthme qui implique des facteurs génétiques et environnementaux dans son développement, une analyse d'association avec cinq gènes candidats à l'asthme a été conduite dans une cohorte d'individus originaires de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean reconnue comme une population dite à effet fondateur. Les résultats ont montré une association positive avec le PPARG pour l'asthme et l'atopie, ce qui a permis d'atteindre le premier objectif de l'étude. Par la suite, une analyse d'interaction a été conduite avec ces mêmes gènes afin de voir s'il existe une relation génétique entre eux. Les résultats de cette analyse reposent sur une méthode statistique exploratoire qui a permis de montrer quelques interactions possibles entre le PPARG et l'IL13 ou l'IL4RA et entre l'IL4RA et l'IL1B ou l'IL4. Ces résultats ont permis l'atteinte du deuxième objectif de l'étude.

Ces travaux de recherche exploratoire mènent à des perspectives intéressantes dans la poursuite de cette étude. Les résultats pourront être utiles dans l'avancement des travaux sur la génétique de l'asthme et ouvrent la voie à une meilleure caractérisation de son histoire naturelle. Même si beaucoup de travaux sont encore nécessaires en ce sens afin de comprendre les mécanismes pathophysiologiques qui sous-tendent la maladie, l'objectif ultime visé est toujours de préciser sa définition et d'améliorer les conditions de vie des individus asthmatiques. La découverte de gènes de susceptibilité à l'asthme permettra certainement une meilleure prévention, un meilleur diagnostic et un meilleur traitement, lesquels seront éventuellement axés sur les prédispositions génétiques de chacun à développer de l'asthme.

BIBLIOGRAPHIE

Articles et ouvrages scientifiques

- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L et Lander ES. 2000. **The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes.** *Nat Genet* Sep;26(1):76-80.
- American Thoracic Society. 1987. **Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma.** *Am Rev Respir Dis* 136 (1) : 225-44.
- American Thoracic Society. 1995. **Standardization of Spirometry, 1994 Update.** *Am J Respir Crit Care Med* 152 : 1107-1136.
- Anderson GG et Cookson WO. 1999. **Recent advances in the genetics of allergy and asthma.** *Mol Med Today* Jun 5:264-273.
- Asada K, Sasaki S, Suda T, Chida K et Nakamura H. 2004. **Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages.** *Am J Respir Crit Care Med* 169:195-200.
- Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, Strachan D, Weiland SK et Williams HC. 1995. **International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods.** *Eur Respir J* 8:483-491.
- Barnes KC. 1999. **Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy.** *Clin Exp Allergy*. Dec; 29 Suppl 4: 47-51.
- Barnes KC, Freidhoff LR, Nickel R, Chiu YF, Juo SH, Hizawa N, Naidu RP, Ehrlich E, Duffy DL, Schou C, Levett PN, Marsh DG et Beaty TH. 1999. **Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy.** *J Allergy Clin Immunol* 104:485-491.

- Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J et Shuldiner AR. 1998. **Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations.** *Diabetes* 47:1806-1808.
- Beasley R, Crane J, Lai CK et Pearce N. 2000. **Prevalence and etiology of asthma.** *J Allergy Clin Immunol* Feb 105:S466-472.
- Beasley R. 2002. **The burden of asthma with specific reference to the United States.** *J Allergy Clin Immunol* May 109:S482-489.
- Beghe B, Barton S, Rorke S, Peng Q, Sayers I, Gaunt T, Keith TP, Clough JB, Holgate ST et Holloway JW. 2003. **Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population.** *Clin Exp Allergy*. Aug;33(8):1111-7.
- Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, Huang CY, Kochersperger M, Kopla R, Modica F, Pohl M, Varde S, Zhao R, Zhao X, Boyce-Jacino MT et Yassen A. 2002. **SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery.** *Biotechniques*. Jun;Suppl:70-2, 74, 76-7.
- Benayoun L, Letuve S, Druilhe A, Boczkowski J, Dombret MC, Mechighel P, Megret J, Leseche G, Aubier M et Pretolani M. 2001. **Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med* Oct 15;164(8 Pt 1):1487-94.
- Benayoun L et Pretolani M. 2003. **Le remodelage bronchique dans l'asthme: mécanismes et enjeux thérapeutiques.** *Medecine/Sciences* 19:319-26.
- Bensen JT, Dawson PA, Mychaleckyj JC et Bowden DW. 2001. **Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14.** *J Interferon Cytokine Res* Nov;21(11):899-904.
- Berger J et Moller DE. 2002. **The mechanisms of action of PPARs.** *Annu Rev Med*. 53:409-35.
- Bleecker ER, Postma DS et Meyers DA. 1997. **Evidence for multiple genetic susceptibility loci for asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* Oct 156:S113-116.
- Borenstein M, Kane J et Buchbinder J. 1987. **Monte Carlo simulation of statistical power.** *Psychopharmacol Bull* 23:300-302.

- Bouchard G, Roy R et Casgrain B. 1986. **Computerized family reconstitution on a large data-base: the SOREP system.** *Genus* 1986.
- Boulet LP, Becker A, Berube D, Beveridge R et Ernst P. 1999. [Summary of the recommendations of the Canadian Consensus Conference on Asthma 1999. Canadian Asthma Consensus Group]. *Cmaj* 161:SF1-14.
- Bousquet J, Demoly P, Vignola AM, Godard P et Michel FB. 1999. **Comprendre la maladie asthmatique.** *medecine/sciences* 15 : 823-832.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M et Vignola AM. 2000. **Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling.** *Am J Respir Crit Care Med* May;161(5):1720-45.
- Briscoe DM, Cotran RS et Pober JS. 1992. **Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration.** *J Immunol* 149:2954-2960.
- Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, Weiss ST, Hasday J, Lilly CM, Ford JG et Drazen JM. 1999. **Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma.** *Am J Respir Crit Care Med*. Sep;160(3):919-22.
- Busse W, Elias J, Sheppard D et Banks-Schlegel S. 1999. **Airway remodeling and repair.** *Am J Respir Crit Care Med* Sep;160(3):1035-42.
- Chinetti G, Fruchart JC et Staels B. 2000. **Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation.** *Inflamm Res*. Oct;49(10):497-505.
- Chizzonite R, Truitt T, Kilian PL, Stern AS, Nunes P, Parker KP, Kaffka KL, Chua AO, Lugg DK et Gubler U. 1989. **Two high-affinity interleukin 1 receptors represent separate gene products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 86:8029-8033.
- Chung KF et Barnes PJ. 1999. **Cytokines in asthma.** *Thorax* Sep;54(9):825-57.
- Clark RB. 2002. **The role of PPARs in inflammation and immunity.** *J Leukoc Biol* Mar;71(3):388-400.
- Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A et Paul WE. 1986. **B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells.** *J immunol* 136:4538-4541.

- Cookson WO, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Nakumuura Y, Nakumura Y et al. 1992. **Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q.** *Lancet* 340:381-384.
- Cookson WO. 1999. **The alliance of genes and environment in asthma and allergy.** *Nature* 402:B5-11.
- Cookson WO et Moffatt MF. 2000. **Genetics of asthma and allergic disease.** *Hum Mol Genet* Oct;9(16):2359-64.
- Cookson WO. 2002. **Asthma genetics.** *Chest* Mar;121(3 Suppl):7S-13S.
- Cordell HJ et Clayton DG. 2002. **A unified stepwise regression procedure for evaluating the relative effects of polymorphisms within a gene using case/control or family data: application to HLA in type 1 diabetes.** *Am J Hum Genet* Jan 70:124-141.
- Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA et Nadel JA. 1999. **IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo.** *J Immunol* 162:6233-6237.
- Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, le Souef PN, Lathrop GM, Musk AW et Cookson WO. 1996. **A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma.** *Nature* 383:247-250.
- Davies DE, Wicks J, Powell RM, Puddicombe SM et Holgate ST. 2003. **Airway remodeling in asthma: new insights.** *J Allergy Clin Immunol* 111:215-225; quiz 226.
- Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W et Auwerx J. 1998. **A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity.** *Nat Genet* Nov;20(3):284-7.
- Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K et al. 1987. **Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes.** *J Exp Med* 165:1459-1467.
- Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A et Kuehr J. 1997. **Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene.** *Biochem Biophys Res Commun* 231:696-697.

- Deichmann KA, Heinzmann A, Forster J, Dischinger S, Mehl C, Brueggenolte E, Hildebrandt F, Moseler M et Kuehr J. 1998. **Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene.** *Clin Exp Allergy* 28:151-155.
- Delerive P, Fruchart JC et Staels B. 2001. **Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control.** *J Endocrinol* Jun;169(3):453-9.
- Deloukas P, Schuler GD, Gyapay G, Beasley EM, Soderlund C, Rodriguez-Tome P, Hui L, Matisse TC, McKusick KB, Beckmann JS, Bentolila S, Bihoreau M, Birren BB, Browne J, Butler A, Castle AB, Chiannikulchai N, Clee C, Day PJ, Dehejia A, Dibling T, Drouot N, Duprat S, Fizames C, Bentley DR et et al. 1998. **A physical map of 30,000 human genes.** *Science* 282:744-746.
- Dinarello CA. 1996. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* Mar 15;87(6):2095-147.
- Dinarello CA. 1998. **Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist.** *Int Rev Immunol* 16:457-499.
- Djukanovic R. 1996. **Bronchoscopy as a research tool for the study of asthma pathogenesis and effects of antiasthma drugs.** *J Allergy Clin Immunol* 98:S41-45; discussion S64-46.
- Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Flavell DM, World M, Montgomery HE, Boyle D, Morris A et Palmer CN. 2002. **Haplotype analysis of the PPARgamma Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight.** *BMC Genet.* Nov 13;3(1):21.
- Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW et Azzarone B. 1998. **IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts.** *Int Immunol* 10:1421-1433.
- Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, Holgate T et Morton NE. 1996. **Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness.** *Am J Respir Crit Care Med* 153:1280-1284.
- Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S et Urdal DL. 1985. **Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1.** *J Exp Med* Aug 1 (162):501-515.
- Dreyfuss G, Hentze M et Lamond AI. 1996. **From transcript to protein.** *Cell* Jun 28 (85):963-972.

- Dubé J et Boulet LP. 1996. **Rôles de l'inflammation et des modifications des structures bronchiques dans l'asthme allergique.** *médecine/sciences* 3 : 351-57.
- Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL et Mathews JD. 1990. **Genetics of asthma and hay fever in Australian twins.** *Am Rev Respir Dis* 142:1351-1358.
- Elston RC. 1995. **The genetic dissection of multifactorial traits.** *Clin Exp Allergy* 25 Suppl 2:103-106.
- Fryer AA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC et Spiteri MA. 2000. **Polymorphism at the glutathione S-transferase GSTP1 locus. A new marker for bronchial hyperresponsiveness and asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 161:1437-1442.
- GINA. 2003. **Global initiative for asthma (GINA) : Global strategy for asthma management and prevention.** *NIH Publication No 02-3659*:Document disponible sur le site Internet www.ginasthma.com.
- Global burden of asthma. 2004. **Developped for the global initiative for asthma.**Document disponible sur le site Internet www.ginasthma.com.
- Grasemann H, Yandava CN, Storm van's Gravesande K, Deykin A, Pillari A, Ma J, Sonna LA, Lilly C, Stampfer MJ, Israel E, Silverman EK et Drazen JM. 2000. **A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma.** *Biochem Biophys Res Commun* 272:391-394.
- Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E et Martinez FD. 2000. **A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children.** *J Allergy Clin Immunol* 105:506-513.
- Gray IC, Campbell DA et Spurr NK. 2000. **Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics.** *Hum Mol Genet* 9:2403-2408.
- Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G et Nimer SD. 1995. **Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping.** *Gene Expr* 4:281-299.
- Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA et Bein G. 2001. **A novel polymorphism in the 5' promoter region of the human interleukin-4 receptor alpha-chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels.** *Immunogenetics*. May-Jun;53(4):264-9.

- Hakonarson H et Wjst M. 2001. **Current concepts on the genetics of asthma.** *Curr Opin Pediatr* 13:267-277.
- Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, Finnbogason G, Gislason T, Kristjansson K, Arnason T, Birkisson I, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR et Stefansson K. 2002. **A Major Susceptibility Gene for Asthma Maps to Chromosome 14q24.** *Am J Hum Genet* Jul 15;71(3) [epub ahead of print].
- Hakonarson H et Halapi E. 2002. **Genetic analyses in asthma: current concepts and future directions.** *Am J Pharmacogenomics* 2:155-166.
- Hargreave FE, Ryan G, Thomson NC, O'Byrne PM, Latimer K et Juniper EF. 1982. **Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance.** *Eur J Respir Dis Suppl* 121:79-88.
- Hartl DL et Clark AG. 1997. **Principles of population genetics.** *Sunderland, thrih edition:Sinauer*, 481 p.
- Hegele RA, Cao H, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ et Anderson CM. 2000. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree.** *J Clin Endocrinol Metab.* May;85(5):2014-9.
- Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S, Yamashita T, Roberts MH, Sugimoto R, Arima K, Arinobu Y, Yu B, Kruse S, Enomoto T, Dake Y, Kawai M, Shimazu S, Sasaki S, Adra CN, Kitaichi M, Inoue H, Yamauchi K, Tomichi N, Kurimoto F, Hamasaki N, Hopkin JM, Izuhara K, Shirakawa T et Deichmann KA. 2000. **Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy.** *Hum Mol Genet.* Mar 1;9(4):549-59.
- Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML et Chatila TA. 1997. **The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor.** *N Engl J Med* 337:1720-1725.
- Heyer ET, M. Desjardins, B. 1997. **Seventeenth-century European origins of hereditary diseases in the Saguenay population (Quebec, Canada).** *Hum Biol* 69:209-225.
- Hoffjan S et Ober C. 2002. **Present status on the genetic studies of asthma.** *Curr Opin Immunol* Dec 14:709-717.
- Hoffjan S, Nicolae D et Ober C. 2003. **Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature.** *Respir Res* 4:14.

- Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER et Chaplin DD. 1991. **Interleukin 1 is processed and released during apoptosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* Oct 1;88(19):8485-9.
- Holgate ST, Lackie P, Wilson S, Roche W et Davies D. 2000. **Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* Sep;162(3 Pt 2):S113-7.
- Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA et Sly PD. 1999. **The role of allergy in the development of asthma.** *Nature* Nov (25) 402:B12-17.
- Horvath S, Xu X et Laird NM. 2001. **The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations.** *Eur J Hum Genet.* Apr;9(4):301-6.
- Horvath S, Xu X, Lake SL, Silverman EK, Weiss ST et Laird NM. 2004. **Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics.** *Genet Epidemiol* 26:61-69.
- Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng SL, Postma DS, Meyers DA et Bleecker ER. 2002. **Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma.** *Am J Hum Genet* Jan;70(1):230-6.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D et Glass CK. 1999. **Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.** *Nature* Jul 22;400(6742):378-82.
- Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, Lichtenstein LM et Liu MC. 1995. **IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma.** *J Immunol* 155:2688-2694.
- Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Robinson DS, Kay AB et Corrigan CJ. 1996. **IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity.** *Am J Respir Crit Care Med* 154:1497-1504.
- Humbert M, Durham SR, Kimmitt P, Powell N, Assoufi B, Pfister R, Menz G, Kay AB et Corrigan CJ. 1997. **Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 99:657-665.
- Hurme M, Lahdenpohja N et Santtila S. 1998. **Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases.** *Ann Med* Oct;30(5):469-73.

- Huss K et Huss RW. 2000. **Genetics of asthma and allergies.** *Nurs Clin North Am* Sep;35(3):695-705.
- Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS et al. 1990. **Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily.** *J Exp Med* 171:861-873.
- Illig T et Wjst M. 2002. **Genetics of asthma and related phenotypes.** *Paediatr Respir Rev* Mar;3(1):47-51.
- ISAAC. 1998. **Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.** *Lancet* Apr (25) 351:1225-1232.
- Izuhara K et Shirakawa T. 1999. **Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy.** *Int J Mol Med* 3:3-10.
- Janson C, Anto J, Burney P, Chinn S, de Marco R, Heinrich J, Jarvis D, Kuenzli N, Leynaert B, Luczynska C, Neukirch F, Svanes C, Sunyer J et Wjst M. 2001. **The European Community Respiratory Health Survey: what are the main results so far? European Community Respiratory Health Survey II.** *Eur Respir J* Sep 18:598-611.
- Jiang C, Ting AT et Seed B. 1998. **PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines.** *Nature* Jan 1;391(6662):82-6.
- Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, Hofler C, Weiland SK, Fritsch C, von Mutius E et Martinez FD. 2003. **A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood.** *J Allergy Clin Immunol.* Nov;112(5):893-8.
- Kahn HA et Sempos CT. 1989. **Statistical methods in epidemiology.** *Oxford University Press, Inc.*:New York, 292 p.
- Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otsuka F et Hamaguchi H. 1998. **Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families.** *J Med Genet* 35:502-504.
- Keavney B. 2000. **Genetic association studies in complex diseases.** *J Hum Hypertens* 14:361-367.

- Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR et Keegan AD. 2003. **Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps.** *Science* Jun (6)300:1527-1528.
- Kimura K, Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Yokouchi Y, Takeda K, Yamakawa-Kobayashi K, Matsui A et Hamaguchi H. 1999. **Linkage and association of atopic asthma to markers on chromosome 13 in the Japanese population.** *Hum Mol Genet* 8:1487-1490.
- Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J et Deichmann KA. 1999. **The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction.** *Immunology* 96:365-371.
- Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D et Erle DJ. 2002. **Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma.** *Nat Med* 8:885-889.
- Labuda M, Labuda D, Korab-Laskowska M, Cole DE, Zietkiewicz E, Weissenbach J, Popowska E, Pronicka E, Root AW et Glorieux FH. 1996. **Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians.** *Am J Hum Genet* 59:633-643.
- Laing IA, Hermans C, Bernard A, Burton PR, Goldblatt J et Le Souef PN. 2000. **Association between plasma CC16 levels, the A38G polymorphism, and asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 161:124-127.
- Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ et Kere J. 2001. **A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population.** *Nat Genet* May;28(1):87-91.
- Lander E et Kruglyak L. 1995. **Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results.** *Nat Genet* 11:241-247.
- Lander ES et Schork NJ. 1994. **Genetic dissection of complex traits.** *Science* Oct 21;266(5184):353.
- Laprise C et Boulet LP. 1996. **Airway responsiveness and atopy in families of patients with asthma.** *Clin Invest Med* Dec;19(6):461-9.

- Laprise C, Laviolette M, Boutet M et Boulet LP. 1999. **Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling.** *Eur Respir J* Jul;14(1):63-73.
- Laprise C, Raby B, Murphy J, Lemire M, Brewer C, Fortin J, Renaud Y, Faith J, Sinnott D, Lacasse S, Verner A, Fujiwara M, Boulet L, Bégin P, Vézina H, Morgan K, Greenwood C et Hudson T. 2002. **Candidate région search for asthma susceptibility loci in french canadian founder population.** *Manuscrit en préparation.*
- Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ et Laviolette M. 2004. **Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma.** *BMC Genomics* 5:21.
- Lemire M. 2004. **Calcul de puissance et analyses d'interaction.** *Communications personnelles*, Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, Montréal (Canada).
- Luan JA, Wong MY, Day NE et Wareham NJ. 2001. **Sample size determination for studies of gene-environment interaction.** *Int J Epidemiol* 30:1035-1040.
- Maddox L et Schwartz DA. 2002. **The pathophysiology of asthma.** *Annu Rev Med* 53:477-98.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G et Beaty TH. 1994. **Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations.** *Science* May 20;264(5162):1152-6.
- Martinez FD, Solomon S, Holberg CJ, Graves PE, Baldini M et Erickson RP. 1998. **Linkage of circulating eosinophils to markers on chromosome 5q.** *Am J Respir Crit Care Med* 158:1739-1744.
- McKenzie AN, Li X, Largaespada DA, Sato A, Kaneda A, Zurawski SM, Doyle EL, Milatovich A, Francke U, Copeland NG et al. 1993. **Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes.** *J Immunol* Jun 15 (150):5436-5444.
- Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC et Bleecker ER. 1994. **Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5.** *Genomics* 23:464-470.

- Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B et al. 1993. **Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses.** *Nature* 362:248-250.
- Mitchell EA. 1985. **International trends in hospital admission rates for asthma.** *Arch Dis Child* 60:376-378.
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM et Izuhara K. 1999. **Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis.** *J Immunol* 162:1227-1231.
- Moffatt MF et Cookson WO. 1997. **Tumour necrosis factor haplotypes and asthma.** *Hum Mol Genet* 6:551-554.
- Moffatt MF et Cookson WO. 1998. **Gene identification in asthma and allergy.** *Int Arch Allergy Immunol* 116:247-252.
- Moffatt MF, Schou C, Faux JA, Abecasis GR, James A, Musk AW et Cookson WO. 2001. **Association between quantitative traits underlying asthma and the HLA-DRB1 locus in a family-based population sample.** *Eur J Hum Genet* 9:341-346.
- Moser R, Fehr J et Bruijnzeel PL. 1992. **IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals.** *J Immunol* 149:1432-1438.
- Mueller C, Weaver V, Vanden Heuvel JP, August A et Cantorna MT. 2003. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma.** *Arch Biochem Biophys*. Oct 15;418(2):186-96.
- Murthy V, Julien P et Gagne C. 1996. **Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene.** *Pharmacol Ther* 70:101-135.
- Nakao F, Ihara K, Kusuhara K, Sasaki Y, Kinukawa N, Takabayashi A, Nishima S et Hara T. 2001. **Association of IFN-gamma and IFN regulatory factor 1 polymorphisms with childhood atopic asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 107:499-504.
- Naseer T, Minshall EM, Leung DY, Laberge S, Ernst P, Martin RJ et Hamid Q. 1997. **Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy.** *Am J Respir Crit Care Med* 155:845-851.

- Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ et Paul WE. 1999. **The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions.** *Annu Rev Immunol* 17:701-38.
- Newman DL, Hoffjan S, Bourgain C, Abney M, Nicolae RI, Profits ET, Grow MA, Walker K, Steiner L, Parry R, Reynolds R, McPeck MS, Cheng S et Ober C. 2004. **Are common disease susceptibility alleles the same in outbred and founder populations?** *Eur J Hum Genet* Jul 12:584-590.
- Nicklin MJ, Weith A et Duff GW. 1994. **A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist genes.** *Genomics* Jan 15;19(2):382-4.
- Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kawashima T, Yanagi H, Matsui A et Hamaguchi H. 1998. **Association of asthma and the interleukin-4 promoter gene in Japanese.** *Clin Exp Allergy* 28:449-453.
- Ober C, Tsalenko A, Willadsen S, Newman D, Daniel R, Wu X, Andal J, Hoki D, Schneider D, True K, Schou C, Parry R et Cox N. 1999. **Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutterites.** *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:11-15.
- Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, King RA, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER et Cox NJ. 2000. **Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations.** *Am J Hum Genet.* Feb;66(2):517-26.
- Ober C, Abney M et McPeck MS. 2001. **The genetic dissection of complex traits in a founder population.** *Am J Hum Genet* Nov 69:1068-1079.
- Palmer LJ, Daniels SE, Rye PJ, Gibson NA, Tay GK, Cookson WO, Goldblatt J, Burton PR et LeSouef PN. 1998. **Linkage of chromosome 5q and 11q gene markers to asthma-associated quantitative traits in Australian children.** *Am J Respir Crit Care Med* 158:1825-1830.
- Palmer LJ et Cookson WO. 2000. **Genomic approaches to understanding asthma.** *Genome Res* Sep;10(9):1280-7.
- Palmer LJ et Cookson WO. 2001. **Using single nucleotide polymorphisms as a means to understanding the pathophysiology of asthma.** *Respir Res* 2(2):102-12.
- Patel HJ, Belvisi MG, Bishop-Bailey D, Yacoub MH et Mitchell JA. 2003. **Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy.** *J Immunol* Mar 1;170(5):2663-9.

- Paul WE. 1991. **Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.** *Blood.* May 1;77(9):1859-70.
- Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K et Ra C. 1997. **Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells.** *J Clin Invest.* Apr 1;99(7):1492-9.
- Peltonen L, Palotie A et Lange K. 2000. **Use of population isolates for mapping complex traits.** *Nat Rev Genet* Dec;1(3):182-90.
- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H et Nerup J. 1992. **A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro.** *Eur J Clin Invest* 22:396-402.
- Poon A, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnott D, Schurr E et Hudson TJ. 2004. **Association of VDR genetic variants with susceptibility to asthma and atopy.** *Am J Respir Crit Care Med* Article soumis en février 2004 et la réponse aux correcteurs envoyée en juin 2004.
- Postma DS, Bleecker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA et Levitt RC. 1995. **Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy.** *N Engl J Med* 333:894-900.
- Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda RL, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG et al. 1991. **The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7.** *Genomics* 10:801-806.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ et Glass CK. 1998. **The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.** *Nature* Jan 1;391(6662):79-82.
- Risch N et Merikangas K. 1996. **The future of genetic studies of complex human diseases.** *Science* 273:1516-1517.
- Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, Chakraborty R et Hershey GK. 2002. **V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function.** *J Immunol* Aug 1;169(3):1604-10.

- Rommens J, Iannuzzi M, Kerem B, Drumm M, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole J, Kennedy D, Hidaka N et al. 1989. **Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping.** *Science* 245:1059-1065.
- Rosenwasser LJ, Klemm DJ, Dresback JK, Inamura H, Mascali JJ, Klinnert M et Borish L. 1995. **Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy.** *Clin Exp Allergy*. Nov;25 Suppl 2:74-8; discussion 95-6.
- Rosenwasser LJ. 1996. **Genetics of asthma and atopy.** *Toxicol Lett* Aug;86(2-3):73-7.
- Rosenwasser LJ. 1997. **Interleukin-4 and the genetics of atopy.** *N Engl J Med* 337:1766-1767.
- Rousseau F et Laflamme N. 2003. **Génétique moléculaire : des maladies monogéniques aux maladies complexes.** *Médecine/Sciences* 19 : 950-4.
- Sandford A, Weir T et Pare P. 1996. **The genetics of asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* Jun;153(6 Pt 1):1749-65.
- Santtila S, Savinainen K et Hurme M. 1998. **Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1beta production in vitro.** *Scand J Immunol* 47:195-198.
- Schnyder B, Lugli S, Feng N, Etter H, Lutz RA, Ryffel B, Sugamura K, Wunderli-Allenspach H et Moser R. 1996. **Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 bind to a shared heterodimeric complex on endothelial cells mediating vascular cell adhesion molecule-1 induction in the absence of the common gamma chain.** *Blood* 87:4286-4295.
- Scriver CR. 2001. **Human genetics: lessons from Quebec populations.** *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:69-101.
- Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN et Hopkin JM. 2000. **Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling.** *Immunol Today* 21:60-64.
- Shirakawa T, Mao XQ, Sasaki S, Enomoto T, Kawai M, Morimoto K et Hopkin J. 1996. **Association between atopic asthma and a coding variant of Fc epsilon RI beta in a Japanese population.** *Hum Mol Genet* Aug;5(8):1129-30.
- Silverman EK et Palmer LJ. 2000. **Case-control association studies for the Genetics of Complex REspiratory diseases.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 ; 645-648.

- Smith DH, Malone DC, Lawson KA, Okamoto LJ, Battista C et Saunders WB. 1997. **A national estimate of the economic costs of asthma.** *Am J Respir Crit Care Med* 156:787-793.
- Spielman RS et Ewens WJ. 1996. **The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association.** *Am J Hum Genet* 59:983-989.
- Spoelstra FM, Postma DS, Hovenga H, Noordhoek JA et Kauffman HF. 1999. **Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts.** *Eur Respir J* 14:759-766.
- Steinke JW et Borish L. 2001. **Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists.** *Respir Res* 2(2):66-70.
- Suzuki I, Hizawa N, Yamaguchi E et Kawakami Y. 2000. **Association between a C+33T polymorphism in the IL-4 promoter region and total serum IgE levels.** *Clin Exp Allergy*. Dec;30(12):1746-9.
- The Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). 1997. **A genome-wide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations.** *Nat Genet* 15:389-392.
- Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E et Whittaker P. 2003. **PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect.** *Br J Pharmacol*. May;139(1):163-71.
- Vamecq J et Latruffe N. 1999. **Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors.** *Lancet* Jul 10;354(9173):141-8.
- van der Pouw Kraan TC, van Veen A, Boeije LC, van Tuyl SA, de Groot ER, Stapel SO, Bakker A, Verweij CL, Aarden LA et van der Zee JS. 1999. **An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma.** *Genes Immun* 1:61-65.
- Walley AJ et Cookson WO. 1996. **Investigation of an interleukin-4 promoter polymorphism for associations with asthma and atopy.** *J Med Genet* 33:689-692.
- Walter MJ, Morton JD, Kajiwara N, Agapov E et Holtzman MJ. 2002. **Viral induction of a chronic asthma phenotype and genetic segregation from the acute response.** *J Clin Invest* Jul;110(2):165-75.

- Wang AC, Dai X, Luu B et Conrad DJ. 2001. **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation.** *Am J Respir Cell Mol Biol* Jun;24(6):688-93.
- Wang HY, Shelburne CP, Zamorano J, Kelly AE, Ryan JJ et Keegan AD. 1999. **Cutting edge: effects of an allergy-associated mutation in the human IL-4R alpha (Q576R) on human IL-4-induced signal transduction.** *J Immunol* 162:4385-4389.
- Weeks DE et Lathrop GM. 1995. **Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits.** *Trends Genet* 11:513-519.
- Wills-Karp M. 2000. **The gene encoding interleukin-13: a susceptibility locus for asthma and related traits.** *Respir Res* 1(1):19-23.
- Wills-Karp M et Chiaramonte M. 2003. **Interleukin-13 in asthma.** *Curr Opin Pulm Med* Jan 9:21-27.
- Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, Von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, Van Koningsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Wichmann HE et al. e. 1999. **A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group.** *Genomics* May 15;58(1):1-8.
- Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin JP, Auwerx J, Staels B, Capron M et Dombrowicz D. 2003. **Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation.** *J Exp Med.* Aug 4;198(3):411-21.
- Wong MY, Day NE, Luan JA et Wareham NJ. 2004. **Estimation of magnitude in gene-environment interactions in the presence of measurement error.** *Stat Med* 23:987-998.
- Yang XY, Wang LH, Chen T, Hodge DR, Resau JH, DaSilva L et Farrar WL. 2000. **Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.** *J Biol Chem.* Feb 18;275(7):4541-4.
- Yang XY, Wang LH, Mihalic K, Xiao W, Chen T, Li P, Wahl LM et Farrar WL. 2002. **Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands.** *J Biol Chem* Feb 8;277(6):3973-8.

Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J et Shuldiner AR. 1997. **Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation.** *Biochem Biophys Res Commun* Dec 18;241(2):270-4.

Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, Rosenberg WM, Bell JI, Hopkin JM et Cookson WO. 1994. **HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major allergens.** *Clin Exp Allergy* 24:431-439.

Zhu S, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WT, Pare PD et Sandford AJ. 2000. **Polymorphisms of the IL-4, TNF-alpha, and Fcepsilon RIbeta genes and the risk of allergic disorders in at-risk infants.** *Am J Respir Crit Care Med* May;161(5):1655-9.

Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y et Elias JA. 1999. **Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production.** *J Clin Invest* Mar 103:779-788.

Sites Internet

Association pulmonaire du Canada. 2004. <http://poumon.ca>.

Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill. 2004. <http://www.genomequebec.mcgill.ca/>.

Genetic Association Database. 2004. *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*: <http://geneticassociationdb.nih.gov/>.

NCBI. 2004. *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

UCSC Genome Browser. 2004. *University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Bioinformatics Site*: <http://genome.ucsc.edu/>.

ANNEXE A

-CENTRE DE MÉDECINE GÉNÉRIQUE COMMUNAUTAIRE, HÔPITAL DE CHICOUTIMI-
-PROJET BALSAC, UQAC-
-CENTRE D'INNOVATION DE GÉNOME QUÉBEC ET DE L'UNIVERSITÉ MCGILL-

Questionnaire d'Évaluation de la condition respiratoire

Ce questionnaire est distribué à toute personne participant à cette étude et a pour but de mettre en relation la perception que vous avez face à votre condition respiratoire aux résultats que nous obtiendrons lors des analyses de celle-ci.

Nous vous demandons donc de répondre au questionnaire, donné par la personne responsable de cette étude, suivant le meilleur de vos connaissances. En ce sens, la personne ressource pourra, dans la plupart des cas, répondre à vos questions. Si vous estimez qu'une ou plusieurs questions ne décrivent pas votre condition de façon adéquate, sentez-vous libre d'ajouter vos commentaires afin de clarifier la réponse que vous donnerez.

Renseignement généraux

Date: ___/___/___
Jr Ms An

Numéro : _____
(complété par le chercheur)

Nom : _____

Prénom : _____

Sexe : _____ Âge : _____

Date de naissance : _____
Jr Ms An

Acte de mariage : Lieu _____ Date du mariage : _____
Jr Ms An

Adresse : _____
civile, nom de la rue, # App.
_____ Code postal
ville, province, pays

No. de téléphone à la maison : (____) _____ - _____

Autre no. où l'on peut vous joindre : (____) _____ - _____

CARACTÉRISTIQUE DE VOTRE CONDITION RESPIRATOIRE PASSÉE ET ACTUELLE

1- À votre connaissance avez-vous déjà eu des problèmes ou des maladies respiratoires?

Si oui, lesquels : _____
 À quel âge (environ) : _____
 Sont-ils encore présents : _____

2- AVEZ-VOUS DÉJÀ FAIT DE L'ASTHME? OUI _____ NON _____

oui: Début (âge) _____
 Fin (âge) _____

3- Un médecin vous-a-t-il dit que vous étiez asthmatique? oui _____ non _____

Votre asthme était :
 Très léger _____ Léger _____ modéré _____ sévère _____ très sévère _____

4- De quelle manière caractériseriez-vous votre asthme aujourd'hui?

Très léger _____ Léger _____ modéré _____ sévère _____ très sévère _____

5- Quel traitement avez-vous déjà pris ou, prenez-vous encore pour votre asthme?

6- Lesquels des facteurs suivants pouvaient (inscrire P pour passé), peuvent (inscrire A pour actuel) déclencher votre asthme?

	oui	non	
Animaux	_____	_____	Lesquels: _____
Poussière	_____	_____	
Odeurs fortes	_____	_____	
Air froid	_____	_____	
Infections	_____	_____	
Exercice	_____	_____	
Aspirine	_____	_____	Lesquels: _____
Autres	_____	_____	

Est-ce que votre asthme était ou est pire lors d'une saison particulière?

Si oui, laquelle : _____

7- Avez-vous des allergies? oui _____ non__ (si non, passez à la question 8)

Si oui, à quoi êtes-vous allergique?

	oui	non	
Animaux	_____	_____	Lesquels? _____
Poussière	_____	_____	
Air froid	_____	_____	
Aspirine	_____	_____	
Pollens	_____	_____	des : arbres _____, graminées _____, herbe à poux _____
Autres	_____	_____	Lesquels? _____

Parmi les symptômes énumérés ci-dessous, lesquels avez-vous déjà eu?

	oui	non	
Yeux qui piquent ou qui coulent	_____	_____	
Essoufflement	_____	_____	
Toux	_____	_____	
Nez qui coule	_____	_____	
Éternuements	_____	_____	
Sillelements ou sifflements	_____	_____	
Oppression à la poitrine	_____	_____	
Autres	_____	_____	lesquels : _____

Est-ce que votre allergie était ou est pire lors d'une saison particulière?

Si oui, laquelle : _____

Quels traitements avez-vous pris pour vos allergies?

	oui	non
Antihistaminique (Seldane, Claritin, etc.)	_____	_____
lesquels : _____		

Vaccins désensibilisants _____ quand : _____

8- Prenez-vous d'autres médicaments régulièrement à part ceux précédemment mentionnés?

Lesquels : _____	Pour quelle(s) raison(s) : _____
_____	_____

9- Y a-t-il des asthmatiques dans votre famille

(père, mère, frères, soeurs, enfants)?

oui _____ non _____

Qui : _____

10- Y a-t-il des personnes allergiques dans votre famille

(père, mère, frères, soeurs, enfants)?

oui _____ non _____

Qui : _____

DESCRIPTION DES SYMPTÔMES ACTUELS**TOUX**

Toussez-vous habituellement :	oui	non
le matin en hiver?	_____	_____
en été?	_____	_____
pendant d'autres périodes de la journée en hiver?	_____	_____
en été?	_____	_____
la plupart des jours et/ou des nuits		
au moins trois mois par année?	_____	_____
Depuis combien de temps avez-vous cette toux? _____ ans _____ mois		

EXPECTORATIONS

Ramenez-vous habituellement des sécrétions (crachats) qui viennent de la poitrine:	oui	non
en vous levant le matin?	_____	_____
d'autres périodes de la journée ou de la nuit?	_____	_____
au moins trois mois par année?	_____	_____
Depuis combien de temps produisez-vous ces sécrétions? _____ ans _____ mois		

ESSOUFFLEMENT

Devez-vous diminuer vos activités, par rapport à des gens de votre âge, à cause d'un manque de souffle?	_____ oui	_____ non
si oui, depuis combien de temps?	_____ ans	_____ mois

SILLEMENT

Vous arrive-t-il parfois d'entendre des sifflements ou des sillements dans la poitrine en respirant?	_____ oui	_____ non
si oui, depuis combien de temps?	_____ ans	_____ mois

INFECTIONS

Quand vous avez un rhume ou une grippe ou une infection respiratoire, est-ce qu'habituellement :	oui	non
vous toussiez plus que la plupart des gens?	_____	_____
vous avez des sifflements (ou sillements)?	_____	_____
vous ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
vous commencez à être essoufflé?	_____	_____
Combien de "grippes" ou rhumes faites-vous par année? _____		
Ont-elles surtout lieu l'hiver _____ l'été _____ n'importe quand _____		
À quand remonte votre dernier rhume _____ ans _____ mois		
À quand remonte votre dernière grippe _____ ans _____ mois		

ENVIRONNEMENT**QUAND VOUS ÊTES DANS UNE PIÈCE OU UN ENDROIT**

où il y a beaucoup de fumée (la fumée de cigarette par exemple),
est-ce que vous :

	oui	non
toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____

où il y a de la poussière, des animaux ou près des plumes, ou encore quand vous êtes près des
arbres, sur la pelouse, ou, lorsqu'il y a beaucoup de pollen dans l'air, est-ce que vous :

	oui	non
toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____
avez le nez qui coule ou des éternuements?	_____	_____
avez les yeux qui piquent ou qui coulent?	_____	_____
avez des irritations ou devenez plaqué?	_____	_____

EXERCICE ET AIR FROID

Quand vous faites de l'exercice, un travail difficile ou que vous respirez de l'air froid et sec
l'hiver, est-ce que vous :

	oui	non
toussez?	_____	_____
avez des sifflements (sillements)?	_____	_____
ressentez une oppression dans la poitrine?	_____	_____
êtes essoufflé?	_____	_____

EXPOSITION À LA MAISON

Avez-vous des animaux domestiques _____ oui _____ non
si oui, lesquels? _____

depuis combien de temps? _____ ans _____ mois

Avez-vous du tapis à la maison?	_____	oui	_____	non
dans votre chambre à coucher?	_____	oui	_____	non
Avez-vous des draps santé?	_____	oui	_____	non

DESCRIPTION DES SYMPTÔMES PARFOIS, OU DÉJÀ RESENTIS :

Lorsque vous faites de l'exercice, êtes exposé a des irritants respiratoires ou êtes exposé à une substance à laquelle vous êtes allergique, réssentez-vous alors les sensations décrites par les phrases suivantes :

	oui	non
1- Ma respiration ne va pas jusqu'au bout	_____	_____
2- Ma respiration est halatante	_____	_____
3- Ma respiration est plus rapide	_____	_____
4- Ma respiration demande un effort	_____	_____
5- Ma respiration est difficile	_____	_____
6- Ma respiration est laborieuse	_____	_____
7- Ma respiration est superficielle	_____	_____
8- Ma respiration est limitée	_____	_____
9- Ma respiration demande plus de concentration	_____	_____
10- Je me sens étouffé	_____	_____
11- J'ai besoin d'air	_____	_____
12- Je ne peux pas prendre une respiration profonde	_____	_____
13- Je me sens essoufflé	_____	_____
14- Je sens une oppression à la poitrine	_____	_____
15- Je sens un blocage de ma respiration	_____	_____
16- Je me sens suffoqué	_____	_____
17- Je sens un serrement dans la poitrine	_____	_____
18- Je sens que je respire plus fort	_____	_____
19- Je manque d'air	_____	_____
20- Autres (description détaillée) : _____		

ANTÉCÉDENTS PERSONNELS

Avez-vous déjà fait :	oui	non
- du rhume des foins?	_____	_____
- de l'eczéma?	_____	_____
- de l'urticaire?	_____	_____
- de la bronchite chronique?	_____	_____
- de l'emphysème?	_____	_____
- une infection respiratoire?	_____	_____
si oui, quand : _____		
- autre problème de santé?	_____	_____
si oui, lequel ou lesquels? _____		

ANTÉCÉDENTS FAMILIAUX

Est-ce que votre père, mère, ou l'un de vos frères, soeurs ou enfants, fait ou a déjà fait :

	oui	non
de l'asthme?	_____	_____
de l'allergie?	_____	_____
de la rhinite?	_____	_____
de l'eczéma?	_____	_____
de l'urticaire?	_____	_____
de la bronchite chronique?	_____	_____
de l'emphysème?	_____	_____
de la tuberculose?	_____	_____
ou autres (précisez) _____		

TABAGISME

Avez-vous déjà fumé? _____ oui _____ non

si oui, combien de cigarette par jour _____ combien de temps _____
 cigare par jour _____ combien de temps _____
 marijuana par jour_ combien de temps _____

si vous avez arrêté, depuis combien de temps ? _____

Êtes-vous exposé(e) à la fumée de tabac d'autres personnes autour de vous?

À la maison _____ oui _____ non
 Au travail _____ oui _____ non
 Ailleurs (fréquent) _____ oui _____ non précisez où? _____

Quelle est votre occupation ? _____

ANNEXE B

Tel que mentionné dans le Matériel et Méthode du Chapitre 2, les calculs de puissance ont été effectués par Mathieu Lemire du Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill. Voici le rapport du détail de ses calculs (version originale anglaise).

- Association study - power calculations

**Mathieu Lemire
20/02/2004**

INTRODUCTION

Given the expensive genotyping project on the table, and to help decisions regarding the design of the project, I performed some power calculations that are relevant to our asthma cohort.

METHODS

Models for the disease (here asthma) are defined in terms of the susceptibility allele frequency and additive penetrances (probability of being affected given the number of

susceptibility alleles). The selected models do not constitute an exhaustive search of the parameter space, far from it (computer intensive methods = limited coverage so far).

Two scenarios: (1) genotyping of all probands, all their sibs and their parents (approximately 820 dna samples); (2) genotyping of only the probands and their parents (~ 670 dna samples, or ~20% less). (I ignore all other individuals; they slow down the calculations way too much. Of course, by genotyping all sibships, we have more diversity in phenotype values).

Power is the probability of getting a significant association with the asthma diagnosis at the level 0.001 (we could thus be doing ~50 independent tests and still be Bonferonni-significant).

We considered the BEST CASE scenario, where we actually genotyped the susceptibility locus. If we instead genotype a marker locus, the strenght of LD between it and the susceptibility locus may have an ENORMOUS effect on the power (not yet established).

Genotypes were generated by Monte Carlo simulations, conditionnal on the model and on the disease status of all individuals in our cohort (actually all individuals in scenario 1). For each model, 1000 replicates were analysed using FBAT.

Those results can readily be used in the manuscripts currently in preparation.

RESULTS

« p » is the frequency of the susceptibility allele. f0, f1, f2 are probability (in %) of being asthmatic for carriers of 0, 1 or 2 susceptibility alleles. All models give a prevalence of 15%. I am aware that epidemiologists may prefer ways of presenting the results other than through penetrance values.

Prevalence is 15%

$p = 0.1$

f0	f1	f2	Power Trios
10	35	60	0.999
12	27	42	0.79
14	19	24	0.034

$p = 0.2$

f0	f1	f2	Power Trios
10	22	35	0.90
12	19	27	0.31
14	16	19	0.007

$p = 0.35$

f0	f1	f2	Power Trio
10	17	24	0.48
12	16	20	0.089
14	15	16	0.005

ANNEXE C

Voici un court document (version originale anglaise) qui résume l'analyse de régression effectuée par Mathieu Lemire. Dans son rapport, on peut voir que l'on part avec un SNP déjà associé, on en rajoute un autre et on regarde comment le second améliore la vraisemblance (le *likelihood*) des données par rapport à la vraisemblance originale (celle qui tient compte du SNP associé). Alors en tout temps les résultats ne peuvent être confondus par le premier SNP.

Il est à noter que l'analyse concerne l'asthme et que la même démarche a été employée pour l'atopie et que les résultats ne sont pas présentés ici, mais dans le Tableau X.

Detecting interactions between unlinked genes by use of cases and pseudocontrols: the interleukin/PPAR γ pathways

Mathieu Lemire

/home/mlemire/Asthma/SNPs/Karine/Interactions/Documents

June 18, 2004

Introduction

The case-pseudocontrol design is discussed in Cordell and Clayton (2002) [AJHG 70:124]. The genotype of a case is matched with three pseudocontrols consisting of the three (phased) genotypes that could have been transmitted by the parents. The original family-based design can thus be reduced to a matched case-control design. Conditionnal logistic regression can then be used to assess the interaction between unlinked polymorphisms.

Methods

Our sample consist of 200 cases and their parents, genotyped at five coding polymorphisms inside the genes *IL13*, *IL1*, *IL4R*, *IL4* and *PPAR γ* . In this report, to keep the number of parameters (degrees of freedom) low, we consider only two genes at a time.

For two genes, *A* and *B*, and a given coding for the genotypes, the full regression model considered is

$$\log(\text{Odds}) = A + B + A * B,$$

where *A* (respectively *B*) denotes the main effect of gene *A* (respectively *B*) and *A * B* denotes the interaction effect between the two genes. To assess the existence of interaction effects, we first start with the gene that best fits the observed data (say *A*) provided that at least one is loosely associated with the disease ($p < 0.10$). We then compare the likelihood of the data under the model

$$\log(\text{Odds}) = A$$

(the base model) to the likelihood of the data under the model

$$\log(\text{Odds}) = A + B,$$

as well as to the likelihood of the data under the full model, to see if there is improvement in fit, while accounting for the main effect of locus *A*.

		Gene A				
		IL13	IL1	IL4R	IL4	PPAR γ
Gene B	IL13	$p = 0.68$		$+B : p = 1.0$ $+B + A * B : p = 0.34$	(linked)	$+B : p = 0.99$ $+B + A * B : p = 0.00010$
	IL1		$p = 0.4$	$+B : p = 1.0$ $+B + A * B : p = 0.0066$		$+B : p = 0.41$ $+B + A * B : p = 0.13$
	IL4R			$p = 0.083$		$+B : p = 0.29$ $+B + A * B : p = 0.012^\dagger$
	IL4			$+B : p = 0.87$ $+B + A * B : p = 0.053$	$p = 0.83$	$+B : p = 0.98$ $+B + A * B : p = 0.04^{\dagger\dagger}$
	PPAR γ					$p = 0.015$

Table 1: Improvement in fit when adding the main effect of gene B (with or without interaction) to the main effect of gene A . The diagonal indicates the significance of gene A alone (calculated from the conditional logistic model; note that for the additive coding, this is equivalent to performing the TDT). Results are qualitatively similar under a dominant coding, except for: $^\dagger p = 0.054$ under a dominant coding; $^{\dagger\dagger} p = 0.15$ under a dominant coding.

Two different codings are used for the genotypes at the two locus: (1) a coding to represent additive effects of the alleles (genotypes coded as -1, 0 and 1 for the rare homozygous, heterozygous and common homozygous, respectively) and (2) a coding to represent a dominant effect of the rare allele (genotypes coded as 1 for the common homozygous and -1 otherwise).

Results

Results for the additive coding are summarized in Table 1. For the dominant coding, results are qualitatively similar (relative to a significance level of 5%) except when indicated. We find several instances where adding a second gene and an interaction effect to the base model significantly improves the fit of the data *while accounting for the effect of the first locus*, whereas adding only the main effect of the second locus does not. This indicates the existence of interactions between the genes at the level of risk, mainly between $PPAR\gamma$ and some interleukin genes.

ANNEXE D

Tableau XII : Interactions entre les allèles des différents gènes analysées par TDT pour l'asthme et l'atopie.

Phénotype Interaction	Asthme				Atopie			
	Fréq.	Trios	Valeur Z	Valeur p	Fréq.	Trios	Valeur Z	Valeur p
PPARG / IL4								
1 / 1	0,737	120	-1,814	0,0697	0,737	104	-1,12	0,2626
1 / 2	0,137	70	-0,011	0,9913	0,137	57	-0,586	0,5578
2 / 1	0,107	72	2,331	0,0198	0,107	63	2,033	0,0420
2 / 2	0,020	17	0,556	0,5779	0,020	12	0,205	0,8375
PPARG / IL4RA								
1 / 1	0,789	116	-2,789	0,0053	0,789	98	-2,458	0,0140
2 / 1	0,119	75	1,86	0,0630	0,119	63	0,14567	0,1457
1 / 2	0,083	54	1,148	0,2509	0,083	46	0,27005	0,2701
2 / 2	0,009	8	n/d	n/d	0,009	8	n/d	n/d
PPARG / IL1B								
1 / 1	0,655	136	-0,342	0,7324	0,655	111	0,297	0,7664
1 / 2	0,218	110	-1,653	0,0984	0,218	92	-2,072	0,0382
2 / 1	0,092	67	1,842	0,0655	0,092	54	1,629	0,1033
2 / 2	0,035	28	1,915	0,0555	0,035	23	1,588	0,1123
PPARG / IL13								
1 / 1	0,653	138	-2,223	0,0262	0,653	117	-1,602	0,1092
1 / 2	0,219	107	0,531	0,5956	0,219	91	0,213	0,8312
2 / 1	0,089	66	3,016	0,0026	0,089	56	2,436	0,0149
2 / 2	0,038	29	-0,255	0,7990	0,038	23	-0,279	0,7803
IL4 / IL4RA								
1 / 1	0,759	95	-1,776	0,0757	0,759	77	-1,289	0,1975
2 / 1	0,150	74	0,326	0,7442	0,150	60	-0,368	0,7130
1 / 2	0,082	52	2,346	0,0790	0,082	44	2,425	0,0153
2 / 2	0,009	7	n/d	n/d	0,009	7	n/d	n/d
IL4 / IL1B								
1 / 1	0,618	137	0,0808	0,4192	0,618	115	1,87	0,0614
1 / 2	0,222	11	-1,048	0,2944	0,222	92	-1,693	0,0905
2 / 1	0,128	67	-0,069	0,9451	0,128	54	-0,953	0,3408
2 / 2	0,032	24	0,395	0,6928	0,032	20	0,601	0,5477

Tableau XII (suite)

II.4 / II.13								
1 / 1	0,685	120	-0,148	0,8821	0,685	101	0,102	0,9187
1 / 2	0,155	90	0,283	0,7773	0,155	79	0,199	0,8424
2 / 1	0,105	57	0,267	0,7896	0,054	29	-0,421	0,6740
2 / 2	0,054	33	-0,565	0,5722	0,105	48	-0,12	0,9042
II.4RA / II.1B								
1 / 1	0,672	129	-0,464	0,6427	0,672	106	0,173	0,8624
1 / 2	0,235	114	-0,688	0,4915	0,235	95	-1,413	0,1575
2 / 1	0,071	46	2,355	0,0185	0,071	40	2,077	0,0378
2 / 2	0,023	17	-0,467	0,6406	0,023	15	0,005	0,9957
II.4RA / II.13								
1 / 1	0,664	124	-1,204	0,2286	0,664	103	-0,912	0,3620
1 / 2	0,243	111	0,085	0,9323	0,244	93	-0,188	0,8511
2 / 1	0,076	47	1,548	0,1267	0,076	41	1,516	0,1295
2 / 2	0,017	14	1,135	0,2564	0,017	13	0,888	0,3747
II.1B / II.13								
1 / 1	0,538	142	0,576	0,5611	0,538	119	1,118	0,2637
1 / 2	0,207	102	0,194	0,8458	0,207	85	0,119	0,9052
2 / 1	0,200	108	-1,162	0,2453	0,200	93	-1,452	0,1464
2 / 2	0,055	44	0,51	0,6103	0,055	37	-1,04	0,9680

