

MARIE-HÉLÈNE LAMBERT

**ÉTUDE D'ASSOCIATION GÉNÉTIQUE ENTRE LE GÈNE *FLG* ET LES GÈNES DE SA  
VOIE BIOLOGIQUE ET LES MALADIES ATOPIQUES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval  
comme exigence partielle du programme de maîtrise en médecine expérimentale  
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 DE LA SANTÉ  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI  
SAGUENAY

2012

## RÉSUMÉ

Le gène filaggrine (*FLG*) a beaucoup été étudié pour son implication au niveau de la dermatite atopique (DA) et de l'asthme. Le but de l'étude est d'effectuer une étude d'association entre *FLG* ainsi que le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*) avec l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique avec ou sans présence de DA dans quatre études d'asthme indépendantes. L'étude d'association a aussi été exécutée avec des gènes de la voie biologique de *FLG* ayant une fonction documentée au niveau de sa transcription. Une analyse combinée de quatre études d'asthme indépendantes a également été réalisée. Finalement, une étude d'interaction a été exécutée entre les polymorphismes des gènes de cette voie biologique. Les résultats montrent des associations significatives pour le gène POU classe 2 homeobox 3 (*POU2F3*) avec les différents phénotypes atopiques. Ces résultats suggèrent l'importance de considérer la voie biologique des gènes d'intérêt dans les études d'association en suite logique à l'approche par gène candidat. Cette approche peut conduire à la découverte de nouveaux gènes associés aux maladies atopiques ce qui aiderait à mieux définir la biologie moléculaire de ce trait.

## AVANT PROPOS

Cette étude se consacre à un problème grandissant au niveau mondial ; l'augmentation de la prévalence des maladies atopiques. Cette problématique amène beaucoup de chercheurs à concentrer leurs efforts pour trouver les causes de ces différentes maladies et ainsi pouvoir mieux les prévenir, les diagnostiquer et les traiter. Le premier chapitre de la présente étude relate les connaissances acquises jusqu'à maintenant au sujet de l'asthme et de la DA, deux maladies atopiques dont la prévalence ne cesse d'augmenter.

L'étude se concentre sur un gène dont plusieurs ont démontré l'implication au niveau des maladies atopiques, filaggrine (*FLG*), qui est présenté au chapitre 2. Dans le cadre de l'étude, la voie biologique de *FLG* a aussi été explorée, plus précisément en ce qui concerne les gènes impliqués au niveau de sa transcription. Ces gènes qui régulent l'expression de *FLG* pourraient avoir un impact sur le développement des différentes maladies atopiques étudiées. L'article qui fait suite à ces recherches est présenté au chapitre 3 et n'a pas encore été soumis pour publication.

Ce projet a été fait avec la collaboration de plusieurs chercheurs. Ma participation pour l'article est à titre de première auteure. J'ai donc rédigé le manuscrit et j'ai aussi effectué l'analyse des résultats provenant des quatre échantillons. De plus j'ai effectué l'étude d'association pour la collection familiale originaire du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ). Émmanuelle Bouzigon et Florence Demenais sont les principales chercheuses de l'échantillon *Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma* (EGEA) et Marie-Hélène Dizier a effectué l'étude d'association pour cet échantillon. Ils ont aussi participé à la révision du manuscrit. Anne-Marie Madore a effectué l'étude de valeurs *p* combinées ainsi que l'étude d'interaction gène-gène pour l'échantillon SLSJ et a participé à la révision du manuscrit. Yohan Bossé est le premier stagiaire postdoctorale a avoir initié les

recherches sur le gène *FLG*. Anita L. Kozyrskyj et Allan Becker sont les principaux chercheurs de l'échantillon *The Study of Asthma genes and the Environment* (SAGE). Peter Paré est l'un des principaux chercheurs de l'échantillon *The Canadian Asthma Primary Prevention Study* (CAPPS). Denise Daley a effectué l'étude d'association pour les échantillon SAGE et CAPPS. De plus, Ils ont tous participé à la révision du manuscrit. Catherine Laprise est la chercheure responsable de l'échantillon SLSJ en plus d'avoir effectué le design de l'étude. De plus, elle a dirigé Marie-Hélène Lambert tout au long de l'étude ainsi que toutes les étapes menant à la rédaction et l'acceptation du manuscrit.

Je voudrais profiter de ces pages pour remercier ma directrice de maîtrise, **Catherine Laprise** sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. J'ai beaucoup apprécié toutes les connaissances qu'elle m'a transmises tout au long de ce processus et surtout la disponibilité qu'elle avait malgré son horaire chargé. Elle a toute mon admiration pour la ténacité qu'elle met à son travail. Loin d'être une corvée, ce dernier nous apparaît être une véritable passion. Je me demande souvent comment elle fait pour atteindre ses objectifs mais elle y parvient.

Je voudrais aussi remercier **AllerGen** qui m'a soutenu financièrement tout au long de ce projet et aux chercheurs du programme A qui m'ont permis d'avoir accès aux autres échantillons canadiens pour effectuer les associations dans des études indépendantes. Sans leur collaboration le projet aurait été beaucoup plus ardu à réaliser.

Une maîtrise est un long processus et demande beaucoup de travail et d'acharnement. Pour y parvenir il faut bien entendu une équipe en mesure de nous soutenir, de nous encadrer et de nous guider à travers les différentes étapes. Je tiens donc à remercier **Anne-Marie Madore** sans qui ce travail aurait été beaucoup plus laborieux pour moi. La facilité qu'il y avait à communiquer avec elle et l'aisance qu'il y avait pour parler, bien entendu du travail, mais aussi de toutes

les petites choses de la vie étaient grandement appréciées. Je me souviendrai toujours des nombreux fous rires après de longues journées de travail ! J'aimerais aussi remercier **Vanessa** et **Annie**, étudiantes au baccalauréat et à la maîtrise, sans qui ce périple n'aurait certainement pas été le même. Nos dîners à parler des sujets de l'heure ou à délirer sur tout autre chose ainsi que nos soirées nachos sont gravés dans ma mémoire. C'était bien de pouvoir décompresser avec vous !

Bien entendu je voudrais aussi remercier les personnes qui prennent une place très importante dans ma vie, mes parents **Serge** et **Josiane** ainsi que mon frère **Jérôme**. Votre soutien a toujours été présent, même dans les moments un peu plus difficiles vous avez toujours su trouver les mots justes pour me donner la force de continuer. Votre présence dans ma vie est des plus importante! Vous avez toujours su me conseiller et me guider dans la bonne voie et pour ça je vous serai éternellement reconnaissante. Merci aussi à mes amies **Linda**, **Julie** et **Josiane** qui m'ont supportée tout au long de ces deux années. Je sais que parfois vous trouviez abstrait tout ce que je vous contais sur mon travail. Par contre, vous avez toujours été là pour m'écouter, pour m'encourager et vous avez toujours su montrer de l'intérêt pour ce que je faisais. Vous étiez aussi très précieuses pour me faire décrocher un tantinet lorsque c'était le temps !

Merci mille fois, car sans vous ce projet n'aurait jamais vu le jour !

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
AVANT PROPOS .....	iii
TABLE DES MATIÈRES .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	viii
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 MALADIES ATOPIQUES .....	4
1.1 Contexte de l'étude .....	4
1.2 Pandémie atopique .....	4
1.3 Dermatite atopique .....	5
1.3.1 Phénotypes .....	5
1.3.2 Facteurs génétiques .....	7
1.3.3 Facteurs environnementaux .....	8
1.4 Asthme .....	8
1.4.1 Phénotype .....	8
1.4.2 Facteurs génétiques .....	10
1.4.3 Facteurs environnementaux .....	11
1.4.4 Interactions GxG et GxE .....	12
CHAPITRE 2 LES MEMBRES DE LA FAMILLE FILAGGRINE .....	14
2.1 Le gène filaggrine .....	14
2.1.1 Contexte biologique .....	14
2.2 Le gène membre 2 de la famille filaggrine .....	17
2.3 La voie biologique de <i>FLG</i> .....	17
2.3.1 Distal-less homeobox 3 caractères ( <i>DLX3</i> ) .....	17
2.3.2 Jun proto-oncogène ( <i>JUN</i> ) .....	18
2.3.3 Tumor protein p63 ( <i>TP63</i> ) .....	18
2.3.4 Pou classe 2 homeobox 1 ( <i>POU2F1</i> ) .....	18
2.3.5 Pou classe 2 homeobox 3 ( <i>POU2F3</i> ) .....	19
2.3.6 Pou classe 3 homeobox 1 ( <i>POU3F1</i> ) .....	19
CHAPITRE 3 ARTICLE .....	20
3.1 Résumé .....	20
3.2 Introduction .....	23
3.3 Methods .....	25
3.3.1 Approach .....	25
3.3.2 Asthma studies .....	25
3.3.3 Exploratory results in the SLSJ collection .....	28
3.3.4 Association analyses between <i>FLG</i> and genes involved in its transcription and asthma related phenotypes .....	29
3.4 Results .....	31
3.5 Discussion .....	33
3.6 References .....	35

CHAPITRE 4 DISCUSSION .....	46
4.1 Étude d'association pangénomique (GWAS) .....	46
4.1.1 Validation des résultats.....	48
4.2 Perspectives.....	51
4.2.1 Conclusion.....	52
BIBLIOGRAPHIE.....	53

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1</b> : Filaggrine : Du chromosome à la cellule.....	15
<b>FIGURE 2</b> : A schematic model of the <i>FLG</i> biological pathway.....	45



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table I</b> : Characteristics and distribution of the studied phenotypes in the four samples.....	40
<b>Table II</b> : Clinical characteristics of the Saguenay–Lac-Saint-Jean subjects.....	42
<b>Table III</b> : Association of <i>FLG</i> tagSNPs with asthma, atopy and atopic asthma phenotypes.....	43
<b>Table IV</b> : Associations between <i>FLG2</i> and <i>POU2F3</i> genes and asthma related phenotypes co-occurring with atopic dermatitis in the SLSJ, the EGEA or the four samples combined.....	44

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ARB2 : Gène  $\beta_2$ -adrenoceptor  
 CAPPS : *The Canadian Asthma Primary Prevention Study*  
 CD14 : Gène de la molécule CD14  
 CMA1 : Gène cellule mastocyte, chymase 1  
 CP<sub>20</sub> : Concentration de métacholine nécessaire pour provoquer une chute de 20% du VEMS.  
 CTLA4 : Gène cytotoxic T lymphocyte antigène 4  
 DA : Dermatite atopique  
 DLX3 : Gène *Distal-less homeobox 3*  
 EGEA : *The Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma*  
 FBAT : Test d'association basé sur les familles  
 FCER1B : Gène de la sous-unité  $\beta$  du récepteur à grande affinité d'IgE  
 FDR : *False discovery rate*  
 FLG : Gène filaggrine  
 GSDMB : Gène *gasdermin B*  
 GWAS : Étude d'association pangénomique  
 IgE : Immunoglobuline E  
 IL : Interleukine  
 IL1LR1 : Gène interleukine 1 *receptor-like 1*  
 IL4 : Gène interleukine 4  
 IL4R : Gène chaîne alpha du récepteur de l'interleukine 4  
 IL9 : Gène interleukine 9  
 IL12RB1 : Gène récepteur B1 de l'interleukine 2  
 IL13 : Gène interleukine 13  
 JUN : Gène jun proto-oncogène  
 KLK7 : Gène *kallikrein-related peptidase 7*  
 MBL : Gène *mannose-binding lectin*  
 MS4A2 : Gène *membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2*  
 ORMDL3 : Gène *ORM1-like 3 (S. cerevisiae)*  
 PGMDR : *Pedigree-based generalized multifactor dimensionality reduction*  
 POU3F1 : Gène POU classe 3 homeobox 1  
 POU2F1 : Gène POU classe 2 homeobox 1  
 POU2F3 : Gène POU classe 2 homeobox 3  
 RA : Rhinite allergique  
 SAGE : *The Study of Asthma Genes and the Environment*  
 SFTP : La famille des *S100 fused-type* protéine  
 SLSJ : Collection familiale originaire du Saguenay–Lac-Saint-Jean  
 SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide  
 SPINK5 : Gène *serine peptidase inhibitor, Kazal type 5*  
 TARC : Gène *thymus and activation-regulated chemokine*  
 TDT : Test de déséquilibre de transmission

Th2 : T helper de type 2

*TNF- $\alpha$*  : Gène facteur de nécrose tumorale

*TNF- $\beta$*  : Gène lymphotoxine

*TLR* : Gène *toll-like receptor*

*TLR2* : Gène *toll-like receptor 2*

*TP63* : Gène de la *tumor protein p63*

VEMS : Volume expiratoire maximal en une seconde

*ZBP2* : Gène *zona pellucida binding protein 2*

## INTRODUCTION

Le gène filaggrine (*FLG*) code pour une protéine, la profilaggrine, qui joue un rôle important au niveau de la différenciation épithéliale. Plusieurs études démontrent que le manque d'expression de *FLG* peut être un facteur déterminant pour différentes maladies atopiques, telles que la dermatite atopique (DA) ou encore l'asthme (1-3). L'expression de *FLG* est orchestrée par plusieurs gènes. Un défaut dans ceux-ci pourrait influencer le niveau d'expression de *FLG* et donc avoir un impact au niveau des maladies atopiques (4, 5). Le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*) quant à lui est très peu étudié, mais il aurait une fonction semblable à celle de *FLG* (6). Ce gène serait donc intéressant à considérer en ce qui a trait aux maladies atopiques. Jusqu'à aujourd'hui, des études ont démontré l'implication de *FLG* comme facteur de risque majeur pour la DA (2). En ce qui concerne l'asthme, les études démontrent que *FLG* serait impliqué lorsque l'asthme est en cooccurrence avec la DA (7). *FLG* serait donc un gène clé pour le développement de maladies atopiques et pourrait être important comme marqueur biologique pour ces différentes maladies.

L'objectif de cette recherche était d'effectuer une étude d'association et d'interaction, entre les membres de la famille filaggrine (*FLG* et *FLG2*) et les maladies atopiques (asthme, atopie et asthme allergique) ainsi que ces maladies en cooccurrence avec la DA. Ces analyses ont aussi été effectuées pour les gènes sélectionnés, impliqués dans la voie biologique de *FLG* et ont été réalisées dans quatre études d'asthme indépendantes. De plus, une analyse combinée des quatre échantillons a également été réalisée en utilisant la méthode de Stouffer pour combiner les valeurs *p* pour l'étude d'association selon l'importance relative de chaque échantillon.

Une étude d'association pangénomique (GWAS) a été exécutée dans la collection familiale originaire du Saguenay—Lac-Saint-Jean (SLSJ), qui comporte 253 probands asthmatiques et 1031 membres de leur famille. Les polymorphismes couvrant ces gènes ont été extraits. Les gènes impliqués dans la voie biologique de *FLG* ont été ciblés à l'aide de mots clés tels que «*FLG pathway*», «*FLG transcription*», «*FLG expression*» et «*FLG phosphorylation*». Ainsi, les gènes *jun* proto-oncogene (*JUN*), POU classe 2 homeobox 3 (*POU2F3*), POU classe 2 homeobox 1 (*POU2F1*), POU classe 3 homeobox 1 (*POU3F1*), tumor protein p63 (*TP63*) et distal-less homeobox 3 (*DLX3*) ont été choisis pour l'étude d'association. *JUN* code pour le facteur de transcription c-jun qui stimule de manière positive la transcription de *FLG*. *POU2F3* (*skn1a*), *POU2F1* (*oct1*) et *POU3F1* (*oct6*) ont un impact soit positif ou négatif sur la transcription de *FLG*, en se liant à un site de liaison à proximité de son promoteur (4, 5). *TP63* code pour le facteur de transcription p63 qui se retrouve sous plusieurs isoformes, dont  $\Delta Np63\alpha$ . Celle-ci, lorsque surexprimée, bloque l'expression de *FLG* (8, 9). Finalement, *DLX3* produit une protéine, qui lorsque exprimée, dans la couche basale de l'épiderme, induit la transcription prématurée de *FLG* (5, 10).

L'étude d'association a été exécutée avec le programme FBAT (*Family based association tests*) (11, 12). Pour la correction des résultats la méthode de Nyholt et celle de Li et Ji ont été utilisées (13, 14). L'étude de valeurs *p* combinées pour les quatre échantillons a été effectuée selon la méthode de Stouffer. L'étude d'interaction a été effectuée avec l'application UNPHASED (15). La méthode *false discovery rate* (FDR) a été utilisée pour la correction des résultats d'interaction (16). Ces analyses ont également été faites dans trois études indépendantes : *The Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma* (EGEA), *The Study of Asthma Genes and the Environment* (SAGE) et *The Canadian Asthma Primary Prevention Study* (CAPPS). EGEA est une combinaison d'une cohorte cas-témoins et d'une cohorte familiale. Un total de 1854 sujets, dont 348 sujets

asthmatiques provenant de cinq villes en France ont été recrutés (17). Dans le cas de SAGE, la cohorte est dérivée d'une cohorte populationnelle de 16 320 enfants nés au Manitoba en 1995. En 2002, un questionnaire sur la santé de ces enfants a été envoyé aux parents. De ceux qui ont répondu, 723 trios familiaux ont été recrutés pour former la cohorte (18). Finalement, pour CAPPS, 545 enfants ayant un haut risque de développer l'asthme et leurs parents ont été recrutés lors du troisième trimestre de grossesse dans deux centres, soit Vancouver et Winnipeg (18).

Cette étude a permis de démontrer une association entre *POU2F3* et l'atopie ainsi que l'asthme allergique, tous deux en présence de DA dans l'échantillon EGEA. De plus, une tendance d'association a été observée entre le gène *FLG2* et les différents phénotypes atopiques étudiés dans l'échantillon de SLSJ (ces associations ne résistent pas à la correction imposée). L'étude de valeurs *p* combinées a permis de déceler une association positive avec *POU2F3* et la DA.

Cette étude suggère que l'étude de la voie biologique de gènes candidats est une approche efficace dans l'étude génétique de traits complexes. Elle a permis dans la présente étude d'associer un nouveau gène, *POU2F3*, aux phénotypes atopiques, ce qui pourrait mener à la suite d'études fonctionnelles à une meilleure compréhension rôle biologique de ce gène dans la physiopathologie de l'asthme. Elle apporte aussi de nouvelles connaissances au sujet de *FLG2*, un gène peu documenté jusqu'à maintenant. La présente étude démontre une forte tendance pour *FLG2* à être associé aux maladies atopiques, particulièrement lorsque celles-ci sont en présence de DA. Ceci renforce l'hypothèse que *FLG2* aurait des fonctions similaires à celles de *FLG*, puisque ce dernier est majoritairement associé en présence de DA dans la littérature scientifique.

## CHAPITRE 1

### MALADIES ATOPIQUES

#### **1.1 Contexte de l'étude**

La présente étude a pour but de faire l'étude d'association entre le gène filaggrine (*FLG*) et l'asthme. Ce gène a déjà été associé comme facteur de risque majeur dans le développement de la dermatite atopique (DA). Ainsi, dans le cadre de cette étude, six gènes impliqués au niveau de la transcription de *FLG*, ainsi que le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*), qui semble avoir des fonctions similaires à celles de *FLG*, ont été étudiés. Puisque les études d'asthme indépendantes utilisées pour l'étude présentent une prévalence élevée de maladies atopiques, une étude d'association a été réalisée pour l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique. Les analyses ont été exécutées pour ces maladies en présence ou non de DA.

#### **1.2 Pandémie atopique**

Depuis quelques décennies maintenant, la majorité des études sur le statut atopique ont rapporté une augmentation de la prévalence des maladies atopiques, certaines caractérisant même cette croissance comme une pandémie atopique (19-21). Cette affirmation est mitigée au sein de la communauté scientifique, puisque la majorité des études publiées sur ces maladies ont été basées sur des questionnaires que les sujets devaient remplir (19). Ces questionnaires amenaient un certain biais aux études, puisqu'il était possible que les individus manquent d'objectivité ou encore que des erreurs de mémoire se produisent (19). Par contre, l'augmentation de la mortalité associée aux maladies atopiques, ainsi que l'augmentation des coûts directs et indirects liés à ces traits ne pouvaient être

niées (19, 22-25). De plus, malgré le scepticisme de certains, aucune étude n'a été en mesure de réfuter cette affirmation (19).

La raison de cette augmentation au niveau de la prévalence des maladies atopiques demeure toutefois à préciser. Par ailleurs, certains facteurs sont indiqués dans la littérature et, les facteurs génétiques et environnementaux joueraient un rôle prépondérant. En effet, plus de 300 gènes de susceptibilités ont été associés à l'asthme et l'atopie (23, 26). L'augmentation de la pollution, le manque d'exercice, le changement de diète, le stress ainsi que le tabac, l'exposition aux allergènes et l'utilisation de différentes médications seraient également en cause (19, 27). De plus, un effet synergique entre deux facteurs de risques auxquels un individu a été exposé pourrait se produire. Il est alors question d'une interaction, soit entre un facteur génétique et un facteur environnemental (GXE), soit entre deux facteurs génétiques (GXG) ou encore entre deux facteurs environnementaux (EXE) (28, 29).

Les études rapportent qu'un enfant sur trois dans les pays développés serait atteint de l'une des maladies atopiques (20). Ces maladies atopiques comprennent principalement la DA (qui regroupe l'eczéma et l'urticaire) ainsi que l'asthme allergique (20).

## **1.3 Dermatite atopique**

### **1.3.1 Phénotypes**

La DA est une maladie inflammatoire chronique de la peau ; la peau est alors sèche, irritée, épaisse, rugueuse et elle cause des démangeaisons (21, 30). Elle est la huitième maladie la plus commune chez les personnes de moins de 25 ans (30). Sa prévalence est difficile à évaluer puisqu'elle varie énormément entre les différents pays. Par contre, il semble qu'une prévalence élevée soit corrélée avec les régions industrialisées (31). En fait, cette maladie toucherait



environ 30 % des enfants et 10% des adultes dans les pays développés (32). Cette observation laisse supposer que l'environnement jouerait un rôle important pour le déclenchement et l'expression clinique et les manifestations cliniques de la maladie (21, 30).

Cette condition atopique est associée à un niveau élevé d'immunoglobuline (Ig) E, lequel serait causé par un dérèglement au niveau de la réponse immunitaire des lymphocytes T, particulièrement du type *T helper 2* (Th2). Il s'agit non seulement d'une maladie de la peau, mais aussi d'une condition atopique qui serait en fait le premier pas de la marche atopique (30). La marche atopique est définie tout d'abord par une sensibilisation primaire, par exemple par un aéroallergène. Cette sensibilisation provoque une réaction atopique locale, qui peut se transformer en réaction atopique systémique. La première étape serait une réaction d'eczéma et une respiration sifflante en début de vie (20, 33). Puis, pour 70% des enfants atteints, il y aurait ensuite développement de rhinite allergique (RA) et enfin, pour 50% de ceux-ci, le développement d'asthme (30). Ces conditions atopiques font partie de la triade atopique et elles ont toutes en commun un niveau élevé d'IgE (34).

La DA est donc considérée comme le point d'entrée ou la première phase pour les autres maladies de la triade atopique. En effet, la peau fragilisée permettrait l'entrée d'aéroallergènes qui causeraient une réponse atopique démesurée. Celle-ci provoquerait une augmentation du niveau d'IgE, le recrutement et l'activation d'éosinophiles, de macrophages et de lymphocytes T (20, 27). Tous ces éléments étant impliqués dans le développement de l'asthme, il serait donc logique de supposer que la DA serait un facteur de risque pour l'asthme (21, 27, 33).

### 1.3.2 Facteurs génétiques

La découverte qu'une histoire familiale de DA est l'un des facteurs de risques les plus importants pour le développement de celle-ci souligne l'importance de l'hérédité pour le développement de ce trait (35). Selon l'étude de Bieber, lorsque l'un des parents était atteint de DA, l'incidence pour sa progéniture était doublée, alors que si les deux parents étaient atteints de DA, l'incidence était triplée pour leurs enfants (35). Une étude avec des couples de jumeaux suggérait également que la DA se développait chez les individus ayant une susceptibilité génétique à son développement (36). Plusieurs études génétiques ont donc tenté de découvrir des gènes de susceptibilités pour le développement de la DA.

Quelques études se sont concentrées sur les gènes ayant un impact au niveau de la réponse immunitaire. À titre d'exemple plusieurs cytokines ont été associées avec la DA dont l'interleukine (*IL*) 4, le récepteur B1 de l'*IL*12 (*IL12RB1*), l'*IL*13 et l'*IL*18. Plusieurs polymorphismes (SNP) du récepteur de l'*IL*4 (*IL4R*) ont aussi été associés significativement à la DA dans plusieurs populations différentes (25). Le toll-like récepteur 2 (*TLR2*) a aussi été associé significativement à une augmentation du risque de développer une DA sévère de même que le gène cellule mastocyte, chymase 1 (*CMA1*). Par contre, ces résultats n'ont pas été répliqués dans d'autres populations. (25).

D'autres gènes qui ne sont pas impliqués au niveau de la réponse immunitaire ont aussi été étudiés. Des mutations au niveau de l'inhibiteur serine peptidase, kazal type 5 (*SPINK5*) ont été associées significativement à la DA dans une étude britannique et deux études japonaises (37). Ce gène est responsable du syndrome de Netherthon, une maladie qui est habituellement accompagnée d'atopie (38). Le gène kallikrein-related peptidase (*KLK7*), qui est impliqué dans le processus de desquamation, pouvant causer une barrière épithéliale défectueuse, a lui aussi été associé avec la DA dans une étude britannique (37). Enfin, le gène

*FLG* a également été associé à la DA à plusieurs reprises dans différentes populations (5, 37).

### **1.3.3 Facteurs environnementaux**

Les facteurs environnementaux jouent aussi un rôle important pour le déclenchement ou l'aggravation des symptômes de la DA. En effet, il a été démontré que l'inhalation d'allergènes peut déclencher la réponse immunitaire au niveau de la peau d'une personne atteinte de DA (39). Par exemple, le pollen est reconnu pour provoquer une récurrence ou une aggravation des symptômes liés à la DA (30). Le contact avec la nourriture peut aussi accroître les manifestations de la DA. De plus, ce contact peut aussi être responsable du déclenchement d'épisodes isolés et imprévisibles de DA (30). Les aliments suivants sont principalement responsables, bien que non exclusifs, d'un tel type de réaction : le fromage, le chocolat, le soja et le yaourt (39). Il a aussi été démontré qu'un poids élevé à la naissance pouvait augmenter le risque de développer la DA dans la première année de vie (30).

## **1.4 Asthme**

### **1.4.1 Phénotype**

L'asthme est une maladie très répandue. Elle touche les personnes de toutes nationalités et de tous âges (40). On estime qu'environ 300 millions de personnes sont atteintes d'asthme dans le monde (40). La définition traduite de l'asthme selon *The global initiative for asthma* (GINA) est la suivante (40) :

L'asthme est une maladie inflammatoire et chronique des voies respiratoires dans laquelle plusieurs cellules et éléments cellulaires (cytokines et chimiokines) jouent un rôle. L'inflammation chronique associée à une hyperréactivité des voies respiratoires mènent à des épisodes récurrents de sifflements, d'essoufflements, d'oppression thoracique et de toux. Ces épisodes sont habituellement associés avec une obstruction variable du passage de l'air qui est souvent réversible soit spontanément ou avec traitement.

L'asthme comporte une hyperréactivité bronchique (HBR) causée par un *stimulus* tel que l'exercice physique ou encore l'exposition à un allergène (40). L'HBR est caractérisée par une inflammation et un remodelage au niveau des voies aériennes (40, 41). Le remodelage de la muqueuse bronchique est la somme de plusieurs évènements physiopathologiques, dont l'épaississement apparent de la membrane basale causé par un dépôt de collagène suite à l'activation des fibroblastes (41). L'hypersécrétion de mucus, la desquamation de l'épithélium, l'infiltration d'éosinophiles et de lymphocytes de même qu'une hyperplasie et une hypertrophie du muscle lisse bronchique font aussi partie de ces évènements physiopathologiques causant la transformation de la muqueuse bronchique (41-43).

Le processus inflammatoire menant à ces changements n'est toujours pas complètement élucidé. Jusqu'à maintenant, la majorité s'accorde pour dire que l'asthme est une réponse immunitaire qui provoque un remodelage des voies respiratoires contrôlé en majeure partie par les lymphocytes Th2 (44). En fait, plusieurs cellules inflammatoires et médiatrices sont impliquées dans les changements physiopathologiques de l'asthme (40). En général, une augmentation de mastocytes activés est observée (40, 44). Ceux-ci sont activés par un allergène ou encore par un *stimulus* osmotique, par exemple une bronchoconstriction induite par l'exercice. Les mastocytes libèrent alors des médiateurs bronchoconstricteurs, tel que l'histamine. Ceci peut être lié à une HBR (dans la majorité des cas) (40). L'augmentation en nombre d'éosinophiles activés est aussi observé. Les éosinophiles vont libérer des protéines qui seraient en mesure d'endommager les cellules épithéliales des voies respiratoires. Le nombre de lymphocytes Th2 est lui aussi augmenté. Ceux-ci libèrent des cytokines spécifiques dont l'*IL4*, *IL5*, *IL9* et *IL13* qui gèrent l'inflammation éosinophilique et la production d'IgE par les lymphocytes B (40, 44). Ces lymphocytes Th2 sont responsables de l'initiation et du maintien de l'inflammation des voies respiratoires (27).

Le mécanisme du développement de l'asthme est quelque peu différent lorsque l'individu présente une atteinte de DA, particulièrement lorsqu'il présente une peau encore plus endommagée (45). Par exemple, pour 90% des personnes atteintes, une colonisation chronique de *S. aureus* survient. Ce type de dommage supplémentaire provoque une réponse immunitaire plus forte et donc une inflammation Th2 exagérée (45). Ceci peut amener à une réponse Th2 systémique, c'est-à-dire que les cellules sensibilisées aux allergènes au niveau de la peau ne seront pas spécifiques à cet organe. Ils seront donc en mesure de sensibiliser les autres cellules inflammatoires (mastocytes et cellules dendritiques par exemple) dans le corps (46). Les cellules de Langerhans, cellules dendritiques présentatrices d'antigène de la peau, vont capter et traiter les allergènes rencontrés. Ces cellules migreront ensuite vers les ganglions lymphatiques où elles vont interagir avec des cellules T naïves pour induire une immunité Th2 ce qui mènera à une sensibilisation atopique systémique (45).

#### **1.4.2 Facteurs génétiques**

Les études familiales et de jumeaux ont encore une fois permis de démontrer l'importance de la génétique pour le développement de l'asthme (23). Jusqu'à maintenant plus de 18 régions génomiques ont été associées significativement à l'asthme et à l'allergie et plus de 300 gènes ont été associés avec l'asthme ou une condition reliée à l'asthme, principalement grâce à l'avènement des études d'association pangénomique (GWAS) (23, 26, 47, 48). Quelques régions chromosomiques sont constamment répliquées dans plusieurs études sur la génétique de l'asthme, parmi celles-ci, les régions 5q31-33, 6p21, 12q13-q24 (23, 49).

Plus précisément, l'asthme a été associé avec plusieurs gènes impliqués dans le processus inflammatoire, par exemple, la molécule CD14 (*CD14*), *IL4* et interleukin 1 receptor-like 1 (*IL1LR1*) (50). Les cytokines *IL13* et *IL4R* ont aussi été

associées significativement avec l'asthme (51). La première étude d'association pangénomique effectuée sur l'asthme a apporté de nouveaux gènes candidats, *ORM1-like 3* (*S. cerevisiae*) (*ORMDL3*), *gasdermin B* (*GSDMB*) et *zona pellucida binding protein 2* (*ZPBP2*) qui depuis ont été associés dans plusieurs autres études (23, 52, 53). Un autre gène a beaucoup retenu l'attention depuis plusieurs années ; *FLG*. Des mutations se trouvant sur le gène *FLG* ont été trouvées comme facteur majeur concernant le développement de la DA et comme facteur prédisposant au développement de maladies atopiques secondaires telles que l'asthme et la rhinite allergique (RA) (3, 54, 55).

### 1.4.3 Facteurs environnementaux

Il a été démontré par plusieurs études que différents facteurs environnementaux pouvaient avoir un impact sur le déclenchement ou l'aggravation des symptômes reliés à l'asthme (40). Les effets néfastes de l'exposition à la fumée de cigarette ont aussi été démontrés pour les sujets asthmatiques. L'exposition à la fumée de cigarette serait associée à l'augmentation de la sévérité de l'asthme et diminuerait l'effet des thérapies inhalées. De plus, il a été démontré que si la femme fume lorsqu'elle est enceinte, il y a augmentation du risque de développement de symptômes reliés à l'asthme pour le bébé en début de vie. Le même principe a été observé lorsque le bébé est exposé à la fumée de cigarette après sa naissance (23, 40). L'exposition à certains allergènes intérieurs ou extérieurs, a elle aussi été associée à l'aggravation de la condition asthmatique. L'exposition à la poussière et aux squames de chat ou de chien font partie de ces allergènes (40).

L'augmentation de la prévalence de l'asthme semble se produire principalement au niveau des sociétés industrialisées (40). Cette observation serait appuyée sur l'hypothèse de l'hygiène (40, 56). En effet, l'amélioration de l'hygiène dans ces pays, combinée à l'amélioration des mesures de santé, l'utilisation de vaccins et de plus grandes quantités de médicaments, réduirait le nombre

d'infections et seraient responsables de cette augmentation selon plusieurs (40). Ces infections avaient pour rôle de stimuler de manière non spécifique le système immunitaire dans le but de convertir le biais prédominant de la réponse immunitaire Th2 chez les enfants vers une réponse de type Th1 (56). La réduction du nombre des infections diminuerait donc la stimulation du système immunitaire qui garderait alors le biais envers la réponse immunitaire de type Th2 et ainsi augmenterait le risque de développement de maladies atopiques, tel que l'asthme (40, 56). Certains faits appuient cette hypothèse. Par exemple, il a été démontré que l'exposition en bas âge aux animaux de ferme ou à un environnement rural protégerait l'enfant contre le développement de symptômes reliés à l'asthme (23, 27). Le même principe a été observé pour les enfants qui fréquentent des garderies, où ils sont exposés à plusieurs agents infectieux (40, 56).

#### **1.4.4 Interactions GxG et GxE**

L'asthme est reconnu comme un trait complexe, c'est-à-dire qu'il dépend à la fois de facteurs génétiques et environnementaux interagissant entre eux (interactions gène-gène (GXG) et gène-environnement (GXE)) (7). Ces interactions expliqueraient, du moins en partie, la différence au niveau de la prévalence entre les pays et aussi le fait qu'une association génétique dans une étude n'est pas répliquée dans une autre (22).

Ainsi, en 2004 l'équipe de Howard a mis en évidence une interaction significative avec l'asthme entre *IL4R*, qui a déjà été associé à l'asthme, et *IL13* (57). Une interaction significative a aussi été observée entre deux gènes ayant déjà été associés avec l'asthme; le facteur de nécrose tumorale (*TNF- $\alpha$* ) et le gène codant pour la lymphotoxine (*TNF- $\beta$* ). L'étude de Wang, en 2004, a renchérit ces résultats en démontrant qu'il y avait un effet synergique entre ces deux derniers sur le statut asthmatique atopique (57).

Une interaction significative entre le gène *IL4R* et *IL9* a été rapportée et reliée à une augmentation de la susceptibilité de développer une respiration sifflante, un des principaux symptômes de l'asthme (58). *IL4R* est déjà associé à l'asthme et à l'atopie. Quant au gène *IL9*, il utilise des voies biologiques de signallement communes avec celles d'*IL4R* (58). En 2005, une étude tentait de trouver des interactions entre douze polymorphismes couvrant huit gènes candidats qui sont considérés associés à l'asthme et/ou à l'atopie; *IL13*, *CD14*, le gène *thymus and activation-regulated chemokine (TARC)*, le gène *mannose-binding lectin (MBL)*, cytotoxic T lymphocyte antigène 4 (*CTLA4*), *IL4R*, *membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (MS4A2)*, anciennement nommé sous-unité  $\beta$  du récepteur à grande affinité d'IgE (*FCER1B*) et  $\beta_2$ -adrenoceptor (*ARB2*). Deux interactions ont été rapportées; une entre *IL4R* et *IL13* pour l'augmentation de la susceptibilité à l'asthme ainsi qu'une interaction entre *TARC* et *IL13* pour l'augmentation sérique du taux d'IgE (28).

Les interactions peuvent différer selon l'individu ou l'environnement où il se retrouve. Elles provoquent donc beaucoup de variabilités au niveau phénotypique et il est parfois difficile de bien définir la cause de la maladie. Ceci démontre l'importance des études d'interaction en ce qui concerne les traits complexes. Les études d'interaction permettent de mieux comprendre le mécanisme de ces maladies. Ces études permettent donc de considérer les expositions des sujets dans l'analyse et de surcroit, elles permettent de visualiser les raisons pouvant expliquer les non répliques d'une population à l'autre.



## CHAPITRE 2

### LES MEMBRES DE LA FAMILLE FILAGGRINE

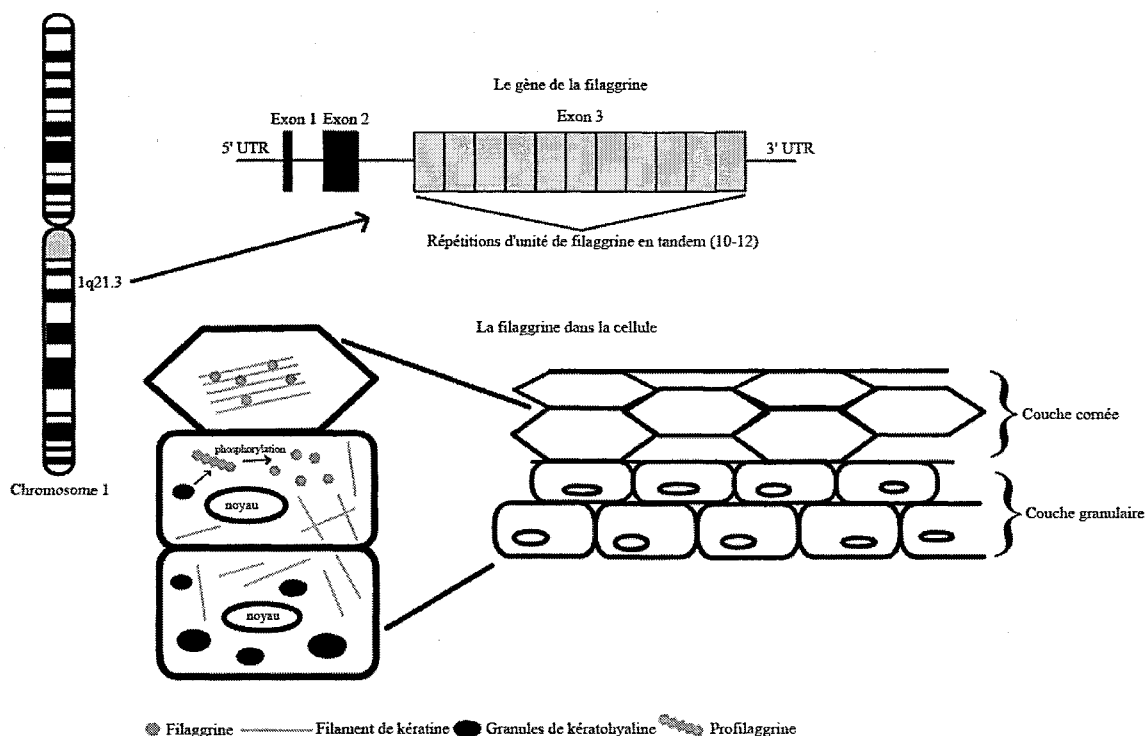
#### 2.1 Le gène filaggrine

##### 2.1.1 Contexte biologique

Le gène filaggrine (*FLG*) est de plus en plus étudié pour son implication dans les maladies à composante atopique telles que la dermatite atopique (DA) et l'asthme (32). Ce gène se retrouve sur le chromosome 1 en position 1q21.3 et fait partie de la famille des *S100 fused-type protein (SFTP)*, qui est comprise dans le complexe de différenciation épithéliale (5, 6, 59). *FLG* code pour une protéine de 500 kilodaltons, la profilaggrine (21). Cette protéine est composée de trois exons et deux introns. Le troisième exon cause beaucoup de difficultés pour son séquençage puisqu'il est composé d'une série de répétitions en tandem d'unités de filaggrine (entre dix et douze) (3, 60). La fréquence de mutations pour ce gène est élevée dans les pays industrialisés. En fait, environ 10 % de la population Nord-Américaine et de l'Europe de l'Ouest portent une mutation au niveau de *FLG* (20).

La profilaggrine joue un rôle important au niveau de la barrière épithéliale. Cette protéine se retrouve dans la couche granulaire (1, 5). Elle est la principale composante des granules de kératohyaline (2). Au départ, la profilaggrine n'est pas en mesure d'assembler les kératines. Lors de la transition entre la couche granulaire et la couche cornée de l'épiderme, la profilaggrine subit une phosphorylation et plusieurs transformations protéolytiques afin d'obtenir plusieurs

monomères de filaggrine (2, 61). Avec les kératines, la filaggrine est l'une des composantes principales de l'épiderme (21). La filaggrine se lie alors aux filaments intermédiaires de kératines, causant ainsi leur arrangement en macrofibrilles dans lesquels ils sont compactés et alignés (5, 62). Ce procédé, qui est illustré à la figure 1, est essentiel au bon fonctionnement de la barrière épithéliale. Par ailleurs, une barrière défectueuse permettrait une augmentation de l'entrée des allergènes et une imperméabilité au niveau de la peau (2).



**Figure 1 : Filaggrine : Du chromosome à la cellule.** Le gène *FLG* se situe en position 1q21.3 sur le chromosome 1, il code pour une protéine, la profilaggrine, qui est exprimée au niveau de la couche granulaire de la peau. La profilaggrine subit une phosphorylation et plusieurs transformations protéolytiques afin d'obtenir plusieurs monomères de filaggrine qui se lieront aux filaments de kératine.

## 2.1.2 Études d'associations

Jusqu'à maintenant la majorité des études se sont concentrées sur deux mutations, soit R501X et 2282del4 . Ces mutations ont été précédemment associées à *ichthyosis vulgaris*, une maladie qui cause une peau sèche et écailleuse (3). Cette maladie étant souvent associée à la DA, les recherches se sont donc basées sur les résultats obtenus dans l'étude de cette maladie pour les « extrapoler » à la DA. Plusieurs études ont ainsi découvert une association entre ces mutations ainsi que d'autres variants génétiques de la *FLG* et la DA (3, 20, 21). Quant à son implication dans l'asthme, plusieurs études ont démontré que *FLG* a été associé à l'asthme uniquement lorsqu'il est en présence de DA (20, 21, 32, 63). Par contre, la présence de variants génétiques dans *FLG* a aussi été associée à une condition asthmatique plus sévère même lorsqu'il n'est pas en présence de DA (33). La sévérité de la condition asthmatique a été déterminée en fonction de la dose de médication administrée ainsi que le type de médication utilisée (33). Il faut savoir que *FLG* n'est pas exprimé dans la barrière épithéliale bronchique et ne semble pas être exprimé dans celle des autres composantes des voies respiratoires (54, 59, 64). L'hypothèse concernant l'implication de *FLG* dans l'asthme est la suivante : une mutation au niveau de la filaggrine provoquerait une fragilité de la barrière épithéliale, les allergènes pourraient donc y pénétrer plus facilement. L'entrée d'allergènes provoquerait une réponse immunitaire Th2, ce qui initierait des réactions atopiques locales. Celles-ci pourraient mener à une sensibilisation systémique aux allergènes et provoquer une réaction exagérée lors d'un prochain contact avec un allergène. Dans ce cas, un défaut au niveau de *FLG* prédisposerait pour le développement de maladies atopiques comme l'asthme allergique (7, 20, 65).

## 2.2 Le gène membre 2 de la famille filaggrine

La famille des filaggrines comprend deux membres, *FLG* et le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*). *FLG2* est très peu documenté pour le moment. Ce gène se situe sur le chromosome 1 en position 1q21.3 et il fait partie de la famille des *S100 fused-type protein (SFTP)* tout comme *FLG* (6). L'étude de *Wu et al.* a permis de documenter l'expression de *FLG2* ainsi que les possibles fonctions qu'il occupe (6).

Cette étude a démontré que *FLG2* est exprimé non seulement au niveau de la peau, mais aussi dans le thymus, l'estomac, le placenta, les amygdales et les testicules (6). *Wu* et son équipe ont aussi démontré que tout comme *FLG*, *FLG2* était exprimé dans les cellules de la couche granuleuse de l'épiderme et était diffus dans le cytoplasme des cellules cornées. Par contre, les deux ne sont pas toujours localisés au même endroit (6). Ils ont procédé à quelques essais avec des biopsies de patients atteints de DA, pour voir s'il y avait une différence au niveau de l'immunoréactivité de *FLG2*. L'expression de *FLG2* au niveau de biopsies de peau avec lésions a été comparée avec l'expression de *FLG2* pour des biopsies de peau sans lésions de patients atteints de DA. Aucune différence n'a été remarquée, mais il est à noter que seulement trois patients ont participé à cette partie de l'étude (6). Avec leur étude, *Wu* et son équipe ont supposé que *FLG2* aurait un rôle semblable à celui de *FLG*.

## 2.3 La voie biologique de *FLG*

Les gènes sélectionnés pour l'étude d'association sont tous décrits dans cette section de même qu'à la figure 2 de la section 3. Cette figure illustre l'effet de chacun de ces gènes sur le gène *FLG*.

### 2.3.1 Distal-less homeobox 3 caractères (*DLX3*)

À l'état basal, *i.e* sans stimulation, la protéine Distal-less homeobox 3, (*DLX3*) est exprimée principalement dans les cellules de la couche granulaire, là

où se trouve la profilaggrine. Dans une étude utilisant un modèle murin, Morasso *et al.* ont analysé le rôle de *DLX3* avec la profilaggrine. La protéine *DLX3* a été exprimée dans la couche basale de l'épiderme. De profonds changements au niveau morphologique et biochimique ont été observés (10). Ils ont remarqué qu'il y avait accumulation de profilaggrine. Cette accumulation pouvait provoquer un éclatement du réseau de kératines et pouvait amener à la mort cellulaire par apoptose (5, 10). De plus, avec leur étude, ils ont décelé un site de liaison pour cette protéine au niveau du promoteur de la filaggrine (10).

### **2.3.2 Jun proto-oncogene (*JUN*)**

Le gène *JUN* code pour la protéine c-jun. Celle-ci est reconnue pour faire partie du complexe AP1 de *FLG*, un complexe essentiel pour une expression élevée de *FLG* (5). L'étude de Jang *et al.* a démontré que l'activité du promoteur de *FLG* dépend d'AP1 et particulièrement de son site en position -77 (66). Ils ont ensuite été en mesure de démontrer que la protéine c-jun interagissait avec ce site. *JUN* est donc nécessaire à une bonne transcription de *FLG* (66).

### **2.3.3 Tumor protein p63 (*TP63*)**

Selon plusieurs études, *TP63* joue un rôle important dans la différenciation épithéliale (5, 8, 9). Apparemment, une souris n'exprimant pas *TP63* a une peau plus mince et n'exprime pas de marqueurs de différenciation cellulaire (8). La protéine codée, p63, possède deux isoformes,  $\Delta$ Np63 et TAp63. C'est l'isoforme  $\Delta$ Np63 qui semble avoir un rôle important au niveau de l'expression de *FLG*. En effet, la surexpression de  $\Delta$ Np63 bloque l'expression de *FLG* (9, 67).

### **2.3.4 Pou classe 2 homeobox 1 (*POU2F1*)**

L'étude de Jang *et al.* a démontré que lorsque *POU2F1* (oct1) était en présence de *JUN*, les deux protéines travaillaient en coopération et il y avait augmentation de l'activité de la profilaggrine (4). En effet, lorsqu'il mesurait l'activité de la filaggrine en présence de chacune des protéines indépendamment,

elle était moindre que lorsque les deux agissaient ensemble. S'ils induisaient une mutation au niveau du site AP1, c-jun et oct1 étaient alors tous les deux inhibés. Selon leurs résultats, oct1 se lierait à un site de liaison spécifique à proximité du promoteur et stimulerait le promoteur de *FLG*. De plus, c-jun et oct1 doivent être liés à leur site de liaison respectif pour une bonne expression de profilaggrine (4). Ils ont donc démontré qu'oct1 régule la transcription de *FLG* à la hausse (4).

### **2.3.5 Pou classe 2 homeobox 3 (*POU2F3*)**

Jang *et al.* ont défini la relation entre *POU2F3* (skn1a) et la profilaggrine. Ils ont démontré que la présence de skn1a inhibe complètement l'activité de la protéine c-jun. Skn1a se lie au même site de liaison qu'oct1. Lorsque skn1a est lié à ce site, il inhibe l'interaction entre oct1 et c-jun qui permet un bon niveau de transcription (4, 5). Skn1a régule donc la transcription de *FLG* à la baisse.

### **2.3.6 Pou classe 3 homeobox 1 (*POU3F1*)**

Jang *et al.* ont évalué l'effet de *POU3F1* (oct6) sur *FLG*. Encore une fois, il y a interaction entre le site AP1 de *FLG* et la protéine c-jun (5). Dans ce cas, oct6 ne semblait pas avoir une très grande influence puisque c-jun en présence d'oct6 n'augmentait pas l'activité de la profilaggrine. Ils ont démontré qu'oct6 était inhibée par une mutation sur le site AP1, par contre l'activité de *FLG* n'était pas moindre (4). Il faut savoir qu'AP1 forme un complexe avec les facteurs Ets et HMG qui sont essentiels à la stabilité du complexe. Selon les résultats de l'étude, oct6 serait en mesure de se lier à un site de liaison près du complexe AP1. Ce site de liaison serait près du site de liaison de Ets ou HMG. Le complexe deviendrait alors instable et l'activité de la profilaggrine s'en verrait réduite (4).

## CHAPITRE 3

### ARTICLE

#### **Associations génétiques entre les gènes de la voie biologique de *FLG* et les maladies atopiques dans quatre études asthmatiques indépendantes.**

**Marie-Hélène Lambert, BSc, Marie-Hélène Dizier, PhD, Anne-Marie Madore, PhD, Yohan Bossé, PhD, Émmanuelle Bouzigon, MD, PhD, Anita L. Kozyrskyj, PhD, Allan Becker, MD, Florence Demenais, MD, Peter Paré, MD, Denise Daley, PhD, and Catherine Laprise, PhD**

#### **3.1 Résumé**

Le gène filaggrine (*FLG*) est particulièrement reconnu pour son implication au niveau de la dermatite atopique (DA). Il a aussi été démontré qu'il pouvait être considéré comme facteur de risque pour le développement de l'asthme. La famille filaggrine comprend aussi le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*). Bien que peu documenté, il est suggéré que ce gène aurait une fonction semblable à celle de *FLG*. L'objectif de cette étude était de réaliser une étude d'association et d'interaction entre les membres de la famille filaggrine (*FLG* et *FLG2*) et l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique. Ces analyses ont été réalisées pour les phénotypes en présence ou non de DA. De plus, six gènes impliqués dans la voie biologique de *FLG* ont aussi été étudiés. Ces gènes sont reconnus pour avoir un impact au niveau de la transcription de *FLG*, ils sont des éléments clés qui régulent son expression. L'étude a été réalisée dans quatre populations indépendantes ; l'étude du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) ; *The Epidemiological Study of the Genetics*

and Environment of Asthma (EGEA) ; Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS) ; et the Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE). Les résultats ont démontré que *POU2F3* était associé significativement à l'atopie et l'asthme allergique lorsqu'ils sont en présence de DA dans la population EGEA. De plus, une forte tendance pour *FLG2* à s'associer aux phénotypes atopiques, particulièrement lorsqu'en présence de DA, a été décelée dans l'échantillon du SLSJ. L'étude d'association combinée pour les résultats d'association dans les quatre populations indépendantes a permis de détecter une association positive entre *POU2F3* et la DA. Cette étude démontre l'importance de considérer la voie biologique dans l'étude de la génétique des traits complexes.

#### **Genetic associations between *FLG* pathway genes and atopic diseases in four independent asthma studies**

**Marie-Hélène Lambert, BSc,<sup>1</sup> Marie-Hélène Dizier, PhD,<sup>2, 3, 4</sup> Anne-Marie Madore, PhD,<sup>1</sup> Yohan Bossé, PhD,<sup>5, 6</sup> Emmanuelle Bouzigon, MD, PhD,<sup>2, 3, 4</sup> Anita L. Kozyrskyj, PhD,<sup>7</sup> Allan Becker, MD,<sup>8</sup> Florence Demenais, MD,<sup>2, 3, 4</sup> Peter Paré, MD,<sup>8,9</sup> Denise Daley, PhD,<sup>8,9</sup> and Catherine Laprise, PhD<sup>1</sup>**

From 1 Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Canada; 2 INSERM, U946, Genetic Variation and Human Diseases Unit, F-75010, Paris, France ; 3 Fondation Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), F-75010, Paris, France; 4 Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Universitaires d'Hématologie, F-75010, Paris, France; 5 Department of Molecular Medicine, Laval University, Québec, Canada; 6 Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, Québec, Canada; 7 Department of Pediatrics and Child Health, Manitoba Centre for Health Policy, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Canada; 8 University of British Columbia, James Hogg Research Centre, Vancouver, Canada; 9 Respiratory Division, Department of Medicine, University of British Columbia, Vancouver, Canada.

M-H. Lambert is an AllerGen trainee. P. D. Paré has received a grant support from Merck. D. Daley has received a grant support from AllerGen, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Michael Smith Foundation for Health Research. C. Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair on genetic determinants in asthma and the director of the Inflammation and Remodeling Strategic Group of the Respiratory Health Network of the Fonds de recherche du Québec □ Santé (FRQS), which partially supports the French Canadian study and is a member of the AllerGen network.



## Abstract

**Background:** Many studies show the importance of the filaggrin gene (*FLG*) in the development of allergic diseases. Lack of filaggrin causes a weak epithelial barrier which acts as an entry point for allergens and triggers atopic sensitization. **Objective:** The objective of this study is to perform an association and an interaction study with *FLG* and filaggrin family member 2 (*FLG2*), and genes involved in *FLG* transcription with asthma and related phenotypes in four independent populations. **Methods:** We performed an association study in the Saguenay–Lac-Saint-Jean familial collection (SLSJ), in The Epidemiological study of the Genetics and Environment of Asthma (EGEA), in the Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS) and in the Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE) to find positive associations between studied single nucleotide polymorphisms (SNPs) and asthma and related atopic diseases. **Results:** Positive associations were found for POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*) gene with atopy and atopic asthma both co-occurring with atopic dermatitis (AD) in EGEA population. A strong tendency for *FLG2* to be associated with atopic diseases was also found in the SLSJ cohort. No positive interaction was found in the four populations studied. **Conclusion:** These findings confirm the importance of *FLG* and its pathway in the development of atopic phenotypes.

**Capsule summary:** This study shows the importance of *FLG* and its pathway as risk factors for developing atopic diseases. Moreover, it shows the importance of biological pathway studies for complex diseases.

**Key words:** *FLG*, association study, asthma, POU family members, SLSJ study, EGEA study, atopic diseases.

**Abbreviations used:**

AD: Atopic dermatitis

AHR: Airway hyperresponsiveness

ATS: American thoracic society

CAPPS: The Canadian Asthma Primary Prevention Study

*DLX3*: Distal-less homeobox 3 gene

EGEA: The Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma

FBAT: Family-based association study

FEV1: Forced expiratory volume in one second

*FLG*: Filaggrin gene

*FLG2*: Filaggrin family member 2 gene

GWAS: Genome wide association study

*JUN*: Jun proto-oncogene

PC20: Provocative concentration of methacholine that induces a 20% fall in FEV1:  
(forced expiratory volume in 1 second)

*POU2F1*: POU class 2 homeobox 1 gene

*POU2F3*: POU class 2 homeobox 3 gene

*POU3F1*: POU class 3 homeobox 1 gene

SAGE: The Study of Asthma genes and the Environment

SLSJ: Saguenay–Lac-Saint-Jean

SNP: Single nucleotide polymorphism

*TP63*: Tumor protein p63 gene

### **3.2 Introduction**

The augmentation of asthma prevalence during the last decades is undeniable (1-5). Asthma is characterized by inflammation, remodelling and hyperreactivity of the airways. These are regulated by a variety of inflammatory cells, particularly eosinophils, mast cells and T lymphocytes (6-9). These mechanisms lead to a multitude of symptoms, which cause a variable obstruction of the airflow (8, 10). This disease is one of the secondary steps of the atopic march that normally starts with atopic dermatitis (AD), a chronic inflammatory disease of the skin, with a prevalence that has also increased considerably (3, 5, 11-13).

No major factor was found responsible for this augmentation (3, 14). But it is clearly demonstrated that a family history of atopic diseases, exposition to

environmental factors – such as air pollution – and exposition to allergens are determining factors for the development of these diseases (2, 6, 13-16).

In the last decades, many genetic studies focused on finding risk factors for developing asthma. From these studies an interesting gene emerged, filaggrin (*FLG*), a predisposing factor for atopic disorders that has already been associated to atopic dermatitis (5, 14, 15, 17). *FLG* is situated on chromosome 1q21.3 and codes for profilaggrin, a protein that is dephosphorylated and proteolysed in filaggrin monomers that aggregate keratin filaments (5, 15, 18-20). Lack of expression of *FLG* causes a weak epithelial barrier that can allow a higher uptake of allergens (14, 15, 21, 22). Most studies showed that *FLG* plays a role in asthma when co-occurring with AD and showed an increased severity of asthma. Until now, no direct association with asthma was shown (5, 15, 21-23).

The object of this study is to evaluate the possible association and interaction between *FLG* and genes involved in its transcription and atopic disorders (asthma, atopy and atopic asthma) as well as these disorders co-occurring with AD in four independent studies; the asthmatic familial collection from Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ), the epidemiological study of the Genetics and Environment of Asthma (EGEA), the Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS) and the Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE). Six genes implicated in the *FLG* pathway and the filaggrin family member 2 (*FLG2*), which is not well documented, were also tested. This study showed direct associations for POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*) with atopy and atopic asthma co-occurring with AD in EGEA population. This study also revealed a strong tendency of association of *FLG2* with atopic diseases particularly in presence of atopic dermatitis.

## 3.3 Methods

### 3.3.1 Approach

As underlined by previous studies, *FLG* gene seems to be involved in asthma but only co-occurring with AD and wasn't associated with asthma or related phenotypes alone. Considering this, exploratory analyses were performed in a fraction of the SLSJ sample with asthma and related phenotypes. Based on a tendency of association of *FLG* gene with asthma and atopy and on the availability of more samples of the SLSJ collection and of other independent populations, it was hypothesized that performing analyses with asthma and related phenotypes co-occurring with AD in the complete SLSJ sample and other familial studies may lead to interesting results. Moreover, the hypothesis was based on the importance of *FLG* itself and its pathway in asthma physiopathology. Indeed, genes involved in *FLG* pathway were selected according to their role in its transcription, which is the key element of *FLG* expression regulation (18, 24). Since each population has a different genetic background, these genes should be associated with atopic disorders, but the associated genes or SNPs may differ in each population. Finally, these genes were divided into four pathways according to documented direct interactions between them in order to test gene-gene interactions and better dissect possible implications of these genes in asthma and atopic diseases.

### 3.3.2 Asthma studies

#### 3.3.2.1 Saguenay–Lac-Saint-Jean familial collection

The clinical characteristics of the Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) familial collection have already been described in previous studies (25, 26). This familial collection comprises 253 probands and 1031 other family members. Briefly, all participants filled in a respiratory health questionnaire and performed lung function tests, following the American Thoracic Society (ATS) standardization to determine

the asthma phenotype (27). Participants were considered asthmatic if they had asthma symptoms and a lung function test compatible with airway hyperresponsiveness (AHR). AHR was determined with a provocative concentration of methacholine that induces a 20% fall (CP20) in the forced expiratory volume in one second (FEV1) inferior to 8 mg/ml methacholine. A skin prick test for 26 allergens was used to determine atopy. Atopy was defined as one positive response (wheal diameter > 3 mm at ten minutes) to the skin prick test. Atopic asthma was defined as individuals diagnosed with both asthma and atopy. Present or past personal history of atopic dermatitis (AD) was self-reported in the respiratory questionnaire. In order to be included in this study, families had to comply to these conditions; the phenotypes of the parents had to be known, one of the parents had to be unaffected and the grand-parents had to be native of Saguenay–Lac-Saint-Jean (28). The Chicoutimi Hospital local ethics committee approved the study and all subjects provided their informed consent. The characteristics of the familial collection are described in Table I.

### ***3.3.2.2 The Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS)***

The recruitment for this study was done in two Canadian centers in Vancouver and Winnipeg. It comprises 549 children with a high risk for developing asthma and their parents, that were enrolled during the second or third trimester of pregnancy for a prevention study on asthma in 1995 (25). High-risk children were those with one parent with asthma or those who had two first-degree relatives with allergy or atopic disorders. Asthma was diagnosed by pediatric allergists at age seven. Spirometry and methacholine challenge testing were performed and parents were interviewed (25, 29). Because AHR is more prevalent in children (30-31) AHR was defined as a PC20 (provocative concentration of methacholine chloride inducing a 20% fall in forced expiratory volume in one second (FEV1)) < 3.2 mg/ml for CAPPS and SAGE subjects. Atopy was diagnosed as at least one

positive response (wheal diameter > 3 mm at ten minutes) to a skin prick test for common allergens (25). The study was approved by the Ethic Committees of the University of Manitoba and the University of British Columbia (25). The characteristics of the cohort have already been described in a previous study, most of them are described in Table I (32).

### ***3.3.2.3 The Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE)***

The SAGE cohort is derived from a population based cohort of 16 320 children who were born in Manitoba between January 1st, 1995 and December 31st, 1995. A health and environment exposure survey was mailed to their parents in 2002 (25). Parents that answered the survey and gave their approbation were contacted. A total of 723 trios were recruited. Children that were selected to join the study were stratified by self-reported asthma, allergies or neither. In the case where neither disease was reported, children were stratified by rural or urban environment (25). The diagnosis was established by a pediatric allergist and a methacholine challenge test was done according to the Crockcroft guideline (29). AHR was determined as a PC20 less than 3.2 mg/ml methacholine. Atopy was defined as at least one positive response (wheal diameter > 3 mm at ten minutes) to a skin prick test for common allergens (25). The Ethics Committee at the University of Manitoba approved this study (25). The characteristics of this studied population can be found in Table I.

### ***3.3.2.4 Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma (EGEA)***

EGEA was used as a replication cohort. This cohort combines a case control study and a familial study for a total of 1854 subjects, 348 asthmatics and their family and 416 control subjects. Probandes were aged between 7 and 65 and were all native from five cities in France. Subjects had to complete a questionnaire based on the British Medical Research Council/European Coal and Steel Community, the ATS and the European Community Respiratory Health Survey.

Asthma diagnosis was based on self-reported answers to the four questions “Have you ever had attacks of breathlessness at rest with wheezing?”, “Have you ever had asthma attacks?”, “Was this diagnosis confirmed by a physician?”, and “Have you had an asthma attack in the last 12 months?”, or a positive response to at least two questions and a positive review of their medical record (32). At least one positive response (wheal diameter > 3 mm at ten minutes) to the skin prick test for 11 allergens was diagnosed as atopy (32). A function test compatible with airway hyperresponsiveness were also part of the evaluation. Complete clinical characteristics and inclusion criteria of the cohort have already been described in a previous study, most of them are described in Table I (32).

### **3.3.3 Exploratory results in the SLSJ collection**

#### ***3.3.3.1 TagSNPs genotyping***

Blood samples were obtained from each participant and DNA was extracted using Genomic-tip 100/G kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manual’s instructions. All tagSNPs were genotyped using the Sequenom® matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass array spectrometer (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA). Primers were designed using the Sequenom SNP Assay Design software version 3.0 for iPLEX reactions. The protocol and reaction conditions are in accordance with the manufacturer (33) and the assay group file containing the PCR primers and the iPLEX extension probes can be supplied on request to the corresponding author. The genotypes were analyzed using the MassARRAY Typer software version 3.4 (Sequenom).

#### ***3.3.3.2 Statistical analysis***

Analyses were performed for 852 subjects of the SLSJ collection (see Table II). Allele distribution patterns and Mendelian errors were assessed using the Family-Based Association Test (FBAT) software (version 1.7) (34-36). All tagSNPs

analyses were performed under an additive genetic model using an empirical estimate of the variance (34). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) p-values, considering a significance threshold of 0.05, and linkage disequilibrium (LD)  $r^2$  values between tagSNPs were calculated using Haploview software (version 4.2) (37). The Nyholt and the Li and Ji methods were used for the statistical correction. It corrected the p-value for the number of independent SNPs, which was evaluated to 3.7 (38, 39). The results were then corrected for the number of independent phenotypes tested; asthma, atopy and atopic asthma, which were identified as two, using a matrix spectral decomposition (matSpd) (38, 39). With these correction factors, the significance threshold was 0.0067.

### **3.3.4 Association analyses between *FLG* and genes involved in its transcription and asthma related phenotypes**

#### ***3.3.4.1 Genes' selection and SNPs genotyping***

Blood samples were obtained from each participant and DNA was extracted using Genomic-tip 100/G kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manual's instructions.

To select genes from the *FLG* pathway, a review of studies on *FLG* was done using keywords like *FLG* pathway, transcription, expression, phosphorylation. Genes were selected according to their implication in *FLG* transcription. To validate our selection we submitted the list of genes to GeneCodis (40, 41). The six genes we selected were listed to be involved with *FLG* as transcription factors.

To summarize, jun proto-oncogene (*JUN*) is an important transcription factor for *FLG*, its binding to AP1 site is necessary to maintain a high level of *FLG* expression (24). POU class 2 homeobox 1 (*POU2F1*) stimulates the promoter by a cooperation activity with *JUN*, both are needed to have a high level of *FLG* transcription (42). POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*) can block *JUN* activation



and thus block the cooperative activity between *JUN* and *POU2F1*, which leads to low *FLG* promoter activity (42). POU class 3 homeobox 1 (*POU3F1*) downregulates *FLG* transcription by interfering with *JUN* and its binding to AP1 site (42). Over expression of tumor protein 63 (*TP63*) isoform  $\Delta$ Np63 blocks the activation of *FLG* transcription (43). Finally, ectopic expression of distal-less homeobox 3 (*DLX3*) in basal layer leads to premature activation of *FLG* transcription and to an over expression of filaggrin in the basal cell layer (44). Figure 1 helps to understand the role of each of these genes in *FLG* transcription.

In the context of the large-scale, consortium-based genomewide association study (GWAS) of asthma of the GABRIEL Consortium, genotyping was done for the four sample sets (45). Illumina Human 610k quad array were used with a success rate superior to 99% (46). The chips are principally composed of tagSNPs selected from the HapMap project. The single nucleotide SNPs covering  $\pm$  10 Kb area of the genes were extracted with PLINK software (version 1.07, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>). To be included in the analyses, SNPs must have a minor allele frequency  $>$  0.05, a Hardy-Weinberg p value  $>$  0.05 and success rate  $>$  0.95 and subjects have to reach a genotyping rate  $>$  0.95. All SNPs in this study are presented using their NCBI reference sequence number (#rs).

#### **3.3.4.2 Statistical analysis**

The association study was done with the Family-Based Association Test (FBAT) software (version 1.7.3) (35). The Nyholt and the Li and Ji methods were used for the statistical correction. It corrected the p-value for the number of independent SNPs, which was evaluated to 70.8174 (38, 39). The results were then corrected for the number of independent phenotypes tested; asthma, atopy, atopic asthma and atopic dermatitis, which were identified as three, using a matrix spectral decomposition (matSpd) (38, 39). With these correction factors, the

significance threshold was 0.000235. Combined p-values were estimated using the Stouffer's method implemented in the METAL analysis tool (47, 48).

To perform gene-gene interaction analyses, genes selected were divided into four distinct pathways based on their reported interactions. Genes classified in a same pathway have to directly interact with each other. Gene-gene interaction analyses were performed using the UNPHASED application (49). Statistical corrections were applied using the false discovery rate (FDR) method proposed by Benjamini and Hochberg (50).

### **3.4 Results**

#### ***3.4.1 Exploratory results in the SLSJ familial collection***

Genetic associations between five SNPs located in the *FLG* gene and asthma and related phenotypes show association between two SNPs (rs2184951 and rs12730241) and asthma ( $p = 0.014$  and  $0.011$ , respectively) or atopy ( $p = 0.025$  and  $0.020$ , respectively) (Table III). However, after correction for multiple testing, there are no significant association.

#### ***3.4.2 Association analyses between the FLG gene and pathway and asthma or related phenotypes co-occurring with AD***

No significant association was found in the SLSJ study, but it was observed that *FLG2* rs3818831 had a strong tendency to be associated with atopic diseases particularly when in presence of AD (asthma:  $p=0.0015$ , atopy:  $p=0.0008$  and atopic asthma:  $p=0.0006$ , all co-occurring with AD, and AD:  $p=0.0013$ ). These results are shown in Table IV.

There was no significant association in the CAPPS cohort or the SAGE study.

Two significant associations were found in the EGEA cohort with POU class 2 homeobox 3 (*POU2F3*). *POU2F3* rs7121784 was associated with atopy co-occurring with AD ( $p=0.0002$ ) and rs7951628 was associated with atopic asthma co-occurring with AD ( $p=0.0002$ ). Results are presented in Table III. Combined analyses of the four samples, without consideration of the sense of association in each sample, shown a significant association for another SNP of the *POU2F3* gene (rs1941410) and AD phenotype ( $p=0.0001$ ) (Table IV). These findings indicate that the POU-domain family members could be key elements in *FLG* transcription and are important to investigate.

### **3.4.3 Gene-gene interaction results**

Gene-gene interaction analyses were performed in four different pathways. The first pathway includes the *FLG*, *JUN*, *POU2F1* and *POU2F3* genes, the second pathway includes the *FLG*, *JUN* and *POU3F1* gene, the third pathways includes the *FLG* and *DLX3* gene and finally the fourth pathway includes the *FLG* and *TP63* genes. Considering all phenotypes tested, 86 gene-gene interactions on a total of 1,596 interactions (4.5%) were significantly associated before correction with almost one phenotype tested in the first pathway (asthma: 15, atopic asthma: 11, atopy: 10, atopic asthma co-occurring with AD: 11, asthma co-occurring with AD: 8, atopy co-occurring with AD: 18, AD : 13) 8/140 (5.7%) in the second one (asthma:1, atopic asthma: 3, atopy: 3, asthma co-occurring with AD: 1), 0/42 in the third one and 63/868 (7.3%) in the fourth one (asthma: 5, atopic asthma: 16, atopy: 12, atopic asthma co-occurring with AD: 6, asthma co-occurring with AD: 9, atopy co-occurring with AD: 7, AD : 8). However, after the application of the FDR method, no gene-gene interaction was found significant (data not shown).

### 3.5 Discussion

This study demonstrates the importance of investigating biological pathways of a candidate gene in order to increase the molecular biology knowledge of the disease. The exploratory results observed in a fraction of the SLSJ collection that show a tendency of association between *FLG* and asthma and atopy were not confirmed in the four studies but analyses of *FLG* pathway genes showed interesting results. *FLG2* and *POU2F3* are two genes that were not known for their implication with atopic diseases. In this study *POU2F3* was significantly associated to asthma and atopic asthma co-occurring with AD and even if *FLG2* is not significantly associated with atopic diseases, a strong tendency was observed. These results were found by investigating *FLG* pathway. Association of genes in the *FLG* pathway with asthma or related phenotypes co-occurring with AD seems logical with other documented association between *FLG* and asthma in presence of AD in the literature (5, 15, 21-23).

POU domain family members are involved in a variety of cell processes. Reports show that they are implicated in housekeeping gene function, immune system development and nervous system development (51). They are also implicated in epithelial differentiation. In this study we investigated the implication of three POU family members, (*POU3F1*, *POU2F1* and *POU2F3*) that induce an upregulation or a downregulation of *FLG* transcription (42).

*POU2F3* rs7121784 was significantly associated to atopy and rs7951628 to atopic asthma, both co-occurring with AD in the EGEA study and rs1941410 was associated with AD in the combined four samples. These three SNPs are situated in the intronic region of *POU2F3*. This gene codes for *SKN1A*, which would completely block the *FLG* transcription by preventing *JUN* activation, which is necessary for the beginning of the transcription (42).

Two hypothetical processes could explain these associations. Indeed, a lack of expression of *POU2F3* could induce a *FLG*-dependent or a *FLG*-independent disruption of the epithelial barrier. In the case of a *FLG*-dependent disruption, *POU2F3* could allow *JUN* activation, which will increase *FLG* transcription, leading to abnormal keratinocyte activities as a collapse of the intermediate filament network, disruption of the nuclear membrane and possibly cell death (44), leading to epidermal barrier disruption. This disruption could enhance sensitization to allergens and thus lead to systemic atopic responses, which could occur as AHR and furthermore can start what is called the atopic march, in which AD represents usually the first step and other atopic diseases as asthma the second one (5).

A strong tendency for *FLG2* to be associated with atopic diseases was also found in SLSJ population. *FLG2* is part of the S100 fused-type protein (SFTP) like *FLG* and it is also situated on chromosome 1q21.3. Wu et al. demonstrated that *FLG2* is expressed in the skin, thymus, stomach, placenta, amygdala and in the testis (52). *FLG2* is expressed in granular layer cells and in the cytoplasm of cornea cells. These authors also showed that its expression is similar to the expression of *FLG* even if it is not exactly the same. They supposed that *FLG2* would have a similar role as *FLG* (52). The results observed in this study strengthen this idea, since as *FLG*, *FLG2* rs3818831 has a tendency to be associated mostly when in presence of AD. A plausible hypothesis for this would be that a lack of *FLG2* would also impair the epithelial barrier.

To figure out if associations between *POU2F3* SNPs and asthma related phenotypes co-occurring with AD were due to an interaction between *POU2F3* and *FLG* genes, gene-gene interactions were performed in the SLSJ collection. No significant results were found for this possible interaction. Gene-gene interactions were also tested for all possible interaction between the selected genes and our analyses did not allow finding any significant results. Further studies will be

necessary to better understand the specific role of *POU2F3* in the development of atopic diseases.

The differences observed between associations in each population can be explained by variability in the studies, genetic background and the criteria used in recruitment and phenotype characterization in the independent studies (53). Each population has its own genetic background that may cause variations on allele frequencies for example, so a positive association found in SLSJ might be true for this population even if it is not observed in EGEA, CAPPS or SAGE studies (54). For example, the particularity of SLSJ genetic background, as the low number of founders (2,500) and the isolation of the region, brings an advantage for genetic analyses (25, 55). This kind of population helps finding associations with minor effect genes that could be masked in other populations by major effect genes (25).

The present study motivated the investigation of biological pathway of a candidate gene in complex trait association study. *POU2F3* and *FLG2* were not known for their implication in atopic disorder, but this study brings them as interesting risk factors for these diseases. Further studies will be necessary to better understand their implication and if they could be interesting in other populations as well.

### 3.6 References

1. Kiyohara C, Tanaka K, Miyake Y. Genetic susceptibility to atopic dermatitis. *Allergol Int.* 2008 Mar;57(1):39-56.
2. Eichenfield LF, Hanifin JM, Beck LA, Lemanske RF, Jr., Sampson HA, Weiss ST, et al. Atopic dermatitis and asthma: parallels in the evolution of treatment. *Pediatrics.* 2003 Mar;111(3):608-16.
3. Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Aug;105(2):99-106; quiz 7-9, 17.
4. Kheradmand F, Rishi K, Corry DB. Environmental contributions to the allergic asthma epidemic. *Environ Health Perspect.* 2002 Aug;110 Suppl 4:553-6.

5. van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;339:b2433.
6. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*. 2009 Oct 27;181(9):E181-90.
7. Zitt M. Clinical applications of exhaled nitric oxide for the diagnosis and management of asthma: a consensus report. *Clinical therapeutics*. 2005 Aug;27(8):1238-50.
8. Dekkers BG, Maarsingh H, Meurs H, Gosens R. Airway structural components drive airway smooth muscle remodeling in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009 Dec;6(8):683-92.
9. Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2009 Dec;6(8):678-82.
10. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int*. 2007 Dec;56(4):341-8.
11. McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends in molecular medicine*. 2008 Jan;14(1):20-7.
12. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jun;123(6):1361-70 e7.
13. Anderson ML. Atopic dermatitis--more than a simple skin disorder. *J Am Acad Nurse Pract*. 2005 Jul;17(7):249-55.
14. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res*. 2008;9:4.
15. Irvine AD, McLean WH. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2006 Jun;126(6):1200-2.
16. Marenholz I, Kerscher T, Bauerfeind A, Esparza-Gordillo J, Nickel R, Keil T, et al. An interaction between filaggrin mutations and early food sensitization improves the prediction of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Apr;123(4):911-6.
17. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*. 2007 Jun;127(6):1282-4.
18. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009 May 1;122(Pt 9):1285-94.
19. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Zhao Y, Liao H, Drummond HE, et al. Filaggrin loss-of-function variants are associated with atopic comorbidity in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Oct;15(10):1492-8.
20. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunskisiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. *Genomic*

- organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem*. 1992 Nov 25;267(33):23772-81.
21. Palmer CN, Ismail T, Lee SP, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Jul;120(1):64-8.
  22. Vercelli D. Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Aug;122(2):267-71.
  23. Brown SJ, Irvine AD. Atopic eczema and the filaggrin story. *Semin Cutan Med Surg*. 2008 Jun;27(2):128-37.
  24. Jang SI, Steinert PM, Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):24105-14.
  25. Begin P, Tremblay K, Daley D, Lemire M, Claveau S, Salesse C, et al. Association of urokinase-type plasminogen activator with asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jun 1;175(11):1109-16.
  26. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 1;170(9):967-73.
  27. Standardization of Spirometry; 1994 Update. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):1107-36.
  28. Bouchard G. Projet BALSAC. Chicoutimi2010 [cited 2010 18/04/2010]; Available from: <http://www.uqac.ca/balsac/index.php>.
  29. Crockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Annals of allergy*. 1984 Jul;53(1):26-9.
  30. Godfrey S. Bronchial hyper-responsiveness in children. *Paediatr Respir Rev*. 2000 Jun;1(2):148-55.
  31. Godfrey S, Springer C, Bar-Yishay E, Avital A. Cut-off points defining normal and asthmatic bronchial reactivity to exercise and inhalation challenges in children and young adults. *Eur Respir J*. 1999 Sep;14(3):659-68.
  32. Kauffmann F, Dizier MH, Pin I, Paty E, Gormand F, Vervloet D, et al. Epidemiological study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness, and atopy: phenotype issues. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4 Pt 2):S123-9.
  33. Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, et al. iPLEX assay: Increased plexing efficiency and flexibility for MassArray system through single base primer extension with mass-modified terminators. *SEQUENOM Application Note*. 2005 April 28.
  34. Lake SL, Blacker D, Laird NM. Family-based tests of association in the presence of linkage. *Am J Hum Genet*. 2000 Dec;67(6):1515-25.
  35. Horvath S, Xu X, Lake SL, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics. *Genetic epidemiology*. 2004 Jan;26(1):61-9.



36. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol.* 2000;19 Suppl 1:S36-42.
37. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005 Jan 15;21(2):263-5.
38. Li J, Ji L. Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity.* 2005 Sep;95(3):221-7.
39. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet.* 2004 Apr;74(4):765-9.
40. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol.* 2007;8(1):R3.
41. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, et al. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul 1;37(Web Server issue):W317-22.
42. Jang SI, Karaman-Jurukovska N, Morasso MI, Steinert PM, Markova NG. Complex interactions between epidermal POU domain and activator protein 1 transcription factors regulate the expression of the profilaggrin gene in normal human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 2000 May 19;275(20):15295-304.
43. Ogawa E, Okuyama R, Egawa T, Nagoshi H, Obinata M, Tagami H, et al. p63/p51-induced onset of keratinocyte differentiation via the c-Jun N-terminal kinase pathway is counteracted by keratinocyte growth factor. *J Biol Chem.* 2008 Dec 5;283(49):34241-9.
44. Morasso MI, Markova NG, Sargent TD. Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J Cell Biol.* 1996 Dec;135(6 Pt 2):1879-87.
45. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* Sep 23;363(13):1211-21.
46. illumina. 2010 [cited 2010 18/04/2010]; Available from: <http://www.illumina.com/>.
47. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics.* [Meta-Analysis Research Support, N.I.H., Extramural]. 2010 Sep 1;26(17):2190-1.
48. Stouffer SA, Suchman, E. A , DeVinney, L.C., Star, S.A., Williams, R.M. Jr., Adjustment During Army Life. Princeton: Princeton University Press; 1949.
49. Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Human heredity.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008;66(2):87-98.
50. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Statistics in medicine.* 1990 Jul;9(7):811-8.

51. Hofmann E, Reichart U, Gausterer C, Guelly C, Meijer D, Muller M, et al. Octamer-binding factor 6 (Oct-6/Pou3f1) is induced by interferon and contributes to dsRNA-mediated transcriptional responses. *BMC Cell Biol.* 11:61.
52. Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS ONE.* 2009;4(4):e5227.
53. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res.* 2005 Jun 3;573(1-2):54-69.
54. McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008 May;9(5):356-69.
55. Madore AM, Prevost C, Dorfman R, Taylor C, Durie P, Zielenski J, et al. Distribution of CFTR mutations in Saguenay- Lac-Saint-Jean: proposal of a panel of mutations for population screening. *Genet Med.* 2008 Mar;10(3):201-6.

Table I: Characteristics and distribution of the studied phenotypes in the four samples

	SLSJ		EGEA		CAPPS		SAGE	
	Probands <sup>a</sup>	Family members	Probands	Family members	Children	Parents	Children	Parents
	n = 253	n = 1031	n= 235	n= 554	n=266	n=500	n=430	n=596
Male : Female ratio	1 : 1.1	1 : 1.2	1.6	0.98	1:0.86	1:1.02	1:0.78	1:1.17
Mean age, yr (range)	18 (3-50)	44 (2-93)	15 (7-41)	17 (1-43)	7 (6-8)	39 (25-50)	9 (7-10)	40 (26-69)
Smoking status n (%)								
Non smoker	211 (85)	473 (47)	46 (63)	156 (58)	NA	329 (66)	NA	365 (62)
Ex-smoker	12 (5)	342 (34)	10 (14)	28 (11)	NA	110 (22)	NA	136 (23)
Smoker	25 (10)	197 (19)	17 (23)	84 (31)	NA	59 (12)	NA	85 (14)
FEV <sub>1</sub> , % pred (SD) <sup>b</sup>	92.7 (15.7)	94.6 (20.3)	92.7 (14.0)	98.7 (13.0)	93.8 (11.5)	NA	89.1 (12.3)	106 (15)
PC <sub>20</sub> , mg/ml (SD) <sup>c</sup>	2.53 (3.51)	10.1 (4.97)	1.82 (2.63)	6.31 (6.76)	2.74 (3.21)	NA	3.54 (4.58)	13.04 (3.92)
PD <sub>20</sub> ≤ 4mg, n (SD) <sup>d</sup>	NA	NA	121 (95.3)	194 (51.9)	NA	NA	NA	NA
Serum IgE, µg/l (SD) <sup>e</sup>	254.2 (4.9)	112.4 (4.4)	371.5 (3.2)	100 (5.0)	54.9 (4.4)	NA	25.0 (5.5)	NA
Subphenotypes (%)								
Asthma <sup>f</sup>	253 (100)	378 (37)	235 (100)	250 (42)	50 (20)	160 (48)	159 (37)	16 (12)
Atopy <sup>g</sup>	200 (79)	509 (49)	207 (91)	289 (54)	109 (44)	346 (69)	201 (47)	NA
Atopic asthma	200 (79)	257 (25)	207 (91)	131 (25)	38 (22)	127 (63)	106 (38)	NA
Atopic dermatitis	127 (50)	385 (38)	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Abbreviations used: SLSJ = Saguenay-Lac-Saint-Jean familial collection; EGEA = The Epidemiological study of the Genetics and Environment of Asthma; CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study; SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment.

a Probands are first affected family member recruited in the familial collection and family members referred to other family members who joined the study

b FEV1 = Mean calculated for the forced expiratory volume in one second.

c PC20 = PC20 = Provocative concentration of methacholine that induces a 20% fall in FEV1.

d PD20 = Decrease of FEV1  $\geq$  20% for a  $\leq$  4 mg dose of methacholine.

e IgE = Immunoglobulin E serum concentration.

f Present asthma or past documented clinical history of asthma.

g Defined as at least one positive response on skin prick testing (wheal diameter > 3 mm at 10 minutes).

Table II. Clinical characteristics of the Saguenay–Lac-Saint-Jean subjects

	Families <sup>a</sup>	
	Probands (n = 208)	Family members (n = 644)
Male : Female ratio	1 : 1.3	1 : 1.1
Mean age (range)	18 (3-46)	40 (2-83)
Smoking status (n (%)) <sup>b</sup>		
Never	172 (84)	278 (44)
Ex-smoker	11 (5)	219 (34)
Smoker	22 (11)	141 (22)
FEV <sub>1</sub> % of predicted value (SD) <sup>c</sup>	92.3 (16.1)	94.6 (21.2)
PC <sub>20</sub> in mg/ml (SD) <sup>d</sup>	2.80 (3.51)	11.38 (5.05)
Serum IgE in g/L (SD) <sup>e</sup>	226.3 (4.6)	103.3 (4.2)
Number of persons with subphenotypes (%)		
Asthma <sup>f</sup>	208 (100)	266 (41)
Atopy <sup>g</sup>	166 (81)	355 (56)
Atopic asthma	166 (81)	186 (71)
Eczema (AD) <sup>h</sup>	77 (37)	163 (25)
Asthma + AD	77 (37)	85 (32)
Atopy + AD	113 (55)	113 (32)
Atopic asthma + AD	69 (37)	69 (37)

a The 208 probands represent the 208 extended families that represent a total of 249 nuclear families for the FBAT analyses.

b Evaluated for 206 probands and for 651 family members.

c FEV<sub>1</sub> = Geometric mean of the force expiratory volume in one second evaluated for 191 probands and for 553 family members.

d PC<sub>20</sub> = Concentration of methacholine inducing a 20% fall in FEV<sub>1</sub>. Evaluated for 165 probands and for 498 family members. Geometric mean and SD were obtained from the log transformed PC<sub>20</sub> values.

e IgE = Immunoglobulin E serum concentration evaluated for 196 probands and 574 family members. Geometric mean and SD were obtained from the log transformed IgE values.

f Present asthma or past documented clinical history of asthma.

g Defined as at least one positive response on skin prick testing (wheal diameter > 3 mm at 10 minutes).

h AD = Atopic dermatitis questionnaire self-reported.

Table III. Association of FLG tagSNPs with asthma, atopy and atopic asthma phenotypes

Gene	TagSNP	Allele	Asthma			Atopy			Atopic asthma		
			Fam	Z	p	Fam	Z	p	Fam	Z	p
FLG	rs2184951	T/G	78	-2.459	<b>0.014</b>	66	-2.238	<b>0.025</b>	68	-1.871	0.0614
	rs12730241	G/A	80	-2.555	<b>0.011</b>	68	-2.326	<b>0.020</b>	69	-1.907	0.0565
	rs11582620	A/G	76	0.026	0.979	62	0.730	0.466	65	0.668	0.5040
	rs1933063	G/A	57	0.194	0.846	50	-0.562	0.574	49	-0.106	0.9156
	rs1933064	G/A	113	-1.367	0.172	91	-1.105	0.269	96	-1.388	0.1652

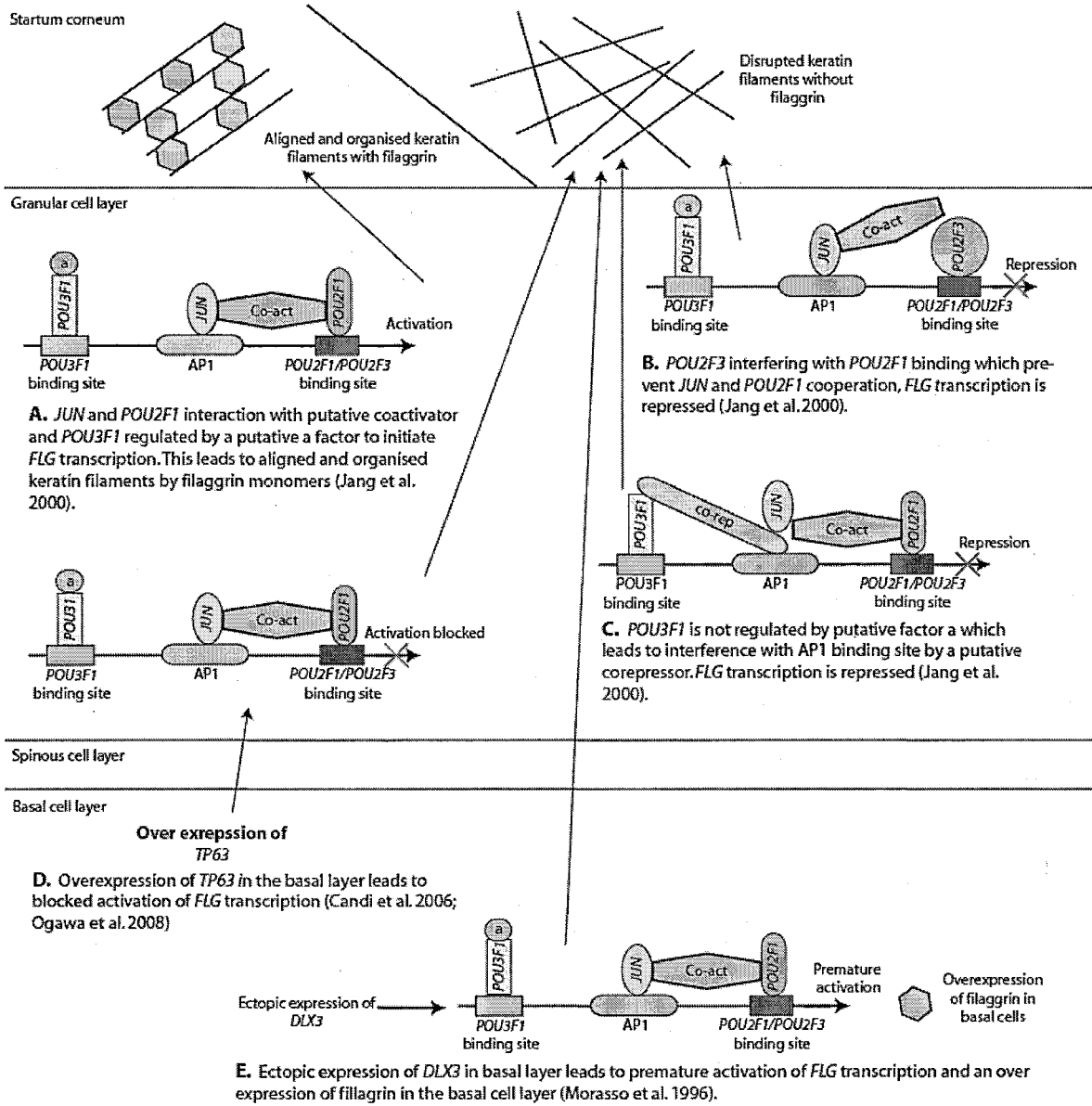
P-values highlighted in bold are significant (< 0.05).

Abbreviations used: TagSNP = Tagging single nucleotide polymorphism, MAF = Minor allele frequency, Fam = Number of families contributing to the statistic, S = FBAT statistic, E(S) = Expected FBAT statistic, Z = Z-score, p = p-value.

Table IV Associations between *FLG2* and *POU2F3* genes and asthma related phenotypes co-occurring with atopic dermatitis in the SLSJ, the EGEA or the four samples combined

Sample	Gene	SNP	Allele	Asthma + AD		Atopy + AD		Atopic asthma + AD		AD	
				Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
SLSJ	<i>FLG2</i>	rs3818831	A/G	3.17	0.0015	3.359	0.0008	3.45	0.0006	3.22	0.0013
EGEA	<i>POU2F3</i>	rs7121784	A/C	2.82	0.0048	3.74	<b>0.0002</b>	3.23	0.0012	3.34	0.0008
		rs7951628	A/G	3.40	0.0007	3.57	0.0004	3.68	<b>0.0002</b>	3.48	0.0005
Combined	<i>POU2F3</i>	Rs1941410	A/G	3.62	0.0003	3.47	0.0005	3.46	0.0005	3.84	<b>0.0001</b>

Abbreviations used: AD = atopic dermatitis; SLSJ = Saguenay-Lac-Saint-Jean familial collection; EGEA = The Epidemiological study of the Genetics and Environment of Asthma.



**Figure 2 : A schematic model of the FLG biological pathway. Models B) to E) lead to disrupted keratin filaments.**



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Cette étude portait sur l'importance de l'étude de la voie biologique d'un gène ayant déjà été associé aux maladies étudiées. Bien que les résultats aient déjà été discutés dans le chapitre 3, le chapitre 4 permet d'approfondir certains concepts et d'élaborer sur les différents gènes associés et les perspectives possibles.

#### **4.1 Étude d'association pangénomique (GWAS)**

Le GWAS a permis d'extraire les génotypes pour les polymorphismes de ces gènes présents dans la puce Illumina Human 610k quad array utilisée. De plus, le GWAS a permis de réaliser les études d'association et d'interaction entre ces derniers et les phénotypes étudiés, ici l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique, en présence ou non de dermatite atopique (DA). Bien entendu, les nouvelles associations découvertes dans cette étude devront être répliquées dans des études indépendantes, mais surtout être le sujet d'études fonctionnelles afin de vérifier leur réelle implication au niveau des maladies atopiques.

Il est important de souligner les limites des GWAS. Premièrement, le GWAS est une méthode qui permet d'analyser plus d'un million de polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) à la fois grâce au séquençage du génome humain (68). Par contre, pour le moment il est impossible d'analyser toutes les variations connues du génome humain à un coût raisonnable. Il faut donc utiliser des puces

commerciales qui utilisent des SNP qui couvrent la majorité des variations communes dans le génome, laissant de côté par exemple les SNP régulateurs, qui sont connus pour influencer les différentes expressions phénotypiques d'une maladie (68-70). Celle utilisée dans le cadre de cette étude est majoritairement constituée de tagSNP identifiés dans le cadre du projet international HapMap. Ces tagSNP représentent les autres SNP d'un même bloc haplotypique, c'est-à-dire qui sont en déséquilibre de liaison avec ceux-ci (71). Compte tenu de la quantité limitée de SNP qu'une puce peut prendre en charge, les SNP communs sont priorisés par rapport aux variations plus rares dans le génome (68, 71). Une autre limite importante imposée par le GWAS est certainement le grand nombre d'échantillons requis pour atteindre une puissance statistique permettant de révéler des associations. Un échantillon de grande taille implique qu'il sera coûteux et souvent, demandera l'union de plusieurs échantillons provenant de divers groupes de chercheurs. Ces échantillons peuvent donc être construits suivant divers critères. Cet élément implique donc une autre limite, soit l'uniformité des phénotypes et des évaluations cliniques (72).

Il est aussi important de considérer que les associations positives découvertes grâce à un GWAS devront être répliquées dans une étude de réplication (73). L'approche utilisée dans le cadre de cette étude permet de vérifier si les SNP étudiés peuvent être considérés comme facteurs de risque dans les populations étudiées. Par contre, c'est grâce à une étude de réplication qu'il est possible de vérifier si les associations trouvées préalablement peuvent s'appliquer à d'autres populations. La réplication d'une association est difficile à obtenir vu les différences au niveau des populations et de l'expression du SNP dans celles-ci (73).

À titre d'exemple, la collection familiale du Saguenay—Lac-Saint-Jean (SLSJ) provient d'une population à effet fondateur, donc moins hétérogène. En effet, la population du SLSJ est constituée majoritairement d'individus qui

descendent d'environ 2 500 fondateurs venus de France au 17<sup>ième</sup> siècle. Cette population a été isolée et a grandi rapidement pendant plus de dix générations (18, 74). Considérant ces caractéristiques, ce type d'échantillon apporte un avantage au niveau des analyses génétiques (75). L'échantillon peut être de plus petite taille tout en ne perdant pas la puissance statistique ni la robustesse de l'étude. Un autre avantage qu'apporte ce type d'échantillon pour les maladies polygéniques, est qu'il permet de faire ressortir certains polymorphismes rares (gènes à effets mineurs). Ces SNP n'auraient probablement pas été décelés dans d'autres populations parce que les associations auraient pu être masquées par des gènes dont l'effet est plus fort ou bien parce que la fréquence de l'allèle mineur aurait pu être trop faible. L'échantillon permettant de révéler l'association devrait alors être de trop grande taille (plusieurs dizaines de milliers d'ADN) (18). Évidemment, ce type d'échantillon n'apporte pas que des avantages ; il est plus difficile de répliquer les résultats dans d'autres populations vu le contexte démographique particulier d'un échantillon à effet fondateur tel que celui du SLSJ ici utilisé. De plus, certains SNP sont pratiquement absents de ce type d'échantillon vu le contexte démographique de ces populations (76).

#### **4.1.1 Réplication des résultats**

Comme il a été dit dans la section précédente, la réplication d'un résultat dans d'autres études indépendantes est un critère important, mais tout aussi difficile à atteindre, lorsqu'un GWAS est réalisé (72). En fait, la réplication d'un résultat dans une population indépendante apporte deux choses intéressantes à une étude. Premièrement, une observation qui est répétée dans plus d'une étude démontre que l'association initiale n'est pas due à un biais de celle-ci. Le polymorphisme observé peut donc être considéré comme un facteur de risque pour le trait étudié (77). Deuxièmement, la réplication d'un résultat dans un échantillon indépendant renforce l'idée que l'association décelée n'est pas due à

un biais incontrôlable (i.e. qui n'est pas dû au profil de l'étude), tel que le portrait génétique de la région ou la fréquence de l'allèle mineur (77).

Il existe trois types de réplifications possibles. La réplication stricte ou exacte qui signifie que le même allèle est associé au même phénotype dans le même sens (soit susceptibilité ou de protection) (78). Bien que ce type de réplication soit l'objectif de tous, elle est rarement observée. Plusieurs raisons expliquent cette rareté. Vu la quantité élevée de tests réalisés dans un GWAS, un facteur de correction doit être imposé aux résultats. Il est possible que ce facteur de correction soit trop sévère et empêche de révéler une association positive (77). Les différences au niveau de l'échantillon, telles que la définition des phénotypes ou la fréquence allélique peuvent aussi être en causes (77). Dans le cadre de cette étude, aucune réplication stricte n'a été révélée.

La réplication partielle survient lorsqu'un gène est associé dans deux populations indépendantes, par contre certains paramètres diffèrent (78). Par exemple, il est possible que le variant génétique associé diffère dans l'étude de réplication (SNP différents pour un même gène). Il est aussi possible que le même polymorphisme soit associé, mais que le phénotype diffère. Dans le cadre de cette étude, aucune réplication partielle n'a été observée.

Enfin, il est possible que les résultats ne soient pas répliqués, il s'agit alors d'une non réplication. Dans ce cas, un gène est associé à un phénotype dans une population. Par contre, ce même gène n'est pas associé au sein des autres populations étudiées (78). Dans le cadre de cette recherche, le gène POU classe 2 homeobox 3 (*POU2F3*) a été associé à l'atopie et à l'asthme allergique en présence de dermatite atopique (DA) dans la population *The Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma* (EGEA), mais cette association n'a pas été répliquée dans les autres études indépendantes.

Plusieurs raisons peuvent expliquer une non réplication. Il est possible que l'observation initiale soit un faux-positif. Dans ce cas, le résultat de non réplication dans une étude indépendante est positif. À l'inverse, il est possible que l'observation initiale soit vraie. Dans ce cas, le résultat de non réplication dans une étude indépendante est incorrect. Il s'agit alors d'un faux négatif (73). Ces deux types de non réplication sont majoritairement causés par des problèmes au niveau de l'expérimentation. Comme mentionné plus tôt, un facteur de correction trop sévère peut empêcher de déceler une association significative. De plus, les différences au niveau de la définition des phénotypes entre échantillons et les erreurs de génotypage sont d'autres exemples de problèmes qui peuvent induire des erreurs au niveau des résultats (77, 79).

Finalement, il est possible que l'observation initiale soit vraie pour la population étudiée, mais qu'elle ne s'applique pas aux études indépendantes. Dans ce cas, une non réplication est causée majoritairement par les différences au niveau des populations et de l'expression du trait étudié dans celles-ci. Par exemple, il est possible qu'un gène soit associé à un phénotype seulement lorsqu'il est en présence d'un autre facteur de risque ; soit génétique (GXG) ou environnemental (GXE) (73). C'est pour cette raison que les études d'interaction sont de plus en plus importantes, en particulier pour l'étude de traits complexes. L'étude de la voie biologique d'un gène déjà associé au trait étudié est tout aussi importante. Elle peut permettre la découverte de nouveaux gènes candidats intéressants (80). Par exemple, dans le cadre de cette étude les gènes *POU2F3* et le membre 2 de la famille filaggrine (*FLG2*) sont ressortis comme des facteurs de risque intéressants pour les maladies atopiques. Pourtant, ces gènes ne sont pas reconnus pour leur implication au niveau de ces maladies. L'étude de valeurs  $p$  combinées peut aussi être utile afin de vérifier si un gène est significatif pour l'ensemble des échantillons indépendants à l'étude (81). Dans le cadre de cette étude, le gène *POU2F3* est une fois de plus ressorti comme un facteur de risque

intéressant pour les quatre échantillons combinés. Il serait donc intéressant de répliquer cette étude dans d'autres échantillons de même nature. C'est grâce à l'étude de la voie biologique que ces résultats se sont révélés. Grâce à ces études il serait possible de déterminer et caractériser de nouveaux déterminants génétiques à risque pour ces maladies. Du fait même, elles permettraient d'identifier certains individus qui pourraient être à risque et donc permettre une prévention. Elles permettraient aussi d'identifier de nouvelles voies biologiques comme cibles thérapeutiques et finalement elles pourraient être bénéfiques pour trouver des thérapies mieux ciblées pour les individus selon leur structure génétique et leurs expositions environnementales (28, 82).

## 4.2 Perspectives

Le niveau de connaissance pour l'implication de ces gènes est restreint. Les gènes associés dans cette étude pourraient être des marqueurs biologiques qui permettraient de mieux comprendre l'histoire naturelle de l'asthme allergique. Il reste beaucoup de travail à accomplir afin de mieux définir l'implication de ces gènes au niveau de la pathophysiologie de l'asthme allergique. Premièrement, il serait intéressant d'effectuer une étude d'interaction pour les mêmes SNP et les mêmes phénotypes dans les trois cohortes indépendantes (SAGE, CAPPS et EGEA). Par la suite une étude de valeurs  $p$  combinées pourrait être réalisée avec les résultats obtenus dans les quatre cohortes. Avec les résultats de cette étude *POU2F3* semble être un facteur de risque à prendre en considération pour les maladies atopiques. Il serait intéressant d'effectuer une étude répliquative dans d'autres cohortes pour vérifier si *POU2F3* pourrait être considéré comme facteur de risque dans ces populations. Finalement, le séquençage de *FLG2* et *POU2F3* serait important afin de bien comprendre la structure moléculaire de ces gènes. De plus, le séquençage permettrait de trouver des SNP qui sont en déséquilibre de liaison avec le SNP associé. Ces SNP pourraient permettre l'identification de variants génétiques qui auraient un effet biologique concret (SNP codant, SNP

régulateur par exemple) (79). Le séquençage pourrait permettre aussi d'identifier des variants génétiques rares, mais qui pourraient avoir une implication fonctionnelle intéressante (79).

#### **4.2.1 Conclusion.**

Cette étude démontre bien l'importance d'explorer la voie biologique de gènes candidats pour l'étude génétique de traits complexes, ici l'asthme allergique. *POU2F3* n'est pas reconnu pour avoir un rôle au niveau des maladies atopiques, cependant, cette étude a permis de l'associer à l'asthme et à l'atopie particulièrement lorsqu'elles sont en présence de DA. Ces résultats suggèrent que ce type d'étude est important pour la découverte de nouveaux gènes pouvant être impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme allergique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Zhao Y, Liao H, Drummond HE, et al. Filaggrin loss-of-function variants are associated with atopic comorbidity in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Oct;15(10):1492-8.
2. Irvine AD, McLean WH. Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2006 Jun;126(6):1200-2.
3. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2007 Jun;127(6):1282-4.
4. Jang SI, Karaman-Jurukovska N, Morasso MI, Steinert PM, Markova NG. Complex interactions between epidermal POU domain and activator protein 1 transcription factors regulate the expression of the profilaggrin gene in normal human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*. 2000 May 19;275(20):15295-304.
5. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*. 2009 May 1;122(Pt 9):1285-94.
6. Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Glaser R, Schroder JM. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS One*. 2009;4(4):e5227.
7. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res*. 2008;9:4.
8. Ogawa E, Okuyama R, Egawa T, Nagoshi H, Obinata M, Tagami H, et al. p63/p51-induced onset of keratinocyte differentiation via the c-Jun N-terminal kinase pathway is counteracted by keratinocyte growth factor. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):34241-9.
9. Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, et al. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ*. 2006 Jun;13(6):1037-47.
10. Morasso MI, Markova NG, Sargent TD. Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J Cell Biol*. 1996 Dec;135(6 Pt 2):1879-87.
11. Cattaert T, Urrea V, Naj AC, De Lobel L, De Wit V, Fu M, et al. FAM-MDR: a flexible family-based multifactor dimensionality reduction technique to detect epistasis using related individuals. *PLoS One*. 5(4):e10304.
12. Horvath S, Xu X, Laird NM. The family based association test method: strategies for studying general genotype--phenotype associations. *Eur J Hum Genet*. 2001 Apr;9(4):301-6.
13. Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet*. 2004 Apr;74(4):765-9.



14. Li J, Ji L. Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*. 2005 Sep;95(3):221-7.
15. Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered*. 2008;66(2):87-98.
16. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. 1990 Jul;9(7):811-8.
17. Kauffmann F, Dizier MH, Pin I, Paty E, Gormand F, Vervloet D, et al. Epidemiological study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness, and atopy: phenotype issues. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Oct;156(4 Pt 2):S123-9.
18. Begin P, Tremblay K, Daley D, Lemire M, Claveau S, Salesse C, et al. Association of urokinase-type plasminogen activator with asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jun 1;175(11):1109-16.
19. Kheradmand F, Rishi K, Corry DB. Environmental contributions to the allergic asthma epidemic. *Environ Health Perspect*. 2002 Aug;110 Suppl 4:553-6.
20. van den Oord RA, Sheikh A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2009;339:b2433.
21. McGrath JA, Uitto J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol Med*. 2008 Jan;14(1):20-7.
22. Subbarao P, Becker A, Brook JR, Daley D, Mandhane PJ, Miller GE, et al. Epidemiology of asthma: risk factors for development. *Expert Rev Clin Immunol*. 2009 Jan;5(1):77-95.
23. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*. 2009 Oct 27;181(9):E181-90.
24. Hoffjan S, Ober C. Present status on the genetic studies of asthma. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec;14(6):709-17.
25. Kiyohara C, Tanaka K, Miyake Y. Genetic susceptibility to atopic dermatitis. *Allergol Int*. 2008 Mar;57(1):39-56.
26. Lee SH, Park JS, Park CS. The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. Oct;3(4):236-44.
27. Eichenfield LF, Hanifin JM, Beck LA, Lemanske RF, Jr., Sampson HA, Weiss ST, et al. Atopic dermatitis and asthma: parallels in the evolution of treatment. *Pediatrics*. 2003 Mar;111(3):608-16.
28. Chan IH, Leung TF, Tang NL, Li CY, Sung YM, Wong GW, et al. Gene-gene interactions for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jan;117(1):127-33.
29. Leung TF, Chan IH, Wong GW, Li CY, Tang NL, Yung E, et al. Association between candidate genes and lung function growth in Chinese asthmatic children. *Clinical and Experimental Allergy*. 2007;37:1480-6.
30. Anderson ML. Atopic dermatitis--more than a simple skin disorder. *J Am Acad Nurse Pract*. 2005 Jul;17(7):249-55.

31. Shaw TE, Currie GP, Koudelka CW, Simpson EL. Eczema Prevalence in the United States: Data from the 2003 National Survey of Children's Health. *J Invest Dermatol.* Aug 26.
32. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jun;123(6):1361-70 e7.
33. Palmer CN, Ismail T, Lee SP, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jul;120(1):64-8.
34. Spergel JM. From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann Allergy Asthma Immunol.* Aug;105(2):99-106; quiz 7-9, 17.
35. Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol.* May;22(2):125-37.
36. Schultz Larsen F. Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol.* 1993 May;28(5 Pt 1):719-23.
37. Hubiche T, Ged C, Benard A, Leaute-Labreze C, McElreavey K, de Verneuil H, et al. Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort. *Acta Derm Venereol.* 2007;87(6):499-505.
38. Morar N, Cookson WO, Harper JI, Moffatt MF. Filaggrin mutations in children with severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2007 Jul;127(7):1667-72.
39. Wuthrich B, Cozzio A, Roll A, Senti G, Kundig T, Schmid-Grendelmeier P. Atopic eczema: genetics or environment? *Ann Agric Environ Med.* 2007 Dec;14(2):195-201.
40. GINA. Global initiative for asthma. 2009 [updated December 2009;25.01.2010]; Available from: <http://www.ginasthma.com/Index.asp>.
41. Tremblay K. 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. Chicoutimi Ste-Foy 2003.
42. Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ, Laviolette M. Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics.* 2004 Mar 23;5(1):21.
43. Holgate ST. The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int.* 2008 Mar;57(1):1-10.
44. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007 Dec;56(4):341-8.
45. Zheng T, Yu J, Oh MH, Zhu Z. The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* Apr;3(2):67-73.
46. Beck LA, Leung DY. Allergen sensitization through the skin induces systemic allergic responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Nov;106(5 Suppl):S258-63.
47. Steinke JW, Rich SS, Borish L. 5. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Feb;121(2 Suppl):S384-7; quiz S416.

48. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol.* 2008 Mar;8(3):169-82.
49. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.* 2006 Mar;7(2):95-100.
50. Reijmerink NE, Bottema RW, Kerkhof M, Gerritsen J, Stelma FF, Thijs C, et al. TLR-related pathway analysis: novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy. *Allergy.* Feb;65(2):199-207.
51. Bottema RW, Nolte IM, Howard TD, Koppelman GH, Dubois AE, de Meer G, et al. Interleukin 13 and interleukin 4 receptor-alpha polymorphisms in rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol.*153(3):259-67.
52. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):470-3.
53. Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, Madore AM, Lariviere M, Moussette S, et al. Allele-specific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *Am J Hum Genet.* 2009 Sep;85(3):377-93.
54. Marenholz I, Kerscher T, Bauerfeind A, Esparza-Gordillo J, Nickel R, Keil T, et al. An interaction between filaggrin mutations and early food sensitization improves the prediction of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Apr;123(4):911-6.
55. Muller S, Marenholz I, Lee YA, Sengler C, Zitnik SE, Griffioen RW, et al. Association of Filaggrin loss-of-function-mutations with atopic dermatitis and asthma in the Early Treatment of the Atopic Child (ETAC) population. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009 Jun;20(4):358-61.
56. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):715-20.
57. Wang TN, Chen WY, Wang TH, Chen CJ, Huang LY, Ko YC. Gene-gene synergistic effect on atopic asthma: tumour necrosis factor-alpha-308 and lymphotoxin-alpha-Ncol in Taiwan's children. *Clin Exp Allergy.* 2004 Feb;34(2):184-8.
58. Melen E, Umerkajeff S, Nyberg F, Zucchelli M, Lindstedt A, Gullsten H, et al. Interaction between variants in the interleukin-4 receptor alpha and interleukin-9 receptor genes in childhood wheezing: evidence from a birth cohort study. *Clin Exp Allergy.* 2006 Nov;36(11):1391-8.
59. Vercelli D. Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Aug;122(2):267-71.
60. Basu K, Palmer CN, Lipworth BJ, Irwin McLean WH, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, et al. Filaggrin null mutations are associated with increased asthma exacerbations in children and young adults. *Allergy.* 2008 Sep;63(9):1211-7.
61. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunskisiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization

- and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem*. 1992 Nov 25;267(33):23772-81.
62. Brown SJ, Irvine AD. Atopic eczema and the filaggrin story. *Semin Cutan Med Surg*. 2008 Jun;27(2):128-37.
63. Marenholz I, Nickel R, Ruschendorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, et al. Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Oct;118(4):866-71.
64. De Benedetto A, Qualia CM, Baroody FM, Beck LA. Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol*. 2008 Jun;128(6):1594-7.
65. Rice NE, Patel BD, Lang IA, Kumari M, Frayling TM, Murray A, et al. Filaggrin gene mutations are associated with asthma and eczema in later life. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Oct;122(4):834-6.
66. Jang SI, Steinert PM, Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):24105-14.
67. King KE, Ponnampertuma RM, Gerdes MJ, Tokino T, Yamashita T, Baker CC, et al. Unique domain functions of p63 isoforms that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. *Carcinogenesis*. 2006 Jan;27(1):53-63.
68. Moore JH, Asselbergs FW, Williams SM. Bioinformatics challenges for genome-wide association studies. *Bioinformatics*. Feb 15;26(4):445-55.
69. Nica AC, Dermitzakis ET. Using gene expression to investigate the genetic basis of complex disorders. *Hum Mol Genet*. 2008 Oct 15;17(R2):R129-34.
70. Spencer CC, Su Z, Donnelly P, Marchini J. Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. *PLoS Genet*. 2009 May;5(5):e1000477.
71. illumina. 2010 [cited 2010 18/04/2010]; Available from: <http://www.illumina.com/>.
72. Raelson JV, Little RD, Ruether A, Fournier H, Paquin B, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 11;104(37):14747-52.
73. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*. 2005 Jun 3;573(1-2):54-69.
74. Madore AM, Prevost C, Dorfman R, Taylor C, Durie P, Zielenski J, et al. Distribution of CFTR mutations in Saguenay- Lac-Saint-Jean: proposal of a panel of mutations for population screening. *Genet Med*. 2008 Mar;10(3):201-6.
75. Scriver CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:69-101.
76. Kristiansson K, Naukkarinen J, Peltonen L. Isolated populations and complex disease gene identification. *Genome Biol*. 2008;9(8):109.
77. Kraft P, Zeggini E, Ioannidis JP. Replication in genome-wide association studies. *Stat Sci*. 2009 Nov 1;24(4):561-73.

78. Holloway JW, Koppelman GH. Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007 Feb;7(1):69-74.
79. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*. 2008 Mar 19;299(11):1335-44.
80. Edwards TL, Turner SD, Torstenson ES, Dudek SM, Martin ER, Ritchie MD. A general framework for formal tests of interaction after exhaustive search methods with applications to MDR and MDR-PDT. *PLoS One*. 5(2):e9363.
81. Whitlock MC. Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *J Evol Biol*. 2005 Sep;18(5):1368-73.
82. Agarwal DP. The role of gene-environment interactions in the development of respiratory disorders. *Institute of human genetics*. 2002;2(1):27-31.