

ANDRÉANNE MORIN

**ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE L'ASTHME ET LES GÈNES ASSOCIÉS À CE
PHÉNOTYPE ET À LA POLLUTION DE L'AIR, DANS UN ÉCHANTILLON
D'ASTHME PROVENANT D'UN ENVIRONNEMENT RÉGIONAL
CARACTÉRISÉ PAR DIFFÉRENTES INDUSTRIES**

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

L'asthme est un trait complexe et son développement serait associé à différents facteurs tant environnementaux que génétiques. L'interaction entre ces facteurs a précédemment été associée au développement et à la persistance du phénotype. Une analyse des polymorphismes situés au niveau des gènes précédemment associés à l'asthme et à un environnement particulier a été effectuée dans la collection familiale asthmatique du Saguenay–Lac-Saint-Jean (étude SLSJ). L'environnement de cette région est caractérisé, entre autres, par la présence d'industries de l'aluminium et de pâtes et papiers. Une stratification selon la proximité entre ces industries et le lieu de résidence des individus a été effectuée afin de déterminer l'impact de ces environnements sur la susceptibilité de certains déterminants génétiques sur le développement de l'asthme. Les résultats ont démontré une seule association pour un polymorphisme du gène *Catalase* (*CAT*) avec l'asthme dans l'étude SLSJ. La stratification en fonction de la distance physique de résidence par rapport aux industries n'a pas permis d'associer de nouveaux déterminants génétiques à l'asthme ou d'accroître la significativité de l'association entre *CAT* et l'asthme. Ces résultats suggèrent que *CAT* est associée à l'asthme dans l'étude SLSJ indépendamment de la proximité aux industries et donc de l'exposition à un environnement « à risque ».

AVANT-PROPOS

L'article présenté dans ce mémoire est présentement publié dans *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

La Dre Catherine Laprise, ma directrice de recherche et professeure-chercheure à l'Université du Québec à Chicoutimi, a fait le profil méthodologique de l'étude et a supervisé toutes les étapes du projet jusqu'à la publication de ce manuscrit. De plus, elle a construit et dirige la collection familiale asthmatique du SLSJ utilisée pour cette étude.

L'expertise du Dr Jeffrey R. Brook a été un atout très important pour la caractérisation et la mesure de l'exposition à l'environnement. Il a aussi aidé à la révision du manuscrit.

La Dre Caroline Duchaine a collaboré par son expertise (exposition et santé respiratoire) ainsi qu'à la révision du manuscrit.

Pour ma part, j'ai effectué la revue de la littérature, la sélection des gènes, la caractérisation de l'environnement du SLSJ, les analyses statistiques ainsi que la rédaction du manuscrit.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice, Dre Catherine Laprise pour m'avoir non seulement permis d'approfondir mes connaissances en génétique et en asthme, mais aussi pour m'avoir transmis son enthousiasme ainsi que sa passion pour la recherche. Merci de m'avoir intégrée dans ton laboratoire, de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi. Merci aussi pour ta disponibilité, ton honnêteté et ton dynamisme. Tu es un modèle pour moi et j'espère un jour avoir une carrière aussi enrichissante et palpitante que la tienne. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur le plan humain, je retiendrai ton leadership, ta façon de travailler et d'interagir avec les autres comme d'un exemple à appliquer dans ma future carrière.

Je voudrais aussi remercier la Dre Lisa Cameron qui m'a accueillie dans son laboratoire durant l'automne 2011. Ce stage a été grandement enrichissant tant au niveau personnel qu'académique. J'aimerais aussi remercier Courtney Davidson qui a grandement aidé à ce que le projet se déroule bien et m'a transmis ses connaissances de différentes techniques. Merci aussi à tous les membres du laboratoire de Dr Cameron ainsi que les membres du *Pulmonary Research Group* qui ont tous rendu mon séjour agréable.

Merci aussi à Dr Bruce Allen et Dr Brian Robinson qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires durant mes stages et m'ont montré les bases de la recherche et transmis leur passion pour celle-ci.

J'aimerais aussi remercier les coauteurs de l'article faisant partie de ce mémoire, Dre Caroline Duchaine ainsi que Dr Jeffrey R. Brook. L'expertise et les connaissances de ce dernier ont été grandement appréciées dans la description de l'environnement.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire Gépromic. Votre bonne humeur et votre sens de l'humour ont égayé mes journées! Merci pour votre aide, nos nombreuses discussions (pas toujours scientifiques!) et nos éclats de rire. Je suis très heureuse de vous avoir rencontré et vous avez toutes et tous un bel avenir devant vous.

J'aimerais aussi remercier ma famille, mes parents pour leur support et pour leurs encouragements. Ma mère pour son écoute, sa franchise et sa compréhension qui ont été

très important pour moi durant toute ma vie. J'aimerais remercier mon père pour m'avoir transmis sa passion pour les sciences et la recherche ainsi que pour ses précieux conseils qui m'ont grandement aidée. Merci de m'avoir toujours encouragée à poursuivre mon rêve de devenir chercheuse, c'est un peu grâce à vous si je fonce et que je garde la même ambition. Merci à ma sœur de m'avoir soutenue, encouragé et écouté tout au long de ma maîtrise et lors de mes doutes quant à mon choix de carrière.

Finalement, merci à Julien! Ta présence a été essentielle durant ces deux années. Tu es mon motivateur, tu as su me remonter le moral lors des mes moments de découragement, tu as su comment dédramatiser les situations qui m'ont semblé difficiles. Merci d'avoir admis avec moi que partir à Edmonton durant quatre mois était une expérience souhaitable pour ma carrière, de m'avoir encouragée à vivre cette expérience et ainsi offert tout ton appui. J'aimerais aussi souligner ta persévérance et ton positivisme face aux embuches de la dernière année. Merci d'être fier de moi; ça me donne de l'énergie et la force de continuer. J'espère que notre relation basée sur la confiance et le respect, mais aussi le plaisir, les fous rires et la complicité durera encore longtemps.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
AVANT-PROPOS	III
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 :	
1.1 L'asthme	2
1.1.1 Facteurs de risque de l'asthme	2
1.1.2 Physiopathologie de l'asthme	3
1.1.2.1 Hyperréactivité bronchique	3
1.1.2.2 Inflammation des voies respiratoires	3
1.1.2.3 Remodelage des voies respiratoires	4
1.1.2.4 La balance Th1/Th2 dans l'asthme	5
1.2. Interaction gènes-environnement dans l'asthme	6
1.2.1 Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition au tabac	7
1.2.2 Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition aux polluants de l'air	9
1.2.3 Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition aux endotoxines	12
1.2.4 Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition lié au lieu de travail	14
1.3. Sélection des gènes dans la littérature	16
1.4. Hypothèses et objectifs de l'étude	20
CHAPITRE 2 : Étude d'association entre l'asthme et les gènes associés à ce phénotype et à la pollution de l'air, dans un environnement rural caractérisé par différentes industries	21
2.1. Résumé	22
2.2. Abstract	25
2.3. Introduction	26
2.4. Methods	27
2.4.1 Subjects	27
2.4.2 Gene selection and genotype	28
2.4.3 Environment characteristics and air pollution data	28
2.4.4 Statistical analysis	30
2.5. Results	31
2.6. Discussion	32
2.7. Conclusion	35
2.8. Acknowledgment	36
2.9. References	37

CHAPITRE 3 : Discussion	48
3.1. La collection familiale asthmatique du Saguenay–Lac-Saint-Jean	48
3.2. Description de l’environnement du Saguenay–Lac-Saint-Jean	49
3.3. Analyse par gène candidat	52
3.4. Perspectives pour les futures études d’interaction gènes-environnement	53
3.4.1. Biomarqueurs de l’exposition à certains environnements	56
3.4.2. Interaction entre les données épigénétiques et environnementales	56
3.4.3. Interaction entre les gènes et plusieurs environnements	57
3.4.4. Outils bio-informatiques pour étudier les interactions gènes-environnement	58
CONCLUSION	60
RÉFÉRENCES	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Différences entre les réponses Th1 et Th2	5
Tableau 2. Gènes associés à l’asthme en tenant compte de l’exposition à la fumée du tabac	8
Tableau 3. Gènes associés à l’asthme en considérant l’exposition à la pollution de l’air	10
Tableau 4. Gènes associés à l’asthme en considérant l’exposition aux endotoxines	13
Tableau 5. Composés les plus communément associés à l’asthme professionnel et les types de travailleurs exposés	15
Tableau 6. Gènes associés à l’asthme professionnel	16
Table 7. Clinical characteristics of the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma study	40
Table 8. Levels of air pollutants measured in four places in the SLSJ area	41
Table 9. Transmission disequilibrium test (TDT) results with p value < 0.05 for genes selected in the literature and stratified according to proximity to aluminium or pulp and paper industries	42
Table 10. Transmission disequilibrium test (TDT) results with p value < 0.05 for haplotypes and stratified according to the proximity of aluminium and pulp and paper industries	43
Table 11. Polymorphisms analyzed in this study	44
Table 12. Proportions of individuals living within 10 km radius of different industries	46
Table 13. Total pollutant emissions in tones from different types of industry located in the SLSJ area for the year 2002	46
Tableau 14. Taux d’hospitalisation en soins physiques pour les maladies des voies respiratoires inférieures de 2006 à 2009	49
Tableau 15. Source d’émission de polluants de l’air dans la région du SLSJ pour la période allant de 2000 à 2003	50

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Schéma comparant les bronches d'un individu sain comparativement à un individu atteint d'asthme lors d'une exacerbation des symptômes d'asthme. 4
- Figure 2.** Pairwise linkage disequilibrium pattern of the *CAT* gene single nucleotide polymorphisms (SNPs). 47

INTRODUCTION

En 2007, près de 3 millions de Canadiens ont été diagnostiqués asthmatiques et ce sont les enfants et les adolescents qui représentent la majorité des cas (1). Cette maladie possède le plus haut taux d'hospitalisation faisant de l'asthme un problème majeur de santé publique (1). Depuis 1987, malgré la baisse des taux de mortalité, l'asthme représente l'un des plus importants fardeaux pour le système de santé en plus de réduire la qualité de vie des personnes souffrant d'asthme et de leurs familles (2).

L'asthme est la maladie chronique la plus répandue chez les enfants (3, 4). Elle est caractérisée par une hyperréactivité bronchique accompagnée d'une inflammation et d'un remodelage des tissus au niveau des voies respiratoires (5). L'asthme est un trait complexe ce qui signifie que plusieurs facteurs de risques ont été identifiés et peuvent être divisés en deux catégories : les facteurs de l'hôte (génétique, obésité, sexe, etc.) et les facteurs environnementaux (allergènes, infections, tabac, pollution de l'air, etc.) (6). La reconnaissance des déterminants génétiques dans la maladie est bien documentée (7); il s'agit en fait d'une composante polygénique et plus de 300 gènes ont été associés à l'asthme et le profil génétique de la maladie diffère d'une population à l'autre (7). C'est une maladie à large spectre, c'est-à-dire que les manifestations cliniques reliées à la maladie varient d'un individu atteint à l'autre (5, 6). Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie (6, 8) et l'implication de plusieurs molécules a été mise en évidence comme ayant un rôle dans l'étiologie de l'asthme (9). Les déterminants génétiques impliqués, la composante cellulaire (éosinophilique ou neutrophilique par exemple) ainsi que les voies biologiques impliquées (mécanismes moléculaires documentés dans diverses études) pourraient expliquer la variabilité clinique retrouvée entre les personnes atteintes d'asthme (5, 8). Ainsi, les combinaisons variables de ces paramètres pourraient par l'établissement de « *cluster* » définir des endotypes d'asthme. Actuellement, suite à l'avènement des études d'associations pangénomiques (*Genome Wide Association Studies* : GWAS), les études s'orientent de plus en plus sur l'interaction entre les gènes et l'environnement afin de mieux comprendre la maladie de même que sur le développement d'outils afin d'intégrer les données génétiques (ex : études d'association, GWAS) aux données reliées à l'environnement (ex.: épigénétique, alimentation, exposition au tabac).

CHAPITRE 1

1.1. L'ASTHME

1.1.1. Facteurs de risque de l'asthme

L'asthme est un trait complexe et plusieurs facteurs de risque sont associés à la maladie. Ces facteurs peuvent se diviser en deux catégories : les facteurs de risques de l'hôte (génétique, sexe, obésité) et les facteurs de risques environnementaux (allergènes, tabac, infections, pollution de l'air) (5, 6). Un des principaux facteurs de risques de l'asthme est le facteur génétique (5, 7). Plusieurs gènes sont associés à la maladie. Différentes régions chromosomiques ont été identifiées comme associées à l'asthme, l'atopie ou d'autres phénotypes semblables dont les régions les plus fréquemment reportées sont les chromosomes 5q, 6p, 11q, 12q, 13q, 14q (10). Les recherches portant sur les variants génétiques associés à l'asthme ont été concentrées sur différents gènes liés à différents aspects de la maladie : la production d'anticorps spécifiques Immunoglobuline (Ig) E, l'hyperréactivité bronchique, la production de médiateurs inflammatoires ainsi que la détermination de la réponse Th2 versus Th1 (5, 9, 11, 12). Les études génétiques permettent l'identification de gènes ainsi que des voies biologiques qui pourraient expliquer la composante moléculaire de la maladie. Puisque l'asthme est un trait complexe, les gènes associés seraient responsables de la susceptibilité de développer la maladie et non directement responsables du phénotype comme dans les maladies mendéliennes (13). De plus, différents environnements ont aussi été démontrés comme ayant une influence sur le développement de l'asthme ainsi que la combinaison de certains gènes à un environnement précis (mentionné dans le chapitre 2). C'est pourquoi l'interaction entre les gènes et l'environnement doit être étudiée afin de mieux comprendre l'histoire naturelle de la maladie. En effet, certains facteurs environnementaux pourraient amplifier l'impact de gènes sur le phénotype de l'asthme.

1.1.2. Physiopathologie de l'asthme

L'asthme est une maladie des voies respiratoires caractérisée par une hyperréactivité bronchique, une inflammation ainsi que le remodelage des voies respiratoires qui apparaît avec la chronicité de la maladie (5). Ces derniers aspects sont variables d'un individu atteint à l'autre suivant de nombreux paramètres incluant les facteurs déclenchant les symptômes, la sévérité du trait, le génome de l'individu, etc. Puisque ces éléments ne sont pas le sujet du présent mémoire, ils ne seront que brièvement décrits dans les prochains paragraphes.

1.1.2.1. Hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique (HRB) est une des principales caractéristiques fonctionnelles liées à l'asthme. Elle peut être décrite comme le résultat d'une exposition à un stimulus qui provoque un rétrécissement des voies respiratoires (5). Cela mène à une limitation de la quantité d'air parvenant aux poumons (5). L'HRB est directement liée à l'inflammation et au remodelage des voies respiratoires (5). L'HRB est caractérisée par différents mécanismes : la contraction excessive (14) et une hyperplasie et une hypertrophie (15) des muscles lisses des voies respiratoires, l'épaississement de la paroi des voies respiratoires (16).

1.2.2. Inflammation des voies respiratoires

L'inflammation des voies respiratoires est persistante chez les asthmatiques; c'est-à-dire qu'elle est présente même si les symptômes sont épisodiques (17, 18). Celle-ci est présente chez tous les sujets atteints d'asthme, qu'ils soient atteints d'asthme léger ou sévère. C'est un processus qui implique plusieurs cellules comme les lymphocytes T CD4+, les neutrophiles, les mastocytes ainsi que les éosinophiles dont l'infiltration au niveau des voies respiratoires constitue une des caractéristiques les plus importantes de ce mécanisme (19). De plus, les médiateurs inflammatoires liés à ces différents types cellulaires (cytokines, chimiokines, leucotriènes, etc.) sont aussi impliqués dans l'inflammation des voies respiratoires (5, 9).

1.1.2.3. Remodelage des voies respiratoires

Des changements dans la structure des voies respiratoires peuvent se produire lors de la maladie. Ce phénomène est appelé remodelage et est souvent en lien direct avec la sévérité et la chronicité de la maladie. Le remodelage résulte la plupart du temps en un rétrécissement irréversible des voies respiratoires (5, 20). Un des mécanismes impliqués est la libération de facteurs fibrogéniques par les cellules épithéliales qui résulte d'un dépôt de fibres de collagène et de protéoglycanes dans la partie réticulaire sous la membrane basale (5, 21, 22). Conjointement à ce dépôt de collagène, l'augmentation du volume des muscles lisses des voies respiratoires, due à une hypertrophie et à une hyperplasie ainsi qu'à une prolifération des vaisseaux sanguins, contribue à l'épaississement apparent des voies respiratoires (5, 23). Finalement, une hyperplasie des glandes produisant le mucus est une des caractéristiques du remodelage des voies respiratoires (23).

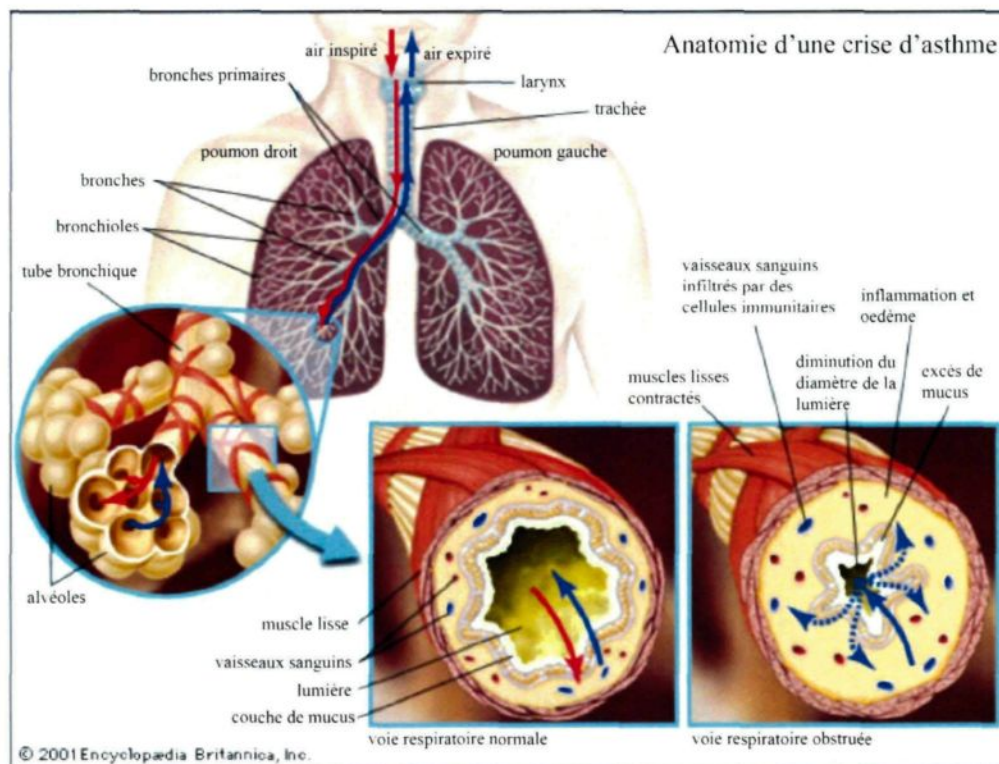


Figure 1. Schéma comparant les bronches d'un individu sain comparativement à un individu atteint d'asthme lors d'une crise. Lors d'une exacerbation (crise d'asthme) les principaux facteurs notés sont : une réduction de la lumière des voies aériennes, une contraction des muscles lisses, la présence d'une inflammation et une sécrétion excessive

de mucus. Les principaux facteurs qui peuvent déclencher une exacerbation de l'asthme ainsi que les éléments pathophysiologiques importants qui se produisent, sont décrits dans l'article de revue ayant pour titre « *Asthma exacerbations. 2 : aetiology* » écrit par Singh et Busse (24). (Source de l'image : Encyclopedia Britannica 2001).

1.1.2.4. La balance Th1/Th2 dans l'asthme

Les cellules T sont grandement impliquées dans la réponse immunitaire. Celles-ci peuvent se diviser en deux types, les cellules T CD8 (ou T cytotoxiques) et les cellules T CD4 (ou T auxiliaire (Th)) (25). Les premières ont comme rôle de tuer les cellules infectées et les secondes ont comme fonction principale de sécréter des cytokines qui activent d'autres cellules du système immunitaire (25). Les cellules T CD4 naïves peuvent se diviser en deux groupes, soit les cellules Th1 et Th2 (25). Ces cellules se différencient selon la nature des cytokines qu'elles sécrètent et l'effet que ces dernières exercent sur la réponse immunitaire (25). Le tableau 1 décrit les principales cytokines sécrétées, les types cellulaires activés ainsi que le type de réponse immunitaire associé.

Tableau 1. Différences entre les réponses Th1 et Th2

	Th1	Th2
Molécules impliquées	IFN- γ , TNF- α , IL-2	IL-4, -5, -6, -9, -10, -13, TGF- β
Type de cellule	Macrophages	Cellules B
Réponse immunitaire	Réponse immunitaire cellulaire. Activation des macrophages, cellules NK et cellules T cytotoxiques.	Réponse immunitaire humorale. Stimule la prolifération des cellules B et la production d'anticorps.

IFN- γ = Interféron gamma, TNF- α = *tumor necrosis factor alpha*, IL= interleukine, TGF- β = *transforming growth factor beta* (25, 26).

Les cellules Th1 CD4 ont comme rôle d'activer les macrophages qui pourront par la suite, ingérer et tuer les agents pathogènes se retrouvant à l'extérieur des cellules (25). Les cellules Th2 CD4, quant à elles, ont comme principale fonction la stimulation des cellules B qui sont responsables de la production des Immunoglobulines (Ig) E (25).

L'asthme a été précédemment associé à une inflammation dirigée par les cellules de type Th2 (27). La présentation d'un antigène aux cellules T CD4+ naïves va moduler la différenciation de celles-ci en cellules Th1 ou Th2 selon la présence de certaines cytokines (27). Plusieurs études ont démontré une plus grande abondance de cellules de type Th2

chez les personnes atteintes d'asthme léger à modéré (19). La production de cytokines de type Th2 permet le recrutement de cellules comme les macrophages, les basophiles et les éosinophiles au niveau des voies respiratoires (19). Les cytokines Interleukine (IL) -4 et IL-13 qui sont sécrétées par les cellules de type Th2 ont la propriété d'activer les cellules B et de déclencher par la suite la production d'anticorps. La cytokine IL-5, qui est aussi sécrétée par les cellules Th2, recrute quant à elle, les éosinophiles (19). Les cellules Th1 de type CD4 ainsi que les cellules T CD8 cytotoxiques ont, quant à elles, été associées à l'asthme sévère (19). Le mécanisme de l'implication de ces deux types de cellules dans le phénotype n'est pas complètement élucidé.

Plus récemment, un troisième type de cellule T auxiliaire a été documenté; les cellules Th17 caractérisées par la sécrétion de la cytokine IL-17 (28, 29). Les cellules Th17 ont été associées au départ à la protection contre les pathogènes extracellulaires ainsi qu'impliquées dans la réponse auto-immune (28, 29). Une implication de la réponse Th17 a été associée à l'asthme (28, 29). Cette réponse est caractérisée par la sécrétion de l'IL-17 qui induit la production et le recrutement des neutrophiles (28, 29). Celle-ci est donc associée aux formes d'asthme plus sévères dont l'inflammation est principalement associée aux neutrophiles plutôt qu'aux éosinophiles (28, 29).

1.2. INTERACTION GÈNES-ENVIRONNEMENT DANS L'ASTHME

La génétique de l'asthme a été largement étudiée. L'identification d'un grand nombre de gènes pourrait indiquer que ceux-ci interagissent ensemble et ont chacun un effet mineur sur le phénotype, plutôt qu'un nombre limité d'entre eux ayant un effet marqué sur le développement de la maladie (30). Différents types d'études génétiques ont été utilisés afin de déterminer l'implication de différents gènes dans l'asthme : les études de liaisons ou d'associations pangénomiques, ainsi que les études de gènes candidats (31).

Différentes études ont essayé de déterminer comment certains gènes agissent de concert avec l'environnement pour induire le développement de l'asthme. En effet, l'importance d'inclure l'exposition à différents environnements a été démontrée dans de nombreuses études génétiques de l'asthme. Si peu d'études génétiques sur l'asthme considéraient les expositions à l'environnement dans leurs analyses, ce n'est plus le cas

depuis la dernière décennie (32). Ainsi, plusieurs environnements ont été étudiés, pour faciliter la revue de ces facteurs environnementaux, quatre catégories seront utilisées dans la prochaine section : l'exposition à la fumée du tabac, l'exposition à la pollution de l'air, l'exposition aux produits microbiens (endotoxines) de même que l'exposition aux irritants reliés au milieu de travail.

1.2.1. Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition au tabac

L'exposition à la fumée du tabac est l'une des composantes environnementales les plus étudiées dans l'interaction gènes-environnement dans l'asthme. L'exposition au tabac durant l'enfance ainsi que l'exposition *in utero* ont été démontrées comme des facteurs de risques déterminant pour le développement de la maladie (33–35). D'autres études ont aussi établi qu'il y aurait possiblement un lien entre l'histoire familiale d'asthme (héritabilité) et l'exposition à la fumée de cigarette (35).

Plusieurs études de gènes candidats ont évalué l'interaction entre cette exposition et le développement de la maladie. Un des principaux types de gènes étudiées sont les Glutathione S-transferases (*GSTM1* (36, 37), *GSTP1* (38, 39), *GSTT1* (36)). Ces gènes codent pour des protéines qui sont impliquées dans le processus de détoxification et du stress oxydatif (40). Des gènes codant pour des molécules impliquées dans la réponse immunitaire ont aussi été associés à l'asthme en lien avec l'exposition à la fumée de cigarette. Des gènes comme *IL13* (41), *IL1RN* (42), *Transforming Growth Factor Beta 1* (*TGFB1*) (43), *CD14* (44) et *Tumor Necrosis Factor* (*TNF*) (45) ont été associés plus fortement à l'asthme lorsqu'exposés à la fumée du tabac. De plus, dans certaines études, l'association de ces gènes a été seulement observée lorsqu'il y avait exposition à la fumée du tabac *in utero* ou en bas âge (voir Tableau 2). Les différentes études portant sur l'interaction gènes-environnement dans l'asthme liées à l'exposition à la fumée du tabac sont décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2. Gènes associés à l'asthme en tenant compte de l'exposition à la fumée du tabac

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>ADAM33</i>	Reijmerink <i>et al.</i> 2009 (46)	<i>ADAM33</i> <i>Gly691Gly</i> (<i>rs528557 C</i>) <i>ADAM33</i> <i>Val684Ile</i> (<i>rs3918396 A</i>)	Associé à l'asthme et à l'hyperréactivité bronchiques.	<i>In utero</i>
<i>ADRB2</i>	Wang <i>et al.</i> 2008 (47)	<i>ADRB2/Agr16</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de la respiration sifflante.	<i>In utero</i>
<i>CD14</i>	Choudhry <i>et al.</i> 2005 (44)	<i>CD14/+1437</i> <i>GG/GC</i>	Associé à la sévérité de l'asthme.	Fumée secondaire (ETS)
<i>GSTM1</i> <i>GSTT1</i>	Kabesch <i>et al.</i> 2004 (36)	<i>GSTM1null</i> <i>GSTT1null</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme, des symptômes reliés à l'asthme et de la respiration sifflante.	<i>In utero</i>
<i>GSTM1</i>	Gilliland <i>et al.</i> 2002 (37)	<i>GSTM1null</i>	Associé à une ↑ de la prévalence de l'apparition précoce d'asthme, d'asthme et d'asthme persistant.	<i>In utero</i>
<i>GSTM1</i>	Rogers <i>et al.</i> 2009 (48)	<i>GSTM1null</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme.	<i>In utero</i>
<i>GSTM1</i> <i>GSTP1</i>	Palmer <i>et al.</i> 2006 (49)	<i>GSTM1null</i> <i>GSTP1/Val105</i>	Associé à une ↑ de la susceptibilité de développer de l'asthme.	Fumée secondaire
<i>GSTM1</i> <i>NQO1</i>	Li <i>et al.</i> 2009 (50)	<i>GSTM1null</i> <i>NQO1</i> <i>Pro187Ser</i>	Impliqué dans le développement de l'asthme.	Fumée secondaire
<i>GSTP1</i>	Li <i>et al.</i> 2008 (38)	<i>GSTP1</i> <i>Ile105Val</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de la respiration sifflante.	<i>In utero</i>
<i>GSTP1</i>	Lee <i>et al.</i> 2007 (39)	<i>GSTP1/Val105</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de la respiration sifflante.	Fumée secondaire
<i>IL13</i>	Sadeghnejad <i>et al.</i> 2007 (41)	Haplotype contenant 5 SNP	Associé à une ↑ du risque de développer l'apparition précoce de respiration sifflante et persistante.	<i>In utero</i>
<i>IL1RN</i>	Ramadas <i>et al.</i> 2007 (42)	<i>IL1RN/-96 GG</i> (<i>rs2234678</i>)	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme infantile.	<i>In utero</i>

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>TGFB1</i>	Salam <i>et al.</i> 2007 (43)	<i>TGF-β1/-509TT</i>	Associé à une ↑ 3 à 4 fois risque de développer de l'asthme persistant.	<i>In utero</i>
<i>TNF</i>	Wu <i>et al.</i> 2007 (45)	<i>TNF/-308A</i> <i>TNF/-238A</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme chez les enfants dont les parents ne fument pas.	Fumée secondaire

ADAM33= ADAM *metallopeptidase domain* 33, ADRB2= *adrenergic beta-2 receptor*, GSTM1= Glutathione S-transferase mu 1, GSTT1= Glutathione S-transferase theta 1, GSTP1= Glutathione S-transferase pi 1, NQO1= NAD(P)H dehydrogenase quinone 1, IL= interleukine, IL1RN= interleukin 1 receptor antagonist, TGFB1= transforming growth factor beta 1, TNF= tumor necrosis factor.

Puisque plusieurs études sur l'asthme comportaient souvent des questions concernant l'exposition au tabac dans leur questionnaire, cet aspect a pu être considéré dans les analyses subséquentes. Ces nouvelles analyses ont permis de déterminer que la considération de ce paramètre permettait de mieux définir les phénotypes et augmentait, en quelque sorte la puissance de l'étude (51–53). De manière plus précise, la combinaison du statut asthme et fumeur a conduit à l'identification d'un plus grand nombre de régions chromosomiques impliquées, et ce, malgré le nombre plus restreint de sujets par groupe dû à la stratification (51–53).

1.2.2. Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition aux polluants de l'air

Plusieurs études ont démontré que les polluants de l'air ont un effet délétère sur l'asthme déjà présent chez un individu. Par exemple, l'exposition à ceux-ci augmenterait les exacerbations et diminuerait la fonction pulmonaire, et aurait ainsi un impact sur l'augmentation des risques d'hospitalisation ou de visite à l'urgence (54, 55). Le génome de l'individu pourrait expliquer la réponse variable d'une personne asthmatique par rapport à une autre pour une même exposition. Ainsi, depuis quelques années les chercheurs en génétique de l'asthme tentent de définir l'impact de l'exposition à certains composants en relation avec la présence de certains variants génétiques reliés à l'asthme ou qui ont une fonction biologique qui pourrait avoir un lien avec la réponse à une exposition particulière. Le principal défi réside dans la mise en évidence du lien biologique possible et de la mesure réelle de l'exposition pour l'individu.

Plusieurs polluants de l'air ont été étudiés en lien avec l'asthme: l'ozone, les hydrocarbures aromatiques polycycliques provenant des voitures, les particules de diésel, le dioxyde de soufre, les particules en suspension et les oxydes d'azote. L'interaction avec l'environnement peut aussi être mesurée selon la proximité du trafic et des « routes majeures » (43, 56). En effet, les sources de la majorité de ces polluants de l'air évalués proviennent habituellement du trafic et des voitures. Par ailleurs, les sources de dioxyde de soufre qui proviennent majoritairement des industries sont également retrouvées dans la littérature et sont étudiées comme composantes environnementales reliées au milieu de travail (voir section 2.4) (57). Une description plus détaillée des études sur l'interaction gènes-environnement dans l'asthme et l'exposition à la pollution de l'air sont décrites dans le Tableau 3.

Tableau 3. Gènes associés à l'asthme en considérant l'exposition à la pollution de l'air

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>ARG1</i>	Salam <i>et al.</i> 2009 (58)	Haplotype <i>ARG1h4</i> (rs2608981A-rs3895535G-rs2608937G-rs2749935T-rs2781659A-rs2246012T)	Associé à une ↓ du risque de développer l'asthme chez les enfants.	Ozone
<i>CAT</i> et <i>MPO</i>	Wenten <i>et al.</i> 2009 (59)	<i>CAT</i> /-330 GG <i>MPO</i> /-463 GA ou AA)	Agissent de façon épistatique et seraient associée à un ↑ risque d'absences à l'école reliée à des problèmes respiratoires chez des enfants.	Ozone, NO ₂ et PM ₁₀
<i>EPHX1</i> et <i>GSTP1</i>	Salam <i>et al.</i> 2007 (56)	<i>EPHX1</i> <i>His139Arg</i> <i>GSTP1</i> <i>Val105Val</i>	<i>EPHX1</i> / <i>His139Arg</i> est associé à une ↑ 3 fois plus de risque de développer de l'asthme. Combiné à <i>GSTP1</i> , <i>Val105Val</i> ↑ le risque à 9 fois.	Proximité d'une « route majeure »
<i>GSTM1</i>	Romieu <i>et al.</i> 2004 (60)	<i>GSTM1null</i>	Les sujets atteints d'asthme ayant ce génotype sont plus susceptibles aux effets délétères de l'ozone.	Ozone
<i>GSTM1</i> et	Romieu <i>et al.</i> 2006	<i>GSTM1null</i> <i>GSTP1</i>	Les sujets atteints d'asthme ayant ce génotype sont plus	Ozone

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>GSTP1</i>	(61)	<i>Val105Val</i>	susceptibles au développement des symptômes respiratoires relié à l'ozone.	
<i>GSTM1</i> et <i>NQO1</i>	David <i>et al.</i> 2003 (62)	<i>GSTM1null</i> <i>NQO1 Pro187Ser</i>	La combinaison des SNP a un effet protecteur sur l'asthme.	Ozone
<i>TNF</i> <i>GSTM1</i> <i>GSTP1</i>	Li <i>et al.</i> 2006 (63)	<i>TNF/-308 GG</i> <i>GSTM1null</i> <i>GSTP1 Ile105Ile</i>	<i>TNF/-308 GG</i> une ↓ du risque de développer de l'asthme chez les individus vivants dans un milieu où les niveaux d'ozone sont faibles. L'effet est encore plus marqué lorsque combiné à <i>GSTM1null</i> et <i>GSTP1 Ile105Ile</i> .	Ozone
<i>GSTP1</i>	Schroer <i>et al.</i> 2009 (64)	<i>GTSP1 Ile105Val/Val105Val</i>	Associé à une ↑ du risque de développer respiration sifflante.	Particules de diesel (DEP)
<i>GSTP1</i> <i>GSTM1</i> <i>NQO1</i>	Chen <i>et al.</i> 2007 (65)	<i>GTSP1 Ile105Val/Val105Val</i> <i>GSTM1null</i> <i>NQO1 Pro187Pro</i>	Plus à risque puisque relié à une ↓ des fonctions respiratoires lorsqu'exposés à l'ozone (<i>GSTP1</i> seul et <i>GSTM1null</i> et <i>NQO1 Pro187Pro</i> combiné).	Ozone
<i>GSTP1</i>	Islam <i>et al.</i> 2009 (66)	<i>GSTP1 Ile105Ile</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme chez les individus pratiquant plus de 3 sports et exposés à l'ozone.	Ozone
<i>GSTP1</i>	Lee <i>et al.</i> 2004 (67)	<i>GSTP1 Ile105Ile</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme.	Polluant de l'air élevé
<i>NQO1</i>	Castro-Giner <i>et al.</i> 2009 (68)	<i>Rs2917666 C/C</i>	Associé à une ↑ du risque de développer de l'asthme.	NO ₂ lié au trafic
<i>TGFBI</i>	Salam <i>et al.</i> 2007 (43)	<i>TGF-β1/-509TT</i>	3 fois plus de risque de développer de l'asthme.	Proximité autoroutes
<i>TNF</i>	Lee <i>et al.</i> 2009 (69)	<i>TNF/-308 GG</i>	Effet protecteur chez les sujets exposés à un faible niveau d'ozone.	Ozone

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>TNF</i>	Yang <i>et al.</i> 2004 (70)	<i>TNF/-308 GA/GG</i>	Associé à une ↓ de la fonction pulmonaire chez des sujets ayant de l'asthme ou de la rhinite.	Ozone

ARG1= arginase liver, CAT= catalase, MPO= myeloperoxidase, EPHX1= epoxide hydrolase 1, GSTM1= glutathion S-transferase mu 1, GSTP1= glutathione S-transferase pi 1, NQO1= NAD(P)H dehydrogenase quinone 1, TGFB1= transforming growth factor beta 1, TNF= tumor necrosis factor.

2.3. Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition aux endotoxines

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la prévalence de l'asthme et des allergies était significativement moindre chez les individus ayant grandi sur une ferme ou dans un environnement rural durant leur enfance. Ces données viennent appuyer l'hypothèse de l'hygiène qui prétend que l'exposition à différentes substances microbiennes durant le développement pourrait protéger contre le développement d'asthme et d'allergies (71). L'hypothèse de l'hygiène a été développée à la base sur l'observation du fait que les enfants ayant des frères et sœurs plus âgés développaient moins d'allergies (11). Dans une interprétation plus avancée de cette hypothèse, on parle d'exposition à différentes infections virales et bactériennes, mais aussi à des agents microbiens non pathogéniques comme les endotoxines. Ceux-ci sont un composé de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatives et sont présents en grande quantité dans les fermes. De manière plus précise, les différentes sources sont : l'exposition au bétail dans les fermes (72) et à d'autres espèces d'animaux de ferme (73), la consommation de lait non pasteurisé (74), la poussière provenant des maisons ou du lit des sujets (75) sont toutes des sources d'expositions précédemment étudiées en lien avec l'asthme. Il a aussi été démontré que les enfants vivants sur une ferme ont une plus grande diversité de produits microbiens dans la poussière et sur leurs lits que ceux ne vivant pas sur une ferme (76). Ceci a été associé de façon inverse à la probabilité de développer l'asthme chez ces enfants (76).

Une explication possible pour l'effet protecteur des endotoxines sur le développement de l'asthme et des allergies se situerait au niveau de la balance Th1/Th2 (77). L'exposition aux produits microbiens en bas âge stimulerait le système immunitaire et favoriserait une augmentation de la réponse Th1 aux dépens de la réponse Th2 (77). La plupart des gènes impliqués dans l'asthme en relation avec un environnement rural sont

donc des gènes codant pour des récepteurs qui reconnaissent les différents produits microbiens: *CD14*, *Toll Like Receptor 2 (TLR2)* et *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing 1 (NOD1)* (Tableau 4).

Tableau 4. Gènes associés à l'asthme en considérant l'exposition aux endotoxines

Gènes	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>ACAA1</i>	Sordillo <i>et al.</i> 2011 (78)	<i>ACAA1</i> <i>Glu172Asp G</i> (<i>rs156265</i>)	Associé à une ↓ du risque de développer l'asthme.	Poussière de maison
<i>CD14</i>	Smit <i>et al.</i> 2009 (79)	<i>CD14/-260 CC</i> <i>CD14/-260 T</i>	L'interaction entre <i>CD14/-260 CC</i> et un environnement rural aurait un effet protecteur sur le développement de l'asthme chez les sujets atopiques. <i>CD14/-260 T</i> combiné à l'environnement rural aurait un effet protecteur sur l'asthme chez les sujets non-atopiques.	Environnement rural
<i>CD14</i>	Bieli <i>et al.</i> 2007 (80)	<i>CD14/-1721 AA</i>	Associé à une ↓ du risque de développer l'asthme.	Consommation de lait de ferme
<i>IL4</i>	Hwang <i>et al.</i> 2012 (81)	<i>IL4/-589CT</i>	Associé à une ↑ du risque de développer l'asthme.	Moisissures dans la maison
<i>NOD1</i> (<i>CARD4</i>)	Eder <i>et al.</i> 2006 (82)	<i>CARD4/-21596 T</i>	Associé à une ↓ de la fréquence d'allergies et d'asthme chez les enfants.	Enfants vivants sur une ferme
<i>P2Y12</i>	Bunyavanich <i>et al.</i> 2011	<i>Rs8180086A</i> (3'UTR), <i>rs3732765A</i> (intron), <i>rs10935840G</i> (intron), <i>rs11708767A</i> (3'UTR)	Associé à une ↓ les fonctions respiratoires.	Poussière de maison
<i>TLR2</i>	Smit <i>et al.</i> 2009 (79)	<i>TLR2/+596C</i>	Facteur de risque pour l'asthme chez les sujets n'ayant pas grandi dans un milieu rural.	Environnement rural
<i>TLR2</i>	Eder <i>et al.</i> 2004 (83)	<i>TLR2/-16934 T</i>	Associé à une ↓ du risque de développer l'asthme.	Enfants vivants sur une ferme

ACAA1= acetyl-CoA acetyltransferase 1, IL= interleukine, NOD1= nucleotide-binding oligomerization domain containing 1, P2Y12= purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, TLR= toll-like receptor, UTR= *untranslated region*.

1.2.4. Interaction entre les gènes associés à l'asthme et l'exposition lié au lieu de travail

Quelques études ont déterminé la présence d'un lien entre des expositions reliées au milieu de travail et le développement de l'asthme. On peut diviser le développement de la maladie en deux catégories : l'asthme professionnel et l'asthme exacerbé par le milieu de travail ou les irritants respiratoires reliés au travail (84). À l'instar de l'asthme qui se développe souvent en bas âge, l'asthme professionnel se développe plus tard au cours de la vie, mais serait aussi le résultat de l'influence de composantes génétiques et environnementales. Les sources d'expositions peuvent provenir de composés dits allergènes (divisés selon s'ils sont de poids moléculaire élevé (*High Molecular Weight* (HMW)) (par exemple des protéines animales ou végétales) ou faible (*Low Molecular Weight* (LMW)) (composés organiques ou inorganiques) ou de composés irritants (par exemple, la chlorure, le dioxyde de soufre, les produits de combustion ou l'ammoniac sont les plus fréquents) (85). Les composantes HMW sont souvent d'origines animales ou végétales et sont associées à un mécanisme impliquant les immunoglobulines (Ig) E, tandis que ceux LMW sont des agents organiques ou inorganiques majoritairement non associés au mécanisme impliquant les IgE (86). L'étude de l'impact de l'environnement du milieu de travail sur le développement de l'asthme est assez laborieuse. Premièrement, environ 360 composés ou procédés ont été étudiés et quelques-uns ont été associés plusieurs fois (isocyanates, animaux, produits céréaliers, etc.) (87). Ces composés sont répertoriés dans différents articles de revues (88–90) ou sur différents sites Internet (par exemple (87)). De plus, il faut prendre en considération les niveaux d'exposition, mais aussi le mode d'exposition ainsi que les facteurs de l'hôte (genre, hyperréactivité bronchique, atopie et facteurs génétiques) (85). Le tableau 5 répertorie les différents composés associés à l'asthme professionnel ainsi que les types de professions associés à ces expositions.

Tableau 5. Composé les plus communément associés à l'asthme professionnel et les types de travailleurs exposés

Composé	Profession
Diisocyanates	Peintres, travailleurs automobiles, fabricants de mousse rigides ou flexibles et colle de polyuréthane et poseurs d'isolants.
Poussière de bois, résine phénol-formaldéhyde et colles contenant des diisocyanates.	Menuisiers, charpentiers et travailleurs forestiers.
Latex naturel (ex.: gants), glutaraldéhyde, formaldéhyde, méthacrylate de méthyle, pénicilline et autres médicaments retrouvées sous forme d'aérosol ou de poudre.	Travailleurs dans les soins de santé ou de laboratoire de recherche.
Anhydrides	Fabricants de plastique
Composés époxy retrouvés dans la peinture aérosol	Travailleurs automobiles
Animaux, plantes, insectes et allergènes fongiques.	Fermiers et jardiniers.
Enzymes et agents nettoyants.	Nettoyeurs et travailleurs en laboratoire.
Allergènes provenant de la nourriture ou de protéines animales (e.g. protéines d'œufs, blé, amylase fongique).	Transformateurs d'aliments et travailleurs avec des animaux.
Poussière de farine	Boulangers, chefs, cuisiniers et pâtisseries.
Persulfates	Coiffeurs
Flux de brassage de pins	Travailleurs dans l'électronique
Poussières de métaux et fumées (ex. : cobalt, chrome, nickel, sels de platines).	Soudeurs et autres travailleurs des métaux ou du raffinage du platine.

Tableau traduit de l'article de Mapp *et al.* 2005 (86).

Ainsi, le profil génétique des travailleurs a été plusieurs fois étudié. Les principaux gènes étudiés sont les molécules Human Leucocyte Antigen (HLA), les gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif (Glutathione S-transférase (GST)) et les molécules impliquées dans réponse Th2. Des polymorphismes situés au niveau de différents gènes qui ont été associés au développement de l'asthme lors de différentes expositions sont répertoriés dans le tableau 6.

Tableau 6. Gènes associés à l'asthme professionnel

Gène	Étude	Polymorphisme	Résultats	Exposition
<i>CD14</i> <i>IL4RA</i> <i>IL13</i>	Bernstein <i>et al.</i> 2006 (91)	<i>IL4RA/Ile50Val</i> <i>IL13/Gln110Arg</i> <i>CD14/Cys159Thr</i>	Associé au phénotype d'asthme induit par le diisocyanate.	Diisocyanate
<i>CTNNA3</i>	Kim <i>et al.</i> 2008 (92)	rs10762058 (intron <i>CTNNA3</i>) et rs7088181 (intron <i>CTNNA3</i>)	Associé au phénotype d'asthme induit par le diisocyanate.	Diisocyanate
<i>GSTP1</i>	Mapp <i>et al.</i> 2002 (93)	<i>GSTP1/Val105</i>	Protecteur pour le développement de l'asthme relié à l'exposition aux diisocyanates.	Diisocyanate
<i>HLA-DQA1</i> <i>HLA-DQB1</i>	Bignon <i>et al.</i> 1994 (94)	DQB1*0503 DQB1*0201/0301 DQB1*0501 DQA1*0101	Associé au phénotype d'asthme induit par l'isocyanate (DQB1*0503 DQB1*0201/0301). Les variants génétiques DQB1*0501 DQA1*0101 sont protecteurs.	Isocyanate
<i>TLR4</i>	Cho <i>et al.</i> 2011 (95)	<i>TLR4/-2027G</i> <i>TLR4/-1608C</i>	Associé à une ↓ du risque de développer des symptômes respiratoires reliés au milieu de travail.	Poussière de farine

IL= interleukine, CTNNA= catenin, GSTP1= glutathione S-transferase, HLA= major histocompatibility complex, TLR= toll-like receptor.

1.3. SÉLECTION DES GÈNES DANS LA LITTÉRATURE

Pour cette étude, les gènes ont été sélectionnés lorsqu'ils avaient été précédemment associés à l'asthme et l'environnement dans au moins une étude, plus précisément selon leur interaction avec un polluant de l'air. Les articles devaient mentionner une interaction avec un polymorphisme précis. Plus précisément, le gène devrait être soit protecteur ou soit un facteur de risque pour l'asthme, et ce, en présence d'un environnement particulier.

Dans les prochains paragraphes, chaque gène sélectionné, classé en différentes catégories correspondant à la fonction biologique, sera décrit en lien avec l'interaction avec l'environnement rapportée dans la littérature scientifique.

Tout d'abord, dans la catégorie des molécules de signalisation, les gènes *Transforming Growth Factor Beta 1 (TFGB1)* et *Tumor Necrosis Factor (TNF)* ont été sélectionnés. Le premier est situé sur le chromosome 19q13.2 et 19q13.1 et code pour une cytokine qui régule la prolifération, la différenciation, l'adhésion, la migration et quelques autres fonctions dans plusieurs types cellulaires. Une étude a démontré que les enfants porteurs du génotype *TGF-β1/-509TT* (polymorphisme situé au niveau du promoteur) seraient trois fois plus à risque de développer de l'asthme lorsqu'ils sont exposés aux émissions de gaz provenant du trafic, c'est-à-dire lorsqu'ils résident près des autoroutes (43). Le deuxième gène, *TNF*, est situé sur le chromosome 6p21.3 et code pour une cytokine sécrétée par les macrophages et les monocytes, impliquée dans différents processus biologiques: prolifération, différenciation, apoptose, métabolisme des lipides et coagulation. Deux études ont démontré que le génotype *TNF/-308 GG* a un effet protecteur sur l'asthme dépendamment de l'exposition à certains niveaux d'ozone. En effet, les enfants vivant dans un environnement où le niveau d'ozone est élevé ne bénéficient pas de l'effet protecteur de ce génotype contrairement à ceux vivant dans un environnement où le niveau d'ozone est plus faible (63, 69). De plus, les mutations des gènes *GSTM1* et *GSTP1*, respectivement *GSTM1null* et *GSTP1 Val105Val* peuvent diminuer l'effet protecteur de *TNF/-308 GG* (63). Dans le même ordre d'idées, Melén *et al.*, ont démontré que l'association entre le polymorphisme (SNP) *Ile105Val/Val105Val* du gène *GSTP1* et l'augmentation du risque de la sensibilisation aux allergènes lorsque exposé à des niveaux élevés de NO_x était amplifiée par la présence du polymorphisme *TNF/-308 GA/AA* (96). D'autres études ont démontré l'association entre ce même polymorphisme situé au niveau du gène *TNF* et la diminution de la fonction pulmonaire lors d'une provocation à l'ozone (70).

Ensuite, un seul gène codant pour une molécule impliquée dans la réponse immunitaire a été sélectionné soit la *Myeloperoxydase (MPO)*. Ce gène est situé sur le chromosome 17q23.1 et code pour une enzyme qui est impliquée dans la défense de l'hôte et qui produit des composés responsables de l'activité microbicide des leucocytes (97). Une étude a démontré que la combinaison des SNP *CAT/-330 GG* (rs1001179) et *MPO/-463 GA/AA* (rs2333227) serait associée à un risque plus élevé d'absentéisme scolaire relié à

des problèmes respiratoires chez des enfants de 4^{ième} année exposés à un haut niveau de pollution de l'air (les 2 SNP agiraient de façon épistatique) (59).

Plusieurs gènes sélectionnés codent pour une molécule ayant un impact sur le métabolisme des radicaux libres : *Catalase (CAT)*, *Époxyde hydrolase 1, microsomal (EPHX1)*, *Glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1)* et *NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO1)*. Le gène *CAT* est situé sur le chromosome 11p13 et code pour une enzyme antioxydante qui est impliquée dans la défense contre le stress oxydatif. Celle-ci converti le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (98). Comme mentionné dans la section précédente, des polymorphismes *CAT*/-330 GG (rs1001179) et *MPO*/-463 GA/AA (rs2333227) agiraient de façon épistatique et seraient associés à un risque plus élevé d'absences à l'école reliées à des problèmes respiratoires chez les enfants exposés à un haut niveau de pollution de l'air (59). Une autre étude a évalué l'interaction entre des polymorphismes situés au niveau du promoteur du gène de la catalase et l'asthme dans des environnements ayant différents niveaux d'ozone, mais aucune association significative n'a été observée (99). Le gène *EPHX1*, quant à lui, est situé sur le chromosome 1q42.1 et code pour une enzyme de biotransformation essentielle à l'activation et à la détoxification des époxydes (56). Une étude a démontré que les enfants ayant un niveau élevé d'expression d'*EPHX1* (dû au polymorphisme *His139Arg*) et vivant à 75 mètres d'une «route majeure», auraient 3 fois plus de risques de développer de l'asthme que ceux ayant une expression plus faible d'*EPHX1* (dû au polymorphisme *Tyr113His*) ou vivant loin d'une «route majeure» (plus de 75 mètres). De plus, les enfants ayant les facteurs de risque précédents (*His139Arg* et vivant à proximité d'une route majeure) en plus de présenter le génotype *GSTP1 Val105Val* seraient neuf fois plus à risque de développer de l'asthme (56). Ce gène *GSTP1* est situé sur le chromosome 11q13 et la molécule pour lequel il code fait partie de la famille des Glutathione S-transférases, des enzymes responsables du métabolisme de plusieurs molécules et qui jouent un rôle dans la protection contre le stress oxydatif (40). Plusieurs études ont étudié l'impact du polymorphisme situé au niveau du codon 105 du gène *GSTP1* et le développement de l'asthme, lorsqu'exposé à différents environnements. Cependant, ces études sont controversées. Des études ont démontré que le génotype *GTSP1 Ile105Val/Val105Val* serait associé à un plus grand risque de développer différents symptômes reliés à l'asthme allergique, lorsqu'exposé à des niveaux élevés de NO_x (96),

particules de diésel (64) et ozone (65). D'autres études ont démontré que les enfants ayant le génotype *GSTP1 Ile105Ile* et vivant dans un environnement où les niveaux de polluant de l'air sont élevés seraient plus à risque de développer de l'asthme (66, 67). De plus, la présence des allèles *GSTP1 Val105Val* chez ces sujets aurait un effet protecteur sur l'asthme, en lien avec la participation à un grand nombre de sports d'équipe (66). Plusieurs interactions entre le polymorphisme *GSTP1 Val105Val* et des polymorphismes situés au niveau des gènes *EPHX1 His139Arg* (56), *GSTM1null* (61), et *TNF/-308 GA/AA* (96) seraient associées à une plus grande susceptibilité de développer des symptômes respiratoires reliés à une exposition à différents polluants de l'air (route majeure, ozone et NO_x respectivement). Finalement, le gène *NQO1* situé sur le chromosome 16q22.1 code pour une protéine dont l'activité enzymatique empêche la réduction des quinones qui produiraient des radicaux libres (100). Une étude de Castro-Giner *et al.* a démontré le lien entre des polymorphismes situés au niveau du gène *NQO1* et le développement de l'asthme chez des sujets étant exposés à la pollution de l'air dû au trafic, mesuré grâce au niveau de dioxyde d'azote (NO₂) (68). Une autre étude a démontré que la combinaison des variants génétiques *Pro187Ser* du gène *NQO1* (au moins un allèle) combinée à *GSTM1null* aurait un effet protecteur sur l'asthme chez les enfants exposés à un niveau élevé d'ozone (62). D'autres études ont démontré une association entre des polymorphismes situés au niveau de ce gène, l'exposition à des polluants de l'air et une diminution de la fonction respiratoire. Les sujets ayant le génotype *NQO1* sauvage combiné à *GSTM1null* avaient un risque significatif de diminution de leur fonction pulmonaire, lorsqu'exposé à des niveaux élevés d'ozone (65, 101). Une de ces deux études démontre une différence selon le sexe des individus (65), contrairement à l'autre qui n'en démontre pas (101).

Finalement, le dernier gène sélectionné est l'*Arginase (ARG1)* qui est situé sur le chromosome 6q23 et qui code pour une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'arginine dans le cycle de l'urée et qui est exprimée de façon prédominante dans le foie (102). L'haplotype *ARG1h4* (rs2608981A-rs3895535G-rs2608937G-rs2749935T-rs2781659A-rs2246012T) serait associé à un risque diminué de développer l'asthme chez les enfants vivant dans un environnement élevé en ozone. Aucun effet protecteur de cet haplotype n'a été observé chez les enfants vivant dans un environnement où les niveaux d'ozone sont faibles (58).

1.4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

L'environnement de la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean est caractérisé par la présence de différentes industries (aluminium et pâtes et papiers entre autres). Cet environnement particulier pourrait avoir un effet sur le développement de l'asthme. L'hypothèse de cette étude est basée sur le principe que des gènes précédemment associés à l'asthme et la pollution de l'air pourraient être associés dans la collection familiale d'asthme provenant du SLSJ influencé par cet environnement caractéristique. L'objectif de l'étude est donc de faire une analyse d'association entre les huit gènes précédemment associés à l'asthme et à la pollution de l'air dans la collection asthmatique provenant du SLSJ. Une stratification selon la proximité des industries de l'aluminium et des pâtes et papiers du lieu de résidence des sujets a été effectuée pour déterminer l'impact de ces différents environnements sur le développement de l'asthme.

CHAPITRE 2

ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE L'ASTHME ET LES GÈNES ASSOCIÉS À CE PHÉNOTYPE ET À LA POLLUTION DE L'AIR, DANS UN ÉCHANTILLON D'ASTHME PROVENANT D'UN ENVIRONNEMENT RURAL CARACTÉRISÉ PAR DIFFÉRENTES INDUSTRIES

2.1. RÉSUMÉ

Introduction: Les gènes candidats sélectionnés dans cette étude ont été précédemment associés aux interactions gènes-environnement dans l’asthme dans un milieu urbain. Ces gènes ont été analysés dans la collection familiale asthmatique provenant du Saguenay–Lac-Saint-Jean (étude SLSJ) situé dans un milieu ayant de faibles niveaux d’ozone, mais ayant des niveaux plus élevés de dioxyde de soufre et autres polluants comparativement à plusieurs milieux urbains. Cela est dû à un nombre important de certaines industries localisées dans ce milieu dont des alumineries et plusieurs usines de pâtes et papiers.

Méthode: Huit gènes candidats ont été sélectionnés dans la littérature scientifique. Les polymorphismes (SNP) situés dans ces gènes ont été extraits de l’étude pangénomique effectuée sur la collection familiale provenant du SLSJ à l’aide de la puce 610K d’Illumina®. Un test de déséquilibre de transmission (TDT) a été effectué sur l’échantillon complet comprenant 1428 individus de 254 familles nucléaires différentes représentant 693 trios. Une stratification selon la proximité des industries de l’aluminium et des pâtes et papier (sujets vivants à dans un rayon de 10 km ou moins des industries) a été réalisée.

Résultats: Le gène *CAT* est associé à l’asthme après correction pour analyse multiple. Avant correction, deux gènes ont été associés aux phénotypes reliés à l’asthme à la suite d’une stratification en fonction de la proximité des industries de l’aluminium (*CAT* et *NQO1*) ainsi que le gène *GSTP1* lorsque les sujets ont été stratifiés selon la proximité des industries de pâtes et papier. Par contre, aucune de ces associations n’a résisté à la correction pour comparaisons multiples. *CAT*, *GSTP1* et *NQO1* sont connus comme jouant un rôle dans la protection contre le stress oxydatif.

Conclusion: Le gène *CAT* a été associé après correction avec l’asthme dans l’étude SLSJ et ce, indépendamment de la distance entre la résidence et l’industrie. Cependant, étant donné que la mesure utilisée pour évaluer l’exposition dans cette étude représente plusieurs limites, il est difficile d’affirmer que l’exposition n’est pas un facteur important. En effet, la répartition spatiale des expositions peut être complexe et inadéquatement représentée par quelques dispositifs. À titre d’exemple, les outils de mesure ne tiennent pas compte des vents dominants, de l’impact des précipitations et du mouvement des personnes dans une

journée qui influencent considérablement l'exposition de personnes vivant dans la même résidence. De plus, les expositions peuvent également provenir de sources autres que les polluants extérieurs (l'air intérieur, le milieu de travail, la fumée de bois résidentielle, etc.). À l'ère post-génomique où les efforts doivent être placés dans l'intégration des données issues de la génétique et de l'environnement, de nouvelles approches (méthodologiques et statistiques) et de nouveaux outils sont nécessaires.

Association study of genes associated to asthma in a specific environment, in an asthma familial collection located in a rural area influenced by different industries

Andréanne Morin¹, Jeffrey R. Brook², Caroline Duchaine³, Catherine Laprise^{1,4*}

¹Université du Québec à Chicoutimi, 555, boulevard de l'Université Saguenay, Québec, Canada, G7H 2B1 E-mails: andreanne1_morin@uqac.ca, (A.M.) Catherine.Laprise@uqac.ca (C.L)

²Environment Canada, Toronto, Ontario, Canada; E-mail: Jeff.Brook@ec.gc.ca (J.R.B.)

³Institut universitaire de cardiologie et pneumologie de Québec, Hôpital Laval, Québec, Canada; E-mail: Caroline.Duchaine@bcm.ulaval.ca (C.D)

⁴Community Genomic Medicine Centre, University of Montréal, Chicoutimi University Hospital, Chicoutimi, Québec, Canada

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Catherine.Laprise@uqac.ca (F.L.); Tel.: +1-418-545-5011, 5659; Fax: + 1-418-615-1203

Received: 30 April 2012; in revised form: 22 June 2012 / Accepted: 10 July 2012 /

Published: 27 July 2012

2.2. ABSTRACT

Eight candidate genes selected in this study were previously associated with gene-environment interactions in asthma in an urban area. These genes were analyzed in a familial collection from a founder and remote population (Saguenay–Lac-Saint-Jean; SLSJ) located in an area with low air levels of ozone but with localized areas of relatively high air pollutant levels, such as sulphur dioxide, when compared to many urban areas. Polymorphisms (SNPs) were extracted from the genome-wide association study (GWAS) performed on the SLSJ familial collection. A transmission disequilibrium test (TDT) was performed using the entire family sample (1428 individuals in 254 nuclear families). Stratification according to the proximity of aluminium, pulp and paper industries was also analyzed. Two genes were associated with asthma in the entire sample before correction (*CAT* and *NQOI*) and one was associated after correction for multiple analyses (*CAT*). Two genes were associated when subjects were stratified according to the proximity of aluminium industries (*CAT* and *NQOI*) and one according to the proximity of pulp and paper industries (*GSTPI*). However, none of them resisted correction for multiple analyses. Given that the spatial pattern of environmental exposures can be complex and inadequately represented by a few stationary monitors and that exposures can also come from sources other than the standard outdoor air pollution (e.g., indoor air, occupation, residential wood smoke), a new approach and new tools are required to measure specific and individual pollutant exposures in order to estimate the real impact of gene-environment interactions on respiratory health.

Keywords: Asthma, gene-environment interactions, aluminum industries, pulp and paper industries, air pollution

2.3. INTRODUCTION

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways characterized by airway hyperresponsiveness, inflammation and remodelling. Asthma is a complex trait and many risk factors have been identified. These risk factors can be divided into two main categories: genetics and environmental factors (1). The mechanisms underlying the implication of these two categories in the development and the expression of asthma have not been completely clarified. However, it has been found that the interactions between genetic and environmental factors can induce the expression of the disease phenotype (2). Studies evaluating the impact of ambient air pollution in the development of the disease have shown growing evidence that exposure to ambient air pollution can lead to the development of the asthma phenotype (2).

As reviewed by London and Romieu in 2009 (2), different genes associated with the disease phenotype in interaction with air pollution have been identified in the past few years. These studies have contributed to the understanding of the pathophysiology of asthma and to the comprehension of how different environments can have a protective or deleterious effect on the disease. In the literature, different categories of genes were associated with asthma in populations exposed to a polluted urban environment. The principal categories reported are immune signalling (mediators) molecules such as: tumor necrosis factor (*TNF*) and transforming growth factor, beta 1 (*TGFB1*) (3–6); immune response molecule: myeloperoxidase (*MPO*); free radical metabolism molecules: catalase (*CAT*), epoxide hydrolase 1, microsomal (*EPHX1*), glutathione S-transferase pi 1 (*GSTP1*) and NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (*NQO1*) (7–15) that protect against reactive oxygen species (ROS) produced by air pollutants (16); and metabolic enzyme like arginase (*ARG1*). The objective of this study was to evaluate the association between asthma-related phenotypes and eight genes selected from the literature based on their interaction with asthma in an environment characterized by a higher level of air pollution. The analyses were performed on a familial asthma collection located in the Saguenay–Lac-Saint-Jean region (SLSJ) – a region located in the northeastern Quebec province of Canada. This sample is a distinct, remote population, which is exposed to different levels of air pollutants compared to urban populations. Many industries influence the levels of air pollutants of this

region: industries associated with aluminium, pulp and paper. Wood products industries are also present.

2.4. METHODS

2.4.1. Subjects

A well-characterized family sample of asthmatic patients from the founder population of SLSJ was used to investigate the association between genes selected based on interaction reported with specific environmental exposure and asthma. Asthma phenotype was described following the American Thoracic Society standards (17): all participants had a respiratory health questionnaire and function tests. Participants were defined as having asthma if (1) they had a reported history of asthma (validated by a physician); or (2) they showed asthma-related symptoms and a positive PC₂₀ at the time of recruitment. Subjects with a PC₂₀ greater than 8 mg/mL; without history of physician-diagnosed asthma, and without symptoms of asthma; and with no positive response on skin prick test were considered unaffected for asthma. Detailed recruitment method is described in the paper by Bégin *et al.* 2007 (18). Probands were included in the study if they met two of the three following criteria: (1) a minimum of three clinic visits for acute asthma within one year; (2) two or more asthma related hospital admissions within one year; (3) steroid dependency, defined by either a use of oral corticosteroids for six months, or a year for inhaled corticosteroids. Families were included in the study if phenotypic assessment was available for at least one parent, at least one parent was unaffected, and if all grandparents were French-Canadian descendants. Family members were considered asthmatics if both a self-reported history of asthma and a history of physician diagnosed asthma were recorded, or by clinical evaluation following a methacholine provocation test. Spirometry, methacholine challenge and IgE measurements are detailed in Bégin *et al.* 2007 (18). Spirometry was performed to measure the expiratory flow (FEV₁) using a Morgan spirometer (Morgan Spiro 232, P.K. Morgan Ltd) following the American Thoracic Society's recommendations (19). Methacholine challenges (bronchoprovocation) were performed for participants of 12 years and older according to the method described by Juniper *et al.* (20). The PC₂₀ is described as the dose of methacholine that resulted in a 20% fall in FEV₁. Serum IgE was measured with enzyme immunofluorometry. The investigators performed all of the measures for each

participant (except for bronchoprovocation) at the University of Montreal Community Genomic Medicine Centre in Saguenay, Québec, Canada. All subjects signed the informed consent approved by the local hospital (Centre de santé et de service sociaux de Chicoutimi) ethics committee. A total of 1428 individuals from 254 nuclear families were included the study (Table 7).

2.4.2. Gene Selection and Genotypes

Eight genes were selected from the literature: immune signalling molecules (*TGFB1* and *TNF*), immune response molecule (*MPO*), genes implicated in free radical metabolism (*CAT*, *EPHX1*, *GSTP1* and *NQO1*) and metabolic enzyme (*ARG1*). The specific genes were selected in the literature using PubMed. Genes had to have one or more polymorphisms (SNPs) associated to asthma in an environment related to air pollution (pollutant related to industries or other pollutant found in the SLSJ region). Key words used were: air pollution, carbon monoxide, ozone, nitrogen oxide, particulate matter, sulfur dioxide and industries.

SNPs were extracted using the PLINK software from the genome-wide association study (GWAS) performed on the SLSJ familial collection in the context of the large-scale, consortium-based genome wide association study of asthma GABRIEL (21). SNPs extracted were located in the selected genes and their 5' and 3' untranslated regions (UTR) (which may contain gene expression regulation sites and promoter regions). A total of 90 SNPs were extracted and a total of 72 were kept for analysis (criteria are mentioned in the statistical analysis section): 64 in the total sample, 69 when stratified according to proximity of aluminium industries and 69 when stratified according to pulp and paper industries. All SNPs are described in Table 11 in the supplementary material.

2.4.3. Environment Characteristics and Air Pollution Data

Subjects of the SLSJ sample were recruited from 1998 to 2001. During these years, only outdoor ozone and sulphur dioxide concentrations were measured routinely in four different places in the SLSJ area. Table 8 is a brief summary of the measures for ozone and sulphur dioxide among these four sites between 1997 and 2000. Both of these pollutants are known to pose a risk to human health and thus ambient air quality standards are in place provincially, federally and also in other countries (22, 23). Air pollutant measures are in

part per billion (ppb) and are assessed during a defined period of time (8 hours or 24 hours for longer periods and 1 h for peaks). For example, standards set by the *Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs*, indicate that the acceptable limits are a maximum value of ozone of 65 ppb for 8 hours and/or 80 ppb for 1 h. The maximum acceptable limits for sulphur dioxide (SO₂) are set at 20 ppb for an annual average, 110 ppb for a 24 h average and 500 ppb for 1 h. The levels observed in U.S. cities exceed the standards: the average range of ozone is 0 to 125 ppb for 8 h and the average for SO₂ is 0.5 to 50 ppb for 24 h. Also peaks of 200 ppb for 1 h of ozone and 150 ppb for 1 h of SO₂ are typically observed in U.S. cities that are not located in areas where there are direct emission sources (24).

As shown in Table 8, ozone and SO₂ levels cannot be considered low in SLSJ region because the concentrations are close to the limit value set by the Canadian government and to levels measured in more populated areas of Canada, as well as in the United States [24]. In particular, the magnitude of the SO₂ peaks occurring indicates that the industries known to operate in the area have a significant impact on air quality. Additionally, they are potentially leading to at least some exposure for the study population depending upon the prevailing winds.

The majority of the subjects live within a 10 km radius of aluminium industries (73.93%), which are known to emit significant amounts of fluoride, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), SO₂, carbon monoxide (CO) and particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀) (NPRI Google Earth tool) (Table 12, supplementary material). There is also a good proportion of the individuals living near pulp and paper industries (44.59%) and wood product industries (11.80%). Such facilities are known to emit a range of air pollutants, such as volatile organic compound (VOC), PM_{2.5} and PM₁₀, sulphur oxides (SO_x), and nitrogen oxides (NO_x) *etc.* (26, 27). There was also a small proportion of the individuals living within a 10 km radius of a niobium mine and other industries, including milk transformation, iron and steel, petroleum refining, chemicals, plastic and rubber *etc.* Air pollution emissions in tonnes during the year 2002 are indicated in Table 9 in the supplementary material for each industry located in the SLSJ area.

2.4.4. Statistical Analysis

SNPs were tested for association with asthma using the transmission disequilibrium test (TDT) performed with PLINK analysis software (28, 29). The association study was performed on a familial collection. Thus, to test if SNPs are associated to the trait, transmission disequilibrium is observed between generations. Differential allele transmission to affected offspring from heterozygous parents was calculated to determine the association. SNPs included in the study must fulfill these quality criteria: a cut off for minor allele frequency of 5%, a genotyping rate of 5%, a p value > 0.05 for the Hardy-Weinberg equilibrium and $< 1\%$ of Mendelian errors. TDT analyses were performed for SNPs and haplotypes employing a chi-square distribution followed by permutations to determine the significance. Permutations were used to test the accuracy of the estimated p value and to palliate lack of power and false positive results. The number of permutations was chosen according to the significance level of the p values of the TDT analyses (for example: 10,000 permutations for $p < 0.05$ and 20,000 permutations for $p < 0.01$). Haplotypes (combination of alleles transmitted together) and strength of linkage disequilibrium between SNPs (the more these alleles are transmitted together, the more they are dependent and thus in linkage disequilibrium, values shown as D') were obtained using the Haploview software (version 3.31; Broad Institute of MIT and Harvard University, Boston, MA, USA). Association between different haplotype blocks of SNPs and asthma was also done using the TDT analysis in the PLINK software. According to the number of SNPs considered in the TDT analyses, multiple analyses correction was performed to avoid false positive results. This correction was done considering the number of independent tagSNPs (SNPs that represent a region with high linkage disequilibrium) for each gene separately using the Nyholt method (30). For example, for *CAT*, there were 11 independent tagSNPs and the corrected threshold was 0.0047 (0.05/11 tagSNPs).

TDT for SNPs and haplotype blocks were repeated after stratification for the proximity of aluminium or pulp and paper industries (10 km radius around the subject's house location). For these analyses, only the nuclear trios, for which the children were exposed to one industry or the other, were kept for analyses.

2.5. RESULTS

Association results for SNPs that had a significant p-value before correction ($p < 0.05$) for the whole sample and for the sample stratified according to the proximity of aluminium or pulp and paper industries are shown in Table 9. Five SNPs from two genes (*CAT* (rs11032703, rs2300181, rs511895) and *NQO1* (rs1800566, rs1437135)) were associated before correction and one SNP located in *CAT* gene was still associated after correction (indicated in bold in Table 9). The minor allele of the *CAT* rs11032703T SNP was transmitted more often to asthmatic subjects and could be a risk factor of asthma. Results for the TDT with the stratified sample that had a p-value less than the 0.05 thresholds are indicated in Table 9. Three SNPs located in two genes were associated when stratified according to proximity to aluminium industries (*CAT* (rs11032703) and *NQO1* (rs1800566 and rs1437135)) and only one SNP in the *GSTP1* gene (rs1695) was associated in the pulp and paper sample. None of the SNPs resisted the correction for multiple analyses.

Haplotypes of the selected genes were also analyzed to look for association with asthma in the whole sample and the stratified ones. A TDT was then performed on linkage disequilibrium plot located in the eight genes selected for this study and obtained with the Haploview software. Five haplotypes located in three different genes (*CAT*, *EPHX1* and *NQO1*) were associated to asthma before correction ($p < 0.05$) and are shown in Table 10. One haplotype located in the *CAT* gene was still associated after correction. The haplotype was transmitted more often to asthmatic patients, which indicates a potential deleterious effect on the phenotype. This haplotype also contains the SNP rs11032703 that has been associated alone with asthma, but also other SNPs that had a p value under 0.05, but did not remain significant after correction (rs2300181 (intron 6) and rs511895 (intron 10)). Linkage disequilibrium plot for the *CAT* gene is shown in Figure 2 in the supplementary materials. Two haplotypes located in two genes (*CAT* and *NQO1*) were associated to asthma before correction when the sample was stratified according to proximity to aluminium industries. When stratified according to proximity to pulp and paper industries there were also two haplotype blocks located in two genes (*EPHX1* and *GSTP1*) that were associated to asthma before correction. None of these haplotypes resisted correction for multiple analyses.

2.6. DISCUSSION

We performed a genetic family based association study between asthma and genes that were previously associated with air pollution in an urban environment. Our study focused on a population residing in a relatively unpopulated area but where the air quality is influenced by the presence of several industries. The principal strength of this study is the well-defined population. Every subject has gone through different analyses of their respiratory capacity and they were questioned on different aspects related to respiratory diseases like their smoking status. It is also a homogeneous population with similar lifestyles (same religion, language, activities, *etc.*) (31).

This study also has some limitations. First, the familial collection was not designed to study gene-environment interactions. The main purpose is to study the impact of genetic variants on asthma phenotypes.

Also, the presence of a significant number of smokers (11% of probands and 20% of family members) or ex-smokers (6% of probands and 29% of family members) might have influenced the results of the gene-environment interactions examined in this study. For example, the two associated genes (*CAT* and *NQO1*) have been associated with asthma and tobacco smoke exposures (32, 33). *NQO1* Pro187Ser mutation was associated in our study, but was also associated with asthma and exposure to tobacco smoke in a previous study. Unfortunately, excluding smokers in this study would have significantly affected its power.

Potential environmental exposures for this study were complex and difficult to describe given the lack of information on true spatial concentration patterns and subject activity. Thus, while it would have been interesting to consider exposure of each individual, such detail was beyond the scope of the present study. Compounding these challenges, the concentration of some key air pollutants, like PM₁₀, PM_{2.5}, PAH, CO and VOC, were not measured in the area during the recruitment years. However, as described above data on total release of different pollutants were available for the year 2002. Furthermore, even if data were not available during the recruitment years (1998 to 2001), the 2002 data are still relevant as an indication of the general air conditions in the area. This is because the air

pollutants emitted by the different industries generally do not show significant differences from one year to the next. Decreasing trends are only apparent over multiple years.

Even if the distances between the industries and the homes of the subjects were measured and the dispersion of the emitted pollutants were known so that more accurate air pollutant exposures could be assigned there are other potential exposures in this population. For example, occupational exposures or local activities can be significant, but with current information these cannot be quantified. There are also other types of oxidizing pollutants like indoor air exposures (e.g., environmental tobacco smoke) or wood smoke from residential burning that can influence individual exposures and these are also not known for our population. Many contaminant from wood smoke can have an impact on health like CO, PM_{2.5}, NO_x, PAH, *etc.* (34).

Another limitation with this familial collection is that some of the genes were not evaluated because few SNPs located in these genes were not analyzed in the ILLUMINA 610K arrays or these SNPs did not respond to criteria mentioned in the statistical analysis section. This was the case for the *MPO* gene (rs2333227) that was previously associated with asthma in gene-environment interactions studies (15).

Candidate gene studies have a low replication rate (35), that can be explained by the difference in recruitment (case-control studies compared to familial studies or birth cohorts, different age of onset in cohorts, *etc.*), by the presence of difference in linkage disequilibrium between populations (a founder population compared to a cosmopolitan population) and in the characterization of the subjects at the phenotypic and exposition to environment levels. In this study, we tried to reduce the impact of the difference in the characterization of exposure to the environment by selecting genes that were previously associated to asthma in similar environment (urban area with pollutant related to industries or other pollutant found in the SLSJ region). Gene selection was well defined and based on their previous association with asthma and air pollution in the literature and criteria are mentioned in the Gene Selection and Genotypes section. This strict selection allowed replicating selected genes in a precise environment to address the impact of their interaction with this environment in the context of asthma pathogenesis.

This study showed an association for the *CAT* gene and asthma in the whole sample of the SLSJ study. The *CAT* gene is located on the chromosome 11p13 and expresses the catalase protein implicated in defense against oxidative stress (36). It is an antioxidant enzyme that protects the cell from oxidative stress by decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen (36). Reactive oxygen species and hydrogen peroxide are known to have an impact on many characteristic elements of the asthma phenotype such as contracting airway smooth muscle, increasing airway reactivity and the synthesis and release of chemoattractants (36–39). There are different external and cellular sources of hydrogen peroxide like ozone or inflammatory cells and the respiratory chain located in the mitochondria (36). Catalase may play a role on the oxidant-antioxidant imbalance in asthma because studies have shown a higher activity of the enzyme in affected people (40).

Our results show an association between *CAT* rs11032703 and asthma in the SLSJ sample and show that the minor allele might be a risk factor for the disease phenotype. Two studies have previously associated this gene with exposure to air pollutants (15, 41). Wenten *et al.* found an epistatic effect between SNPs in *CAT* (rs1001179) and *MPO* (rs2333227) genes when subjects were exposed to air pollutants (NO₂ and ozone) (15) but neither of the two SNPs alone was associated with the phenotype combined with the environment. Strict replication (same gene and same SNP) was not possible in our sample since rs2333227 was not present in the GWAS database, thus not evaluated in this study and, as found by Wenten *et al.*, rs1001179 alone was not associated with asthma in our study ($p = 0.942$). Gene-gene interactions were evaluated between these two genes (*CAT* and *MPO*) to look at possible epistatic effects between other SNPs of these genes and asthma in a context of air pollution, but no association was found (results not shown). The haplotype block 2 of the *CAT* gene is also associated with asthma in this sample. This haplotype block is more transmitted to asthmatic subjects compared to controls and appears to be a susceptibility factor for asthma. Interestingly, this haplotype block includes the only SNP associated after correction (rs11032703), for which the minor allele is also transmitted more often to the asthmatic subjects. However, it is important to note that the associated SNPs may not be the causal one and other SNPs in linkage disequilibrium with the associated one may explain the impact on the trait.

These results indicate the importance of this locus and of the *CAT* gene in asthma. The fact that SNPs located in the *CAT* gene were not associated after correction when the sample was stratified according to the proximity of aluminium industries and that no association was observed when the sample was stratified according to the proximity of pulp and paper industries may indicate that the association of this gene is not restricted to a specific environment. As previously mentioned, the origin of the causal SNP may not be the one associated in this study and its impact on asthma needs to be assessed. However, since the exposition measure is not perfect, this clearly points out the importance of measuring and modeling individual-level exposures to air pollutants in order to properly study gene-environment interactions so that firm conclusions can be drawn.

2.7. CONCLUSIONS

In conclusion, in this study we evaluated the association of genes that were previously associated with asthma in the literature within a gene-environment interaction with air pollution context. *CAT* gene previously associated with urban environments and air pollution was associated with asthma after correction in our sample. Interestingly, the familial collection used in this study is characterized by being composed of a remote/rural population. However, subjects tend to live in an area with variable, but potentially significant air pollutant exposures because there are aluminium, pulp and paper, and wood product industries in the region which emit a range of pollutants like SO₂ and particulate matter. However, while these are important pollution sources, the surrounding background pollutant levels are generally low. This differs from the environment in urban areas where there are many sources (e.g., traffic) leading to higher overall levels of air pollutants, but which are less variable and potentially with less intense peaks typically associated with industrial plumes. In order to determine if the genes found to be important in this study were indeed implicated because of environmental (air pollutant) exposures and not because of other unknown factors, future efforts need to focus on accurate characterization of individual exposures from all potential sources. This added information would allow for a more complete assessment of the impact of gene-environment interactions in asthma and could lead to better insight regarding what types and quantities of exposures are harmful with respect to different asthma phenotypes. Finally, this study gives first exploratory

results of gene-environment interactions in this area and shows that this kind of study is important to better understand asthma pathogenesis. However, better characterization tools will be needed to correctly answer those questions. This study also emphasizes the challenge that these types of studies represent and raises some questions regarding a few points that need to be taken into consideration for future approaches: (1) How to measure the environment; (2) when to measure it (what period of life); (3) how long do we measure it; and (4) what environment (in this case what air pollutant) to consider.

2.8. ACKNOWLEDGMENTS

This study was possible with the support of: GABRIEL, Canadian Centre for Health and Safety in Agriculture, Canadian Institutes of Health Research. We express gratitude to all subjects who accepted to participate in the study. A.M. is supported by the Réseau en Médecine Génétique Appliquée (RMGA) of the Fonds de recherche du Québec en santé (FRQS). C.L. is the chair holder of the Canada Research Chair for genetic determinants in asthma (www.chairs.gc.ca) and the director of the Inflammation and Remodeling Strategic Group of the Respiratory Health Network (RHN). C.L. and J.R.B are members of the AllerGen NCE Inc. (the Allergy, Genes and Environment Network) a national multidisciplinary research network supporting research, networking, commercialization, knowledge mobilization and capacity building activities that contribute to reducing the morbidity, mortality and socio-economic impact of allergic diseases. AllerGen is a member of the Networks of Centres of Excellence (NCE), a Government of Canada program that funds partnerships between universities, industry, government and non-profit organizations to connect leading-edge research with industrial know-how and strategic investment. All the genotypes were available due to the GABRIEL project.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no competing interests.

2.9. REFERENCES

1. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*; GINA: Cape Town, South Africa, 2008.
2. London, S.J.; Romieu, I. Gene by environment interaction in asthma. *Annu. Rev. Public Health* **2009**, *30*, 55–80.
3. Lee, Y.L.; McConnell, R.; Berhane, K.; Gilliland, F.D. Ambient ozone modifies the effect of tumor necrosis factor g-308a on bronchitic symptoms among children with asthma. *Allergy* **2009**, *64*, 1342–1348.
4. Li, Y.F.; Gauderman, W.J.; Avol, E.; Dubeau, L.; Gilliland, F.D. Associations of tumor necrosis factor g-308a with childhood asthma and wheezing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *173*, 970–976.
5. Salam, M.T.; Gauderman, W.J.; McConnell, R.; Lin, P.C.; Gilliland, F.D. Transforming growth factor- 1 c-509t polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *176*, 1192–1199.
6. Yang, I.A.; Holz, O.; Jorres, R.A.; Magnussen, H.; Barton, S.J.; Rodriguez, S.; Cakebread, J.A.; Holloway, J.W.; Holgate, S.T. Association of tumor necrosis factor- α polymorphisms and ozone-induced change in lung function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, *171*, 171–176.
7. Castro-Giner, F.; Kunzli, N.; Jacquemin, B.; Forsberg, B.; de Cid, R.; Sunyer, J.; Jarvis, D.; Briggs, D.; Vienneau, D.; Norback, D.; *et al.* Traffic-related air pollution, oxidative stress genes, and asthma (echrs). *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 1919–1924.
8. David, G.L.; Romieu, I.; Sienra-Monge, J.J.; Collins, W.J.; Ramirez-Aguilar, M.; del Rio-Navarro, B.E.; Reyes-Ruiz, N.I.; Morris, R.W.; Marzec, J.M.; London, S.J. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) reduced:Quinone oxidoreductase and glutathione s-transferase m1 polymorphisms and childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *168*, 1199–1204.
9. Islam, T.; Berhane, K.; McConnell, R.; Gauderman, W.J.; Avol, E.; Peters, J.M.; Gilliland, F.D. Glutathione-s-transferase (gst) p1, gstm1, exercise, ozone and asthma incidence in school children. *Thorax* **2009**, *64*, 197–202.
10. Lee, Y.L.; Lin, Y.C.; Lee, Y.C.; Wang, J.Y.; Hsiue, T.R.; Guo, Y.L. Glutathione s-transferase p1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin. Exp. Allergy* **2004**, *34*, 1707–1713.
11. Melen, E.; Nyberg, F.; Lindgren, C.M.; Berglind, N.; Zucchelli, M.; Nordling, E.; Hallberg, J.; Svartengren, M.; Morgenstern, R.; Kere, J.; *et al.* Interactions between glutathione s-transferase p1, tumor necrosis factor, and traffic-related air pollution for development of childhood allergic disease. *Environ. Health Perspect.* **2008**, *116*, 1077–1084.
12. Romieu, I.; Ramirez-Aguilar, M.; Sienra-Monge, J.J.; Moreno-Macias, H.; del Rio-Navarro, B.E.; David, G.; Marzec, J.; Hernandez-Avila, M.; London, S. Gstm1 and gstp1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *Eur. Respir. J.* **2006**, *28*, 953–959.
13. Romieu, I.; Sienra-Monge, J.J.; Ramirez-Aguilar, M.; Moreno-Macias, H.; Reyes-Ruiz, N.I.; Estela del Rio-Navarro, B.; Hernandez-Avila, M.; London, S.J. Genetic polymorphism of gstm1 and antioxidant supplementation influence lung function in

- relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax* **2004**, *59*, 8–10.
14. Schroer, K.T.; Biagini Myers, J.M.; Ryan, P.H.; LeMasters, G.K.; Bernstein, D.I.; Villareal, M.; Lockey, J.E.; Reponen, T.; Grinshpun, S.; Khurana Hershey, G.K. Associations between multiple environmental exposures and glutathione S-transferase p1 on persistent wheezing in a birth cohort. *J. Pediatr.* **2009**, *154*, 401–408, 408.e1.
 15. Wenten, M.; Gauderman, W.J.; Berhane, K.; Lin, P.C.; Peters, J.; Gilliland, F.D. Functional variants in the catalase and myeloperoxidase genes, ambient air pollution, and respiratory-related school absences: An example of epistasis in gene-environment interactions. *Am. J. Epidemiol.* **2009**, *170*, 1494–1501.
 16. Bowler, R.P.; Crapo, J.D. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2002**, *110*, 349–356.
 17. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS board of directors, November 1986. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1987**, *136*, 225–244.
 18. Begin, P.; Tremblay, K.; Daley, D.; Lemire, M.; Claveau, S.; Salesse, C.; Kacel, S.; Montpetit, A.; Becker, A.; Chan-Yeung, M.; *et al.* Association of urokinase-type plasminogen activator with asthma and atopy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2007**, *175*, 1109–1116.
 19. ATS statement—Snowbird workshop on standardization of spirometry. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1979**, *119*, 831–838.
 20. Standardization of spirometry, 1994 update. American Thoracic Society. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1995**, *152*, 1107–1136.
 21. Moffatt, M.F.; Gut, I.G.; Demenais, F.; Strachan, D.P.; Bouzigon, E.; Heath, S.; von Mutius, E.; Farrall, M.; Lathrop, M.; Cookson, W.O. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1211–1221.
 22. Environment Canada. Air quality. 2011. Available online: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=04104DB7-1> (accessed on 08/08/2011).
 23. Environment Canada. Pollutants. 2011. Available online: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=BCC0B44A-1> (accessed on 08/08/2011).
 24. Brook, R.D.; Rajagopalan, S.; Pope, C.A., 3rd; Brook, J.R.; Bhatnagar, A.; Diez-Roux, A.V.; Holguin, F.; Hong, Y.; Luepker, R.V.; Mittleman, M.A.; *et al.* Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **2010**, *121*, 2331–2378.
 25. CESP, 2010. *Banque de données sur la connaissance et la surveillance de la pollution atmosphérique—données préliminaires*, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement.
 26. Environment Canada. Pulp and paper. 2011. Available online: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=CB1E071C-1> (accessed on 15/09/2011).
 27. Environment Canada. Lumber and allied wood products. 2011. Available online: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=542779CB-1> (accessed on 15/09/2011).
 28. Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.R.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; de Bakker, P.I.W.; Daly, M.J.; Sham, P.C. PLINK: a toolset for

- whole-genome association and population-based linkage analysis. *A. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 559–575.
29. PLINK (version 1.07, Shaun Purcell, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>),
 30. Nyholt, D.R. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am. J. Hum. Genet.* **2004**, *74*, 765–769.
 31. Roy-Gagnon, M.H.; Moreau, C.; Bherer, C.; St-Onge, P.; Sinnett, D.; Laprise, C.; Vezina, H.; Labuda, D. Genomic and genealogical investigation of the french canadian founder population structure. *Hum. Genet.* **2011**, *129*, 521–531.
 32. Li, Y.F.; Tseng, P.J.; Lin, C.C.; Hung, C.L.; Lin, S.C.; Su, W.C.; Huang, Y.L.; Sung, F.C.; Tai, C.K. Nad(p)h: Quinone oxidoreductase 1, glutathione s-transferase m1, environmental tobacco smoke exposure, and childhood asthma. *Mutat. Res.* **2009**, *678*, 53–58.
 33. Polonikov, A.V.; Ivanov, V.P.; Solodilova, M.A.; Kozhuhov, M.A.; Panfilov, V.I. Tobacco smoking, fruit and vegetable intake modify association between $-21a>t$ polymorphism of catalase gene and risk of bronchial asthma. *J. Asthma* **2009**, *46*, 217–224.
 34. Environment Canada. Residential wood heating. 2011. Available online: <http://www.ec.gc.ca/residentiel-residential/default.asp?lang=En&n=E9FE1750-1> (accessed on 02/10/2011).
 35. Ober, C.; Hoffjan, S. Asthma genetics 2006: The long and winding road to gene discovery. *Genes Immun.* **2006**, *7*, 95–100.
 36. Rahman, I.; Biswas, S.K.; Kode, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *533*, 222–239.
 37. Barnes, P.J. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, *150*, S42–S49.
 38. Barnes, P.J.; Chung, K.F.; Page, C.P. Inflammatory mediators of asthma: An update. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 515–596.
 39. Nadeem, A.; Masood, A.; Siddiqui, N. Oxidant–Antioxidant imbalance in asthma: Scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **2008**, *2*, 215–235.
 40. Mak, J.C.; Leung, H.C.; Ho, S.P.; Ko, F.W.; Cheung, A.H.; Ip, M.S.; Chan-Yeung, M.M. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: Functional study in hong kong chinese asthma patients. *Clin. Exp. Allergy* **2006**, *36*, 440–447.
 41. Islam, T.; McConnell, R.; Gauderman, W.J.; Avol, E.; Peters, J.M.; Gilliland, F.D. Ozone, oxidant defense genes, and risk of asthma during adolescence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *177*, 388–395.

Table 7. Clinical characteristics of the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma study

	All samples (n = 1428)	Probands ^a (n = 254)	Family members (n = 1174)	Exposed ^b	
				Children (n _a = 327) (n _p = 194)	Family members (n _a = 729) (n _p = 431)
General descriptive data					
M:F ratio	1:1.2	1:1.2	1:1.2	1:1.2 1:1.4	1:1.1 1:1.2
Age, mean (range) ^c	39 (2–93)	18 (3–62)	43 (2–93)	22 (2–71) 25 (2–75)	47 (3–93) 47 (3–88)
Age median	39	16	43	17 19	45 45
Smoking status, n (%) ^d					
non smoker	721 (51)	208 (84)	512 (44)	239 (74) 139 (74)	279 (39) 163 (39)
ex smoker	405 (29)	14 (6)	391 (34)	38(12) 22 (12)	277 (39) 157 (37)
smoker	283 (20)	27 (11)	256 (22)	47 (14) 27 (14)	162 (22) 103 (24)
Clinical descriptive data					
FEV ₁ , % pred. (SD) ^e	94 (42)	93 (34)	95 (43)	93 (18) 91(16)	96 (18) 95 (18)
PC ₂₀ , mg/mL (SD) ^f	7.76 (5.21)	2.50 (3.61)	10.06 (5.04)	6.40 (10.85) 7.60 (13.02)	27.83 (26.4) 29.30 (26.98)
IgE, µg/L (SD) ^g	135 (5)	236 (5)	118 (4)	693 (1738) 891 (3063.9)	260 (517.1) 394 (1975.6)
Asthma, n (%) ^h	693 (49)	253 (100)	440 (38)	327 (100) 194 (100)	192 (27) 116 (27)

^a Probands are first affected family member recruited in the familial collection and family members refers to other family members who joined the study; ^b Exposed refers to the stratification according to the proximity of aluminium (n_a (upper line)) and pulp and paper (n_p (lower line)) industries. A total of 382 individuals (168 children) are exposed to both aluminium and pulp and paper industries; ^c Mean and median age calculated for 1425 subjects (254 probands and 1172 family members); ^d Smoking status available for 1409 subjects (250 probands and 1159 family members) and passive smoking available for 1240 subjects (239 probands and 1001 family members). Ex smoker are defined as subjects who have stopped smoking 3 months or more; ^e FEV₁ = Mean and standard deviation (SD) calculated for the Forced expiratory volume in one second in % of predicted value for 1133 subjects (221 probands and 912 family members); ^f PC₂₀ = Provocative concentration of methacholine that induces a 20% fall in FEV₁. Geometric mean and SD calculated for 1045 subjects (196 probands and 849 family members); ^g IgE = Immunoglobulin E serum concentration. Geometric mean and SD; ^h Present asthma or past documented clinical history of asthma. The reported mean age of onset is 7 years old among probands and 22 years old among asthmatic family members. Asthma phenotype is available for 1166 of the 1174 family members.

Table 8. Levels of air pollutants measured in four places in the SLSJ area

Air pollutant	Years	Mean annual value (ppb)	Period (hour) ^a	Median (ppb)	Maximum (ppb)
Ozone	1997 to 2000	27.7	1	28	76.2
			8	27.8	72.2
Sulphur dioxide		9.41	1	1.6	150
			24	3.7	82.4

^a Periods are defined as: 1 h = mean value hourly, 8 h = mean value during 8 hours and 24 h = mean value during 24 hours. Areas where sulphur dioxide was measured were influenced by different industries (25).

Table 9. Transmission disequilibrium test (TDT) results with p value < 0.05 for genes selected in the literature and stratified according to proximity to aluminium or pulp and paper industries

Industry	Gene symbol/ position	SNP/position ^a	Allele ^b	T	U	OR	CHISQ	p value ^a	p value with permutations	p value threshold (Meff) ^c
All samples	<i>CAT</i> / 11p13	rs11032703/intron 1	T/C	90	52	1.7310	10.1700	0.0015	0.0029	0.0047
		rs2300181/intron 6	T/C	90	120	0.7500	4.2860	0.0384	0.0423	(10.5501)
		rs511895/intron 10	T/C	170	129	1.3180	5.6220	0.0177	0.0227	
	<i>NQO1</i> / 16q22.1	rs1800566/exon 5 (Pro187Ser)	A/G	86	118	0.7288	5.0200	0.0251	0.0314	0.0169 (2.9652)
		rs1437135/intron 5	G/A	86	118	0.7288	5.0200	0.0251	0.0314	
Aluminium	<i>CAT</i> / 11p13	rs11032703/intron 1	T/C	71	41	1.7320	8.0360	0.0046	0.0055	0.0044 (11.3167)
	<i>NQO1</i> / 16q22.1	rs1800566/exon 5 (Pro187Ser)	A/G	63	90	0.7000	4.7650	0.0291	0.0360	0.0183 (2.7369)
		rs1437135/intron 5	G/A	63	90	0.7000	4.7650	0.0291	0.0360	
Pulp and Paper	<i>GSTP1</i> / 11q13	rs1695/exon 5 (Ile105Val)	G/A	46	70	0.6571	4.9660	0.0259	0.0354	0.0207 (2.4134)

Definition of abbreviations: SNP= single nucleotide polymorphism, T = Transmitted minor allele count, U = Untransmitted allele count, OR = odds ratio, CHISQ = chi-square statistic, *CAT* = catalase, *GSTP1* =Glutathione S-transferase, *NQO1* = NAD(P)H dehydrogenase quinone 1; ^a Significant results after corrections are indicated in bold; ^b Ancestral alleles are indicated in bold when available in National Centre for Biotechnology Information (NCBI); ^c Corrected p value threshold for each gene considering only tagSNPs (30). Meff = Effective number of independent marker loci.

Table 10. Transmission Disequilibrium Test (TDT) results with p value < 0.05 for haplotypes and stratified according to the proximity of aluminium of pulp and paper industries

Industry	Gene symbol/ position	Locus	Haplotype	T	U	CHISQ	p value ^a	p value Threshold ^b (Meff)
All samples	CAT/ 11p13	H1	rs208679A rs7118388G rs7944397A rs208682C rs554518C	162.5	123. 8	5.2230	0.0223	0.0047 (10.5509)
		H1	rs208679A rs7118388A rs7944397A rs208682C rs554518C	113.5	148. 9	4.7790	0.0288	
		H2	rs1001179C rs480575A rs2284369A rs11032703T rs769218G rs2300181C rs7933285C rs511895T rs10488736C	91	54.4	9.2210	0.0024	
	EPHX1/ 1q42.1	H3	rs4653695A rs2740174A rs360063A rs1009668C	150.8	114. 9	4.8420	0.0278	0.0035 (14.2206)
	NQO1/ 16q22.1	H1	rs1800566A rs4986998G rs689452G rs1437135G rs689457C rs2917682T	86	119	5.3120	0.0212	0.0167 (2.9652)
Aluminium	CAT/ 11p13	H2	rs1001179C rs480575A rs2284369A rs11032703T rs769218G rs2300181C rs7933285C rs511895T rs10488736C	71	42	7.4420	0.0064	0.0044 (11.3167)
	NQO1/ 16q22.1	H1	rs1800566A rs4986998G rs689452G rs1437135G rs689457C rs2917682T	63	91	5.0910	0.0241	0.0183 (2.7369)
Pulp and Paper	EPHX1/ 1q42.1	H4	rs360063A rs1009668C	62	41	4.2820	0.0385	0.0031
	GSTP1/ 11q13	H1	rs1695A rs1138272C	69	45	5.0530	0.0246	0.0207 (2.4134)

Haplotypes were selected from all the genes selected for this study. Definition of abbreviations: T = transmitted minor allele count, U = untransmitted allele count, NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase quinone 1, CAT = catalase, EPHX1 = epoxide hydrolase 1, microsomal, CHISQ = chi-square statistic; ^a Significant results after correction; ^b Corrected p value considering the number of independent tagSNPs [30]. Meff = Effective number of independent marker loci.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 11. Polymorphisms analyzed in this study

Gene/ Location	SNP	Major/minor allele	HWE Total	HWE Alu.	HWE P.P.	MAF Total	MAF Alu.	MAF P.P.
<i>EPHX1/</i> 1q42.1	rs4653436	G/A	0.1965	0.2078	0.1123	0.388	0.390	0.418
	rs1467143	A/G	0.3497	0.4249	1.0000	0.465	0.458	0.459
	rs2854451	G/A	0.3441	0.3754	0.1059	0.251	0.251	0.259
	rs3753658	G/T	0.7496	0.7854	1.0000	0.092	0.090	0.092
	rs3753659	T/C	0.7524	0.7854	1.0000	0.093	0.090	0.092
	rs3753660	T/C	0.8633	0.9045	1.0000	0.096	0.094	0.094
	rs3738040	G/A	0.3601	0.2904	0.3594	0.090	0.085	0.081
	rs1877724	C/T	0.3180	0.3239	0.1325	0.252	0.253	0.261
	rs3738042	G/A	0.3519	0.4105	0.2769	0.381	0.382	0.411
	rs3753661	T/G	0.4392	0.5556	0.4616	0.098	0.093	0.085
	rs3766934	G/T	0.4345	0.5499	0.4616	0.097	0.093	0.085
	rs2671272	G/A	0.1761	0.3688	0.2659	0.177	0.183	0.153
	rs3738043	A/G	0.4345	0.5499	0.4616	0.097	0.093	0.085
	rs2854456	C/T	0.3123	0.3173	0.1325	0.252	0.252	0.261
	rs4149222	G/T	1.0000	1.0000	1.0000	0.096	0.093	0.097
	rs2671270	A/G	0.4024	0.2629	0.1531	0.248	0.248	0.253
	rs2234698	T/C	0.5481	0.1424	0.4801	0.058	0.051	0.052
	rs2292566	G/A	N/A	0.0578	0.9592	N/A	0.138	0.138
	rs2740170	C/T	0.9511	0.6142	0.3504	0.258	0.258	0.261
	rs4149223	G/C	0.5799	0.5367	0.9400	0.470	0.459	0.463
	rs2234922	A/G	0.1111	0.3494	0.1821	0.150	0.147	0.146
	rs4149226	C/T	0.4258	0.4352	0.9060	0.426	0.429	0.428
	rs4653695	A/C	0.8173	0.8355	0.4808	0.119	0.128	0.119
	rs2740174	A/G	0.8649	1.0000	0.8001	0.070	0.069	0.075
	rs360063	G/A	0.3070	0.5275	0.7847	0.420	0.428	0.418
	rs1009668	C/T	0.9463	0.9118	0.4852	0.116	0.126	0.118
	rs868966	A/G	N/A	N/A	0.3135	N/A	N/A	0.385
	rs1051740	T/C	N/A	N/A	0.1685	N/A	N/A	0.237
<i>ARG1/</i> 6q23	rs2608897	C/T	N/A	0.7752	0.5588	N/A	0.281	0.280
	rs2246012	T/C	0.2110	0.3927	1.0000	0.124	0.127	0.131
	rs17184300	T/C	0.3608	0.6766	0.1015	0.134	0.128	0.128
<i>TNF/</i> 6p21.3	rs5029936	G/A	1.0000	1.0000	1.0000	0.086	0.09	0.253
	rs643177	C/T	0.5413	1.0000	0.4012	0.233	0.233	0.331
	rs610604	T/G	0.2385	0.3479	0.4781	0.321	0.325	0.075
<i>CAT/</i> 11p13	rs208679	A/G	0.7760	0.3975	0.9829	0.088	0.092	0.087
	rs7118388	A/G	0.4739	0.9746	0.4100	0.468	0.470	0.455
	rs7944397	A/G	0.2007	0.6099	0.7369	0.156	0.154	0.139
	rs208682	C/T	0.9714	1.0000	0.3155	0.164	0.162	0.160
	rs554518	C/T	0.7819	0.7891	0.2261	0.148	0.146	0.143

Gene/ Location	SNP	Major/minor allele	HWE Total	HWE Alu.	HWE P.P.	MAF Total	MAF Alu.	MAF P.P.
	rs1001179	C/T	0.1644	0.1340	0.1824	0.184	0.183	0.168
	rs480575	A/G	0.1459	0.2977	0.7437	0.351	0.353	0.339
	rs2284369	A/G	0.1951	0.6386	0.7931	0.263	0.262	0.252
	rs11032703	C/T	0.7928	1.0000	0.8758	0.124	0.129	0.143
	rs769218	G/A	0.2517	0.8278	0.8340	0.261	0.259	0.251
	rs2300181	C/T	0.9497	0.9925	0.8759	0.206	0.198	0.225
	rs7933285	C/T	0.9497	0.9925	0.8759	0.206	0.198	0.225
	rs511895	C/T	0.5477	0.8572	0.8708	0.363	0.371	0.364
	rs10488736	C/T	0.3862	0.3464	0.8308	0.287	0.277	0.297
	rs1535721	G/A	0.8788	1.0000	0.9272	0.295	0.298	0.275
	rs1323690	G/A	N/A	0.5708	0.0669	N/A	0.323	0.353
GSTP1/ 11q13	rs614080	A/G	0.7474	1.0000	N/A	0.462	0.472	N/A
	rs6591256	A/G	0.6588	0.6878	0.1381	0.370	0.382	0.362
	rs4147581	G/C	0.7474	1.0000	N/A	0.462	0.472	N/A
	rs1695	A/G	0.4381	0.2402	0.7368	0.324	0.337	0.325
	rs1138272	C/T	1.0000	1.0000	0.4452	0.069	0.068	0.064
NQO1/ 16q22.1	rs10517	G/A	N/A	0.5704	0.0588	N/A	0.170	0.159
	rs1800566	G/A	0.7716	0.7252	0.1360	0.170	0.180	0.183
	rs4986998	G/A	0.6167	0.9934	0.7259	0.067	0.066	0.053
	rs689452	G/C	N/A	0.3336	0.0527	N/A	0.163	0.150
	rs1437135	A/G	0.9370	0.9007	0.2439	0.171	0.181	0.184
	rs689457	C/T	0.0956	N/A	N/A	0.121	N/A	N/A
	rs2917682	T/C	N/A	0.2536	0.0973	0.178	0.174	0.156
MPO/ 17q23.1	rs8178375	T/C	0.4729	0.5018	0.8103	0.117	0.116	0.132
	rs2071409	T/G	0.3946	0.5700	0.3958	0.141	0.145	0.164
	rs4401102	C/T	0.0714	0.0596	0.1895	0.217	0.223	0.232
	rs12452417	G/A	0.3009	0.2964	0.7865	0.138	0.137	0.144
TGFB1/ 19q13.1	rs10417924	C/T	0.7842	1.0000	1.0000	0.205	0.201	0.189
	rs8179181	G/A	0.6858	0.4754	0.1251	0.247	0.239	0.229
	rs8110090	A/G	1.0000	1.0000	0.6686	0.062	0.069	0.077
	rs4803455	A/C	0.7895	0.5588	0.5723	0.497	0.496	0.493
	rs2241715	C/A	0.4773	0.2594	0.5549	0.310	0.308	0.289
	rs2241714	C/T	0.3693	0.2023	0.2597	0.315	0.316	0.293

64 SNPs analyzed for all subjects, 69 SNPs for aluminum subjects and 69 SNPs for pulp and paper subjects. Definitions: SNP= single polymorphism nucleotide, HWE= Hardy-Weinberg equilibrium, MAF= minor allele frequency, Alu.= Aluminum industries, P.P.= pulp and paper industries, *EPHX1*= Epoxide Hydrolase 1 Microsomal, *ARG1*= Arginase, *TNF*= Tumor Necrosis Factor, *CAT*= Catalase, *GSTP1*= Glutathione S-Transferase pi 1, *NQO1*= NAD(P)H Dehydrogenase Quinone 1, *MPO*= Myeloperoxidase, *TGFB1*=Transforming Growth Factor, beta 1, N/A= not analyzed, did not respect the threshold for HWE, MAF or genotyping %.

Table 12. Proportions of individuals living within 10 km radius of different industries

Type of industry	Percentage (%) of individuals ^c	Type of pollutant produced by the industry ^d
Aluminum	73.93	PAH, SO ₂ , fluoride, CO, PM _{2.5} , PM ₁₀
Pulp and paper	44.59	VOC, PM _{2.5} , PM ₁₀ , SO _x , NO _x
Mine ^a	7.79	PM _{2.5} , PM ₁₀ ^c
Wood products	11.80	VOC, PM _{2.5} , PM ₁₀ , SO _x , CO
Others ^b	2.46	N/A

^a Niobium mine, ^b Milk transformation, iron and steel, petroleum refining, chemicals, plastic and rubber, etc. ^c These data were calculated with the NPRI (National pollutant release inventory) Google Earth software. ^d These information comes from Environment Canada and NPRI Google Earth tool. ^e No data available for niobium mines. PAH = polycyclic aromatic carbon, SO₂= sulfur dioxide, CO= carbon monoxide, PM= particulate matter, VOC= volatile organic compound, SO_x= sulfur oxides, NO_x= nitrogen oxides.

Table 13. Total pollutant emissions in tones from different types of industry located in the SLSJ area for the year 2002

Pollutants	Aluminum	Pulp and paper	Wood product	Other industries	All facilities ^a
Sulfur dioxide	25,854	1,727	N/A	N/A	1,978,139
Carbon monoxide	168,547	5,900	154	N/A	914,413
Volatile organic compound	169	585	379	15	256,189
PM- Total particulate matter	5,305	336	146	143	223,736
PM10- Particulate matter; 10 microns	268.33	137	56	43	107,001
PM2.5; 2.5 microns	217.04	116	41	4.3	58,575
Nitric oxides (NO ₂)	1051	1147	244	N/A	579,648

Data were calculated using the NPRI Google Earth software. ^a All facilities reporting to the NPRI.

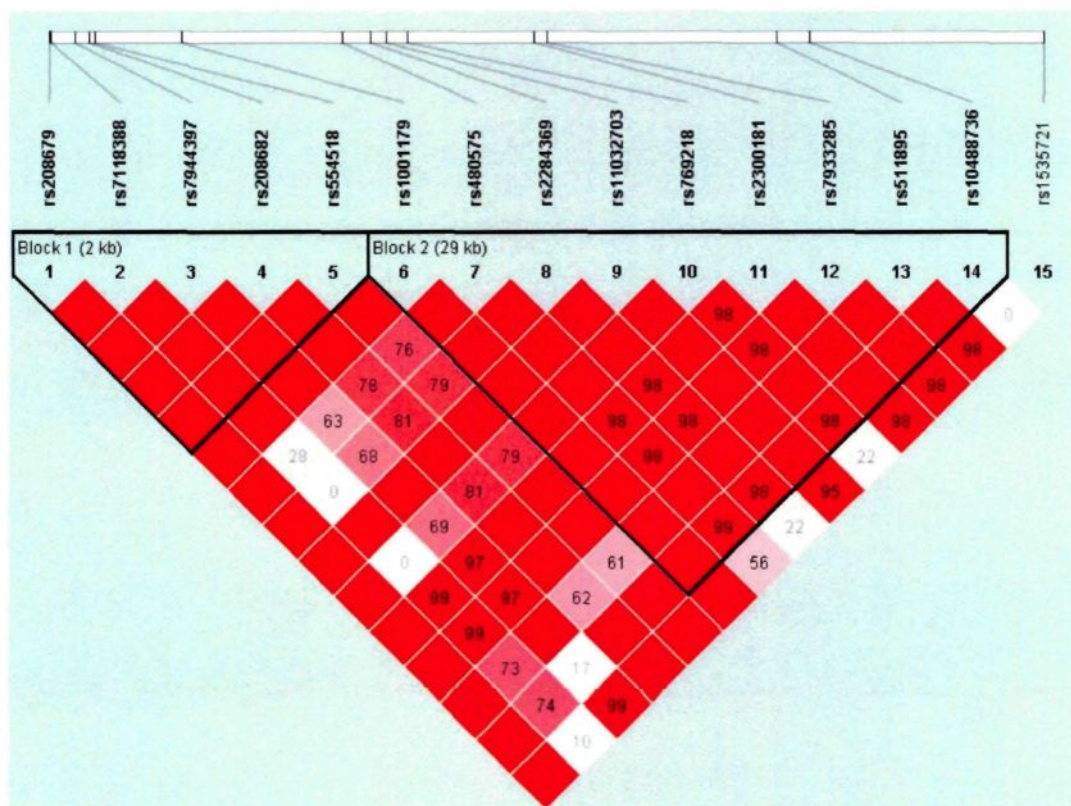


Figure 2. Pairwise linkage disequilibrium pattern of the *CAT* gene single nucleotide polymorphisms (SNPs). The location of each SNP on the chromosome is indicated on top. The numbers indicated in the diamonds correspond to the magnitudes of linkage disequilibrium (D') between the respective pairs of SNPs (for example, the pairwise magnitude of the linkage disequilibrium between rs554518 and rs480575 is 0,76). Diamonds in red without indicated number are in perfect linkage disequilibrium ($D'=1$) and the ones that are in white are in equilibrium. Haplotypes are indicated by the black triangles. Block 2 is associated with asthma in the SLSJ cohort.

CHAPITRE 3

3. DISCUSSION

La présente étude a permis d'évaluer l'association entre différents gènes précédemment associés à l'asthme et l'environnement dans la collection familiale asthmatique provenant du Saguenay–Lac-Saint-Jean (étude SLSJ). Cette étude a non seulement permis d'associer les gènes *CAT*, *GSTM1* et *NQO1* à l'asthme dans un environnement influencé par l'exposition à des industries de l'aluminium et de pâtes et papiers, mais elle permet aussi de critiquer la valeur d'une étude d'interaction entre les gènes et l'environnement dans un trait complexe avec les méthodes disponibles actuellement.

3.1. LA COLLECTION FAMILIALE ASTHMATIQUE DU SAGUENAY–LAC-SAINT-JEAN

La collection est composée d'individus provenant exclusivement de la région du SLSJ. Cette région possède différentes caractéristiques génétiques et environnementales. Les individus sont tous caucasiens de descendance française et font partis d'une population qui est caractérisée par un effet fondateur (103). L'effet fondateur peut se décrire comme une situation où une petite partie d'individus serait isolée de façon géographique de la population ancestrale (104). Cette nouvelle population appelée fondatrice, aurait donc une variabilité génétique significativement moindre comparativement à la population ancestrale (104). Ces populations sont considérées comme un bon modèle pour l'étude des traits complexes comme l'asthme (105). En effet, la fréquence de certains variants alléliques rares peut être différente de celle observée dans des populations dites cosmopolites ce qui permet de déterminer de façon plus marquée l'association entre certains polymorphismes et un phénotype multigénique comme l'asthme (105). Puisque les gènes sélectionnés ont déjà été précédemment associés à l'asthme dans la littérature scientifique, la réplication de l'association dans l'étude SLSJ vient appuyer une fois de plus le rôle de ces gènes dans la maladie, et ce, peu importe l'environnement.

Bien que l'étude familiale SLSJ présente de nombreux avantages pour les études génétiques, un échantillon prélevé dans la population du SLSJ, mais ayant comme critère

une exposition importante et mieux définie pour certains polluants (par exemple des travailleurs oeuvrant dans les industries présentent au SLSJ qui auraient été pairés à d'autres travailleurs non exposés) aurait certainement contribué à mieux définir l'impact de l'environnement et celui de la génétique dans l'asthme.

3.2. DESCRIPTION DE L'ENVIRONNEMENT DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN

Une enquête menée par l'Institut de santé publique en 2008 et portant sur 38 villes du Québec a permis de déterminer qu'il y a de 2 à 2,5 fois plus d'hospitalisations pour des problèmes respiratoires des voies aériennes inférieures (asthme principalement) au SLSJ (Tableau 14). De plus, l'analyse de l'environnement dans cette même étude a permis de déterminer que la composition des particules formant les irritants respiratoires dans l'environnement au SLSJ était reliée principalement aux industries (première ville en ce qui concerne les concentrations de monoxyde de carbone (CO), matière particulaire totale (MPT), seconde pour les composés organiques volatils (COV) et le dioxyde de soufre (SO₂) et sixième pour les oxydes d'azote (NO_x)) et que la proportion de particules polluantes associée à l'automobile était minime comparativement aux autres villes (Tableau 15) (106).

Tableau 14. Taux d'hospitalisation en soins physiques pour les maladies des voies respiratoires inférieures de 2006 à 2009

Groupes d'âge	Nombre par an (SLSJ)	Taux brut	
		SLSJ*	Reste du Québec
0-14	195	47,0†	20,9
15-19	11	6,2	2,8
20-39	51	8,0	2,1
40-49	39	8,6	4,5
50-69	336	44,7	30,7
70 et plus	749	259,5	140,9
Tous les âges	1382	50,6	26,4

*Les valeurs sont significativement plus élevées que le reste du Québec (seuil 1%). † Taux annuel par 10 000 personnes (source : Direction de la santé publique de l'agence de santé et des services sociaux du Saguenay-Lac-Saint-Jean (novembre 2010)).

Tableau 15. Source d'émission de polluants de l'air dans la région du Saguenay–Lac-Saint-Jean pour la période allant de 2000 à 2003

Source d'émission	Industries		Transport routier	
	% du Québec	Rang	% du Québec	Rang
CO	43,8	1 ^{er}	ND	ND
MPT	24,7	1 ^{er}	2,4	11 ^{ième}
COV	12,3	2 ^{ième}	3,2	11 ^{ième}
SO ₂	12,2	2 ^{ième}	2,6	11 ^{ième}
NO _x	9,0	6 ^{ième}	2,5	11 ^{ième}
Total	28,7	1^{er}	2,7%	11^{ième}

CO = monoxyde de carbone, MPT= matière particulaire totale, COV= composé organique volatil, SO₂= dioxyde de soufre, NO_x= oxyde d'azote.

Les caractéristiques environnementales de la région ont été décrites en détail dans l'article. Les polluants mesurés sont l'ozone et le dioxyde de soufre. L'ozone a été largement étudié et plusieurs gènes ont été associés avec l'asthme et l'exposition à ce polluant de l'air (58–63, 65, 66, 69, 70), tandis que le dioxyde de soufre a été majoritairement étudié dans des modèles animaux (107, 108) ou cellulaires (57, 109). Une étude a associé l'exposition au dioxyde de soufre à une diminution de la fonction pulmonaire chez les sujets porteurs d'un polymorphisme au niveau du promoteur du gène *TNFα* (110). De plus, la présence de différentes industries dans la région donne d'autres informations intéressantes sur les polluants émis et sur les niveaux de ceux-ci. Les industries de l'aluminium et des pâtes et papiers sont les plus importantes dans la région. Des études sur la diminution des fonctions pulmonaires et le développement de l'asthme chez les travailleurs d'usine d'aluminium (111–114) et de pâtes et papiers (115, 116) ont été effectuées par le passé. Ces études indiquent que le développement de l'asthme et la diminution de la fonction respiratoire chez les travailleurs sont surtout dus à leur exposition au dioxyde de soufre (111, 115, 116) et à l'ozone (116). Une étude de Mirabelli *et al.* a évalué le lien entre la proximité d'une usine de pâtes et papier d'une école et l'augmentation de la fréquence de respiration sifflante chez les élèves (117). Ils ont déterminé que la proximité de l'usine combinée à une exposition à la fumée de cigarette augmentait l'apparition de ces symptômes (117).

Même si un bon nombre de données provenant d'Environnement Canada sont disponibles (118–120), celles-ci sont très globales et il est impossible de savoir l'exposition

individuelle pour chacun ce qui apporte une grande difficulté pour l'étude de l'interaction gènes-environnement dans l'asthme auprès de cette population. En dépit de la mesure de la proximité d'industrie, de la résidence des individus, on ne peut pas tenir compte de l'exposition reliée au milieu de travail ou de loisir, ce qui peut aussi influencer l'exposition totale pour chaque individu aux polluants. De plus, la collection familiale asthmatique utilisée dans cette étude n'a pas été conçue à la base pour ce type d'étude, c'est-à-dire que les critères de recrutement n'étaient pas définis, pour des études d'interaction gènes-environnement, ce qui peut en diminuer la puissance. En effet, le questionnaire était limité quant à la définition de l'exposition (résidence et occupation) et le recrutement ne respectait pas la densité de population réelle autour des usines considérées. Par contre, la validité des résultats s'appuie sur la taille de l'échantillon puisque la collection comporte plus de 1400 sujets, ce qui est significativement plus important que la plupart des autres études effectuées jusqu'à aujourd'hui. Idéalement, il aurait fallu un dispositif personnalisé permettant une mesure réelle de l'exposition aux principales particules pour chaque individu, et ce, pour un délai permettant d'estimer l'exposition annuelle, ce qui est actuellement impossible, faute de dispositif adéquat et de données quant aux périodes critiques. Il est intéressant de noter que certains dispositifs composés de réseaux de capteurs et permettant de mesurer plusieurs polluants à la fois en temps réel sont également à l'étude présentement (121). Par ailleurs, ce genre d'étude est applicable pour des études de méthylation avec des modèles animaux en laboratoire, par exemple (122).

Ainsi, certaines études ont évalué l'interaction entre les gènes et l'environnement dans l'asthme à l'aide d'expositions contrôlées. Ces études sont utiles pour déterminer quels déterminants génétiques sont associés à une diminution de la fonction respiratoire lors d'expositions à des niveaux élevés de polluants, mais ne peuvent démontrer l'effet à long terme de ces environnements. Ces études permettent plutôt de déterminer la susceptibilité des individus à différents environnements. Ainsi, elles peuvent s'avérer utiles afin de préciser le rôle de certains polymorphismes dans la pathogenèse de l'asthme pour des personnes exposées à un environnement particulier et ultimement pour comprendre le mécanisme de l'interaction entre cet environnement et la maladie.

L'étude d'une exposition à long terme est aussi primordiale afin de déterminer quels environnements contribuent au développement de l'asthme, ceux qui contribuent à sa persistance et sa sévérité de même que ceux qui auraient un effet de protection sur la maladie. La combinaison de ces études d'exposition sur une longue période (longitudinale) à celles de génétique augmenterait significativement la compréhension de la pathogenèse de l'asthme et conduirait nécessairement au développement de stratégies de préventions et de traitements mieux ciblés. Enfin, ces études devraient aussi considérer la différence entre une exposition à des niveaux très élevés de polluants pour une courte période (exposition aiguë) et une exposition faible ou modérée sur une longue période (exposition chronique) dans leurs analyses (122).

3.3. ANALYSE PAR GÈNE CANDIDAT

La plupart des études d'interaction gènes-environnement sont des études où la sélection des gènes a été faite sur la base de critères faisant des gènes étudiés, des gènes candidats. Ces gènes sont la plupart du temps sélectionnés en se basant sur les mécanismes biologiques connus et considérés comme ayant un effet possible relié à une l'exposition à l'environnement étudié. En effet, la plupart des gènes sélectionnés pour étudier l'effet des polluants de l'air sont des gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif (*CAT*, *GSTM1*, *GTSP1*, *NQO1* etc.). Il sera donc important de se concentrer sur les différents mécanismes biologiques de protection impliqués afin d'explorer d'autres voies pour identifier de nouveaux gènes. Des études d'interaction gènes-gènes seront donc primordiales afin de déterminer de nouvelles voies de signalisation biologique impliquées dans la maladie (123). L'analyse de ces gènes en lien avec l'environnement permettra de mieux comprendre le mécanisme de l'effet de l'environnement sur le développement de la maladie.

Depuis quelques années, différents types d'études ont permis l'analyse de l'interaction gènes-environnement, parmi ceux-ci les études pangénomiques ainsi que les études par gène candidat. Les études d'analyses pangénomiques sont de plus en plus utilisées et ont permis l'identification de nombreux gènes associés aux traits complexes dont l'asthme (124). La difficulté de caractériser l'environnement rendrait difficile l'approche par analyse pangénomique dans cette étude. En effet, la présence de différentes

industries, mais aussi de vallées et de vents dominants ajoute de grande difficultés. Les marqueurs qui sont déterminés par cette approche seraient plutôt associés au développement de la maladie en général plutôt que relié à un environnement particulier. De plus, l'identification d'interaction dans les études pangénomiques pose un problème de puissance statistique (125). Ege *et al.* ont effectué la seule étude pangénomique d'asthme qui considère l'interaction avec un environnement rural (ferme, animaux de ferme et consommation de lait de ferme (non pasteurisé)) (126). Un point intéressant de l'étude est l'implication possible des polymorphismes rares plutôt que ceux plus communs sur un environnement à risque. (126). Puisque ce sont des variants rares, l'identification de ces SNP nécessite de très grands échantillons pour atteindre une puissance assez élevée afin de pouvoir les détecter. Ainsi, l'approche par gène candidat est justifiée par le fait qu'il requiert un moins grand nombre d'échantillons pour avoir une bonne puissance et ainsi identifier les gènes associés à une maladie en présence d'un ou de plusieurs environnements particuliers (126).

3.4. PERSPECTIVES POUR LES FUTURES ÉTUDES D'INTERACTION GÈNES-ENVIRONNEMENT

Il est important de noter que malgré l'impact important que peut avoir l'exposition à différents environnements dans le développement de l'asthme, ceux-ci ont rarement été pris en compte dans les études génétiques. La difficulté de répliquer de l'association de certains gènes dans différentes populations, que ce soit dans le contexte d'études de gènes candidats ou de GWAS, pourrait s'expliquer par la différence d'exposition à différents environnements de celles-ci (123). En effet, si la combinaison d'un gène et d'un environnement précis est requise pour développer la maladie, ce même gène ne peut être associé dans une population exposée à un environnement différent (par exemple, différents niveaux de pollution de l'air entre les deux populations). Cela pourrait être dû à la difficulté de définir différents environnements et de mesurer l'exposition de diverses substances en temps réel, mais aussi à long terme. Les mesures des différents polluants de l'air dans les études génétiques sont souvent peu précises. Ceux-ci sont souvent définis comme niveau moyen dans une population ou tout simplement par la proximité d'une autoroute par rapport à leur domicile (123). Le premier élément, qui serait également le plus simple,

consisterait à ajouter aux études génétiques d'asthme (comme l'étude SLSJ) des questions relatives à l'exposition à différents environnements dans le questionnaire. Un simple sondage téléphonique pourrait permettre d'obtenir ces informations essentielles. La plupart des questionnaires contiennent déjà des données sur l'allaitement, l'exposition au tabac ou à des animaux de compagnie. Des questions sur la proximité d'industries, de routes importantes ou sur le chauffage au bois (incluant le nombre de cordes et le type de poêle utilisé) de leur domicile, les sports pratiqués et le nombre d'heures par semaine pourraient être utiles dans le cas d'études d'interaction génotype-environnement. La considération de ces données dans le raffinement des analyses gènes-environnement pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de la génétique et de l'environnement dans l'asthme (51–53).

De plus, il serait important de déterminer à quel moment de la vie a eu lieu l'exposition aux différents environnements. En effet, l'importance des expositions *in utero*, lors des premières années de vies (durant l'enfance), celles durant l'adolescence et même durant l'âge adulte n'auraient pas le même impact. Plusieurs articles (dont la revue de Accordini *et al.* qui présente une synthèse intéressante) traitants de l'exposition au tabac illustrent cette réalité qui repose essentiellement sur la chronicité du développement du système immunitaire (127). La revue de Wlasiuk *et al.* souligne aussi le fait que des études ont démontré que l'exposition en bas âge aux endotoxines et aux microbiomes spécifiques à la ferme (exposition prénatale et dans les deux à trois premières années de vie) aurait un effet plus important sur la protection contre le développement de la maladie par rapport à l'exposition qui a lieu plus tard durant le développement. De plus, cette exposition en bas âge aurait un effet protecteur tout au long de la vie. Cette revue souligne aussi l'importance de la diversité du microbiome sur l'effet protecteur du développement de l'asthme (76).

Cependant, en considérant la difficulté d'établir la mesure de différents polluants de l'air basée uniquement sur un questionnaire qualitatif, des dispositifs individuels devront être développés afin de mieux évaluer ceux-ci. De plus, ces dispositifs devraient aussi permettre d'évaluer les temps d'expositions ainsi que la quantité moyenne et totale de l'exposition. Une équipe de l'Université de Toronto a développé un dispositif portable et peu coûteux afin de déterminer les niveaux de différents polluants de l'air (particules en suspension, composé organique volatil, ozone et dioxyde d'azote) dans des environnements

précis. Différentes versions de ce dispositif ont été développées afin de pouvoir mesurer les polluants intérieurs, extérieurs ainsi qu'un modèle portable. Un tel dispositif pourrait permettre de déterminer les environnements représentant un risque pour la santé respiratoire en plus de déterminer quels sont les individus qui présentent de hauts risques en lien avec leurs déterminants génétiques et ainsi l'établissement de normes d'expositions spécifiques (121).

Un des problèmes majeurs dans l'étude de l'interaction gènes-environnement dans l'asthme est la différence des avancées technologiques entre les deux disciplines. En effet, les technologies relatives au domaine de la génétique ont évolué très rapidement durant les vingt dernières années ayant permis de documenter les gènes associés aux traits complexes comme l'asthme. Par contre, l'étude de l'effet de différentes expositions est souvent limitée à des données globales ou à un questionnaire, mais à aucune donnée précise sur les niveaux d'exposition quantitative pour chaque individu (31). Il est donc nécessaire de développer de nouveaux outils afin de mesurer l'exposition individuelle dans les différents environnements qui pourrait avoir un impact sur la maladie (par exemple les différents polluants de l'air, différents allergènes, divers microorganismes ou le tabac). Sans le développement de ces outils, la possibilité de comprendre l'interaction entre les gènes et des polluants spécifiques restera limitée.

Une autre difficulté dans les études de gènes-environnement dans l'asthme est la description du phénotype. Dans cette étude, les phénotypes des sujets ont été déterminés sur la base de l'évaluation clinique suivant les définitions de *l'American Thoracic Society* (128). Les phénotypes auraient également pu être définis sur la base de l'âge du début d'asthme (*age of onset; childhood asthma versus adult asthma*), des types cellulaires (asthme neutrophilique ou éosinophilique), de la médication, de la sévérité, etc. Un article récent par Wenzell trace une revue des différents endotypes et phénotypes de l'asthme (129). Toutefois, cette étude a permis d'initier une réflexion quant à l'évaluation de l'impact de la composante environnementale et génétique dans l'asthme. Ainsi, une autre façon de définir les phénotypes d'asthme pourrait être de considérer certains critères génétiques et environnementaux. Cette manière de caractériser les sujets, comme les autres proposées par Wenzell, pourrait permettre d'augmenter la puissance des études

d'associations sans avoir à augmenter la taille de l'échantillon (129, 130). En ce qui concerne la mesure de facteurs environnementaux ou la mesure de l'exposition réelle, un des moyens suggérés est d'effectuer des mesures répétées de données quantitatives sur une plus longue période de temps. En effet, l'étude de Wong *et al.* a déterminé que des études ayant une meilleure définition de l'exposition pourraient être aussi puissantes que des études ayant une taille d'échantillon 20 fois plus grande (130). De plus, il faut considérer que certains gènes agissent de façon indépendante aux facteurs environnementaux. Enfin, les mécanismes fonctionnels qui sous-tendent les gènes associés à l'asthme dans un environnement particulier représentent un vaste domaine d'étude qui reste à élucider.

3.4.1. Biomarqueurs de l'exposition à certains environnements

D'autres moyens pourraient aussi être développés pour déterminer l'exposition individuelle. Certaines études ont tenté de développer des biomarqueurs mesurables dans l'urine ou dans le sang afin de déterminer le niveau d'exposition individuelle à différents environnements ou polluants (études du microbiome et du métabolome). Certains marqueurs étudiés se sont avérés plus ou moins applicables: les niveaux de carboxyhémoglobine dans le sang pour mesurer les niveaux de monoxyde de carbone dus au trafic n'ont pas donné de résultats prometteurs (131). Par ailleurs, certaines études portant sur l'interaction gènes-environnement dans l'asthme chez des sujets exposés à la fumée du tabac mesurent les niveaux de cotinine et de nicotine dans l'urine des sujets afin de déterminer leur exposition individuelle (132). Matt *et al.* ont aussi confirmé leur validité et ont déterminé que cette mesure permettait de mesurer seulement les expositions récentes au tabac (133, 134). Plusieurs mesures de ce biomarqueur permettraient d'avoir une idée de l'exposition de l'individu sur une période de temps déterminée (134). Le développement de biomarqueurs pour évaluer l'exposition individuelle serait donc un outil fort utile pour l'étude de l'interaction gènes-environnement dans l'asthme.

3.4.2. Interaction entre les données épigénétiques et environnementales

L'environnement peut aussi influencer la composante épigénétique de l'ADN. La méthylation de l'ADN ainsi que la modification des histones sont les changements épigénétiques les plus étudiés. L'épigénétique peut être décrite comme des changements au

niveau de l'ADN qui peuvent modifier l'activation de certains gènes tout en n'altérant pas la séquence de base de l'ADN (134). Les modifications épigénétiques devront être absolument considérées dans les études d'interaction gènes-environnement. Une étude de Fraga *et al.* suggère que l'exposition à différents environnements qui ont lieu après l'enfance peut influencer la méthylation de certains gènes ainsi que l'acétylation d'histones (133). Ceux-ci ont comparé le patron de méthylation de jumeaux monozygotes et ont déterminé que celui-ci varie de façon plus marquée chez les couples de jumeaux plus vieux comparativement aux plus jeunes (135). Cette différence était encore plus marquée chez les couples de jumeaux ayant différents modes de vie et qui passaient moins de temps ensemble, ce qui indique un rôle potentiellement important des facteurs environnementaux sur le profil de méthylation de chaque individu (135). L'impact de l'épigénétique sur l'interaction avec l'environnement dans une maladie est donc un facteur important à étudier. Différentes études épigénétiques sur des gènes associés à l'asthme et l'exposition à un environnement particulier ont été effectuées. L'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (136), à l'inflammation et au stress oxydatif (137), aux polluants de l'air (138), la diète (139–144) et les allergènes (145) ont été associés aux changements épigénétiques reliés au développement de l'asthme. La plupart de ces études sont effectuées dans des modèles animaux sauf celle de Perara *et al.* qui a été effectuée chez des sujets asthmatiques (138). L'équipe du laboratoire de la Dre Catherine Laprise a établi qu'il y avait une interaction entre la méthylation et l'exposition à la fumée du tabac *in utero* chez les asthmatiques. En effet, ils ont observé une hypométhylation au niveau du promoteur du gène *IL1R2* chez les sujets exposés au tabagisme *in utero* (140).

3.4.3. Interaction entre les gènes et plusieurs environnements

Il faudra aussi prendre en considération qu'il peut y avoir interaction avec plusieurs environnements et des gènes dans le contexte des traits complexes. Par exemple, l'étude Romieu *et al.* a établi un lien entre la prise de supplément d'antioxydants chez les sujets asthmatiques ayant un génotype *GSTM1-null* en relation avec la concentration en ozone. Précisément, ils ont démontré que la prise d'antioxydants avait un effet protecteur sur la diminution de la fonction respiratoire provoquée par l'exposition à de hauts niveaux d'ozone chez les sujets asthmatiques porteurs du génotype *GSTM1-null* (60). Une revue

plus exhaustive de l'interaction entre la diète, la pollution de l'air et le développement de l'asthme a d'ailleurs été effectuée par Romieu *et al.* (146). Cette revue résume l'effet de la pollution de l'air sur le stress oxydatif ainsi que l'impact de la prise de supplément permettant de moduler les effets secondaires qu'apporte le stress oxydatif (146).

Une autre étude a aussi fait le lien entre le gène *TNF* et l'exposition à la pollution de l'air (concentration en ozone) et au tabac dans le développement de l'asthme. La combinaison de ces deux environnements pourrait avoir un effet synergique et amplifier l'effet d'un polymorphisme au niveau de *TNF* dont l'effet serait moindre sans la présence de ces environnements (45).

Il sera donc important dans le futur de développer des outils statistiques permettant d'étudier la combinaison de différents environnements et polymorphismes sur le développement des traits complexes.

3.4.4. Outils bio-informatiques pour étudier les interactions gènes-environnement

Le développement d'outils bio-informatiques contribue significativement à l'étude des interactions gènes-environnement dans l'asthme. Un des outils développés est le programme *Multifactorial Dimensionality Reduction* (MDR) qui permet d'étudier tant les interactions gènes-environnement que les interactions gènes-gènes (147). Ce programme est adapté pour les traits complexes et permet d'analyser jusqu'à 15 variables à la fois (147). Par contre, une des principales limites est que ce programme a été développé pour les échantillons de type cas-témoin et non familiaux comme celui utilisé dans cette étude. D'autres programmes et méthodes ont également été développés. Le *SIMulation of pedigree data for Linkage and Association studies* (SIMLA) est un logiciel permettant d'analyser des échantillons familiaux (148). Par contre, il y a peu de publication répertoriant son utilisation dans les études d'interaction gènes-environnement. QUANTO quant à lui permet de calculer la grandeur d'échantillon nécessaire ainsi que la puissance pour les études d'interactions gènes-gènes et gènes-environnement (<http://hydra.usc.edu/gxe/>). Peu d'outils informatiques ont été développés ce qui indique qu'il reste encore beaucoup de travail à faire dans ce sens pour pallier à cette lacune

importante. En effet, le développement de ces outils est nécessaire afin d'optimiser les études d'interaction gènes-environnement.

La présente étude a permis de démontrer que de considérer à la fois des génotypes et des expositions environnementales à risque pour le développement de l'asthme est un défi de taille. Toutefois, l'intégration des déterminants environnementaux ayant un impact sur le développement de l'asthme et comment ceux-ci interagissent avec des génotypes particuliers est essentielle à une meilleure compréhension du développement de la maladie et au développement de programme de prévention et d'intervention ciblés.

CONCLUSION

Ces dernières années, l'intégration de l'étude de l'interaction entre les gènes et l'environnement dans les traits complexe s'est de plus en plus développée. Cependant, ces études comportent de nombreux défis. En effet, la différence d'avancées entre les technologies relatives à la génétique et des outils permettant de mesurer l'exposition environnementale constitue un obstacle important. De plus, la difficulté de définir l'exposition et la maladie (dans ce cas-ci l'asthme) amène une problématique importante quant à la puissance de l'étude. Le développement d'outils afin de mieux caractériser l'environnement sera donc nécessaire. Néanmoins, cette étude a permis l'association du gène *CAT* avec l'asthme dans l'étude SLSJ. D'autres études devront être effectuées pour confirmer l'implication de la pollution de l'air sur l'effet de ce gène dans le développement du trait. Les études des interactions gènes-environnement devront se poursuivre dans le but de déterminer quels environnements interagissent avec quels polymorphismes et dans quel sens, c'est-à-dire protecteurs ou délétères, sur le développement de l'asthme pour une meilleure compréhension de la pathogenèse de l'asthme.

RÉFÉRENCES:

1. Government of Canada PHA of C. Life and Breath: Respiratory Disease in Canada - Public Health Agency of Canada [Internet]. 2007 [cited 2012 Jun 17]. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2007/lbrdc-vsmrc/tobacco-tabagisme-eng.php>
2. Government of Canada PHA of C. The Prevention and Management of Asthma in Canada - Public Health Agency of Canada - Public Health Agency of Canada [Internet]. 2000 [cited 2012 Jun 17]. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/pma-pca00/>
3. Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, et al. Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy*. 2004 Aug;34(8):1192–201.
4. Zhang X, Su D, Zhang X, Sui H, Jin L, Lü F, et al. Association of ADAM33 gene polymorphisms with adult concomitant allergic rhinitis and asthma in Chinese Han population. *Mol Biol Rep*. 2008 Aug;36(6):1505–9.
5. GINA - the Global Initiative For Asthma [Internet]. [cited 2011 Mar 9]. Available from: <http://www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp??i1=2&i2=1&intId=1561>
6. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N. Engl. J. Med*. 2001 Feb 1;344(5):350–62.
7. Holloway JW, Beghé B, Holgate ST. The genetic basis of atopic asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 1999 Aug;29(8):1023–32.
8. Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. Asthma. *Lancet*. 2002 Oct 26;360(9342):1313–22.
9. Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory Mediators of Asthma: An Update. *Pharmacological Reviews*. 1998 Dec 1;50(4):515 –596.
10. BLEECKER E, POSTMA D, MEYERS D. Evidence for Multiple Genetic Susceptibility Loci for Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1997 Oct 1;156(4):S113–116.
11. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259–60.
12. Barnes PJ. Cytokines as mediators of chronic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1994 Nov;150(5 Pt 2):S42–49.
13. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J. Appl. Genet*. 2005;46(1):93–104.
14. Black JL. Asthma--more muscle cells or more muscular cells? *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2004 May 1;169(9):980–1.
15. McParland BE, Macklem PT, Pare PD. Airway wall remodeling: friend or foe? *J. Appl. Physiol*. 2003 Jul;95(1):426–34.
16. Wang L, McParland BE, Paré PD. The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):356S–62S.
17. Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu. Rev. Immunol*. 2004;22:789–815.
18. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000 May;161(5):1720–45.

19. Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008 Jun;38(6):872–97.
20. Bumbacea D, Campbell D, Nguyen L, Carr D, Barnes PJ, Robinson D, et al. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur. Respir. J*. 2004 Jul;24(1):122–8.
21. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005 Jan;11(1):1–6.
22. Vignola AM, Mirabella F, Costanzo G, Di Giorgi R, Gjomarkaj M, Bellia V, et al. Airway remodeling in asthma. *Chest*. 2003 Mar;123(3 Suppl):417S–22S.
23. Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2000 Jan;6(1):15–20.
24. Singh AM, Busse WW. Asthma exacerbations · 2: Aetiology. *Thorax*. 2006 Sep;61(9):809–16.
25. Parham P. Le système immunitaire. de Boeck Université. 2003.
26. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today*. 1997 Jun;18(6):263–6.
27. Madore A-M, Laprise C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *J Asthma Allergy*. 3:107–21.
28. Aujla SJ, Alcorn JF. T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011 Nov;1810(11):1066–79.
29. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis. *Allergy*. 2011 Aug;66(8):989–98.
30. London SJ, Romieu I. Gene by environment interaction in asthma. *Annu Rev Public Health*. 2009 Apr 29;30:55–80.
31. von Mutius E. Gene-environment interactions in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009 Jan;123(1):3–11.
32. Kurz T, Ober C. The role of environmental tobacco smoke in genetic susceptibility to asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Oct;4(5):335–9.
33. Ehrlich RI, Du Toit D, Jordaan E, Zwarenstein M, Potter P, Volmink JA, et al. Risk factors for childhood asthma and wheezing. Importance of maternal and household smoking. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):681–8.
34. von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*. 2002 Jun;109(6 Suppl):S525–532.
35. Jaakkola JJ, Nafstad P, Magnus P. Environmental tobacco smoke, parental atopy, and childhood asthma. *Environ. Health Perspect*. 2001 Jun;109(6):579–82.
36. Kabesch M, Hoefler C, Carr D, Leupold W, Weiland S, von Mutius E. Glutathione S transferase deficiency and passive smoking increase childhood asthma. *Thorax*. 2004 Jul;59(7):569–73.
37. Gilliland FD, Li Y-F, Dubeau L, Berhane K, Avol E, McConnell R, et al. Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2002 Aug 15;166(4):457–63.
38. Li Y-F, Gauderman WJ, Conti DV, Lin P-C, Avol E, Gilliland FD. Glutathione S-transferase P1, maternal smoking, and asthma in children: a haplotype-based analysis. *Environ. Health Perspect*. 2008 Mar;116(3):409–15.
39. Lee Y-L, Lee Y-C, Guo YL. Associations of glutathione S-transferase P1, M1, and environmental tobacco smoke with wheezing illness in school children. *Allergy*. 2007 Jun;62(6):641–7.
40. Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol*. 1985;57:357–417.

41. Sadeghnejad A, Karmaus W, Arshad SH, Kurukulaaratchy R, Huebner M, Ewart S. IL13 gene polymorphisms modify the effect of exposure to tobacco smoke on persistent wheeze and asthma in childhood, a longitudinal study. *Respir. Res.* 2008;9:2.
42. Ramadas RA, Sadeghnejad A, Karmaus W, Arshad SH, Matthews S, Huebner M, et al. Interleukin-1R antagonist gene and pre-natal smoke exposure are associated with childhood asthma. *Eur. Respir. J.* 2007 Mar;29(3):502–8.
43. Salam MT, Gauderman WJ, McConnell R, Lin P-C, Gilliland FD. Transforming Growth Factor- β 1 C-509T Polymorphism, Oxidant Stress, and Early-Onset Childhood Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Dec 15;176(12):1192–9.
44. Choudhry S, Avila PC, Nazario S, Ung N, Kho J, Rodriguez-Santana JR, et al. CD14 Tobacco Gene–Environment Interaction Modifies Asthma Severity and Immunoglobulin E Levels in Latinos with Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2005 Jul 15;172(2):173 –182.
45. Wu H, Romieu I, Sienra-Monge J-J, del Rio-Navarro BE, Anderson DM, Dunn EW, et al. Parental smoking modifies the relation between genetic variation in tumor necrosis factor-alpha (TNF) and childhood asthma. *Environ. Health Perspect.* 2007 Apr;115(4):616–22.
46. Reijmerink NE, Kerkhof M, Koppelman GH, Gerritsen J, de Jongste JC, Smit HA, et al. Smoke exposure interacts with ADAM33 polymorphisms in the development of lung function and hyperresponsiveness. *Allergy.* 2009 Jun;64(6):898–904.
47. Wang C, Salam MT, Islam T, Wenten M, Gauderman WJ, Gilliland FD. Effects of in utero and childhood tobacco smoke exposure and beta2-adrenergic receptor genotype on childhood asthma and wheezing. *Pediatrics.* 2008 Jul;122(1):e107–114.
48. Rogers AJ, Brasch-Andersen C, Ionita-Laza I, Murphy A, Sharma S, Klanderman BJ, et al. The interaction of glutathione S-transferase M1-null variants with tobacco smoke exposure and the development of childhood asthma. *Clin. Exp. Allergy.* 2009 Nov;39(11):1721–9.
49. Palmer CNA, Doney ASF, Lee SP, Murrie I, Ismail T, Macgregor DF, et al. Glutathione S-transferase M1 and P1 genotype, passive smoking, and peak expiratory flow in asthma. *Pediatrics.* 2006 Aug;118(2):710–6.
50. Li Y-F, Tseng P-J, Lin C-C, Hung C-L, Lin S-C, Su W-C, et al. NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferase M1, environmental tobacco smoke exposure, and childhood asthma. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2009 Aug 1;678(1):53–8.
51. Colilla S, Nicolae D, Pluzhnikov A, Blumenthal MN, Beaty TH, Bleecker ER, et al. Evidence for gene-environment interactions in a linkage study of asthma and smoking exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003 Apr;111(4):840–6.
52. Dizier M-H, Bouzigon E, Guilloud-Bataille M, Siroux V, Lemainque A, Boland A, et al. Evidence for gene [times] smoking exposure interactions in a genome-wide linkage screen of asthma and bronchial hyper-responsiveness in EGEA families. *Eur J Hum Genet.* 2007 Apr 11;15(7):810–5.
53. Meyers DA, Postma DS, Stine OC, Koppelman GH, Ampleford EJ, Jongepier H, et al. Genome screen for asthma and bronchial hyperresponsiveness: interactions with passive smoke exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005 Jun;115(6):1169–75.
54. Atkinson RW. Acute effects of air pollution on admissions: reanalysis of APHEA 2. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004 Jun 1;169(11):1257–8.

55. Atkinson RW, Anderson HR, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk JM, et al. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1860–6.
56. Salam MT, Lin P, Avol EL, Gauderman WJ, Gilliland FD. Microsomal epoxide hydrolase, glutathione S- transferase P1, traffic and childhood asthma. *Thorax.* 2007 Dec;62(12):1050–7.
57. Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide derivatives on four asthma-related gene expressions in human bronchial epithelial cells. *Toxicology Letters.* 2007 Dec 10;175(1-3):71–81.
58. Salam MT, Islam T, Gauderman WJ, Gilliland FD. Roles of arginase variants, atopy, and ozone in childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2009 Mar;123(3):596–602.e8.
59. Wenten M, Gauderman WJ, Berhane K, Lin P-C, Peters J, Gilliland FD. Functional Variants in the Catalase and Myeloperoxidase Genes, Ambient Air Pollution, and Respiratory-related School Absences: An Example of Epistasis in Gene-Environment Interactions. *Am J Epidemiol.* 2009 Dec 15;170(12):1494–501.
60. Romieu I, Sienra-Monge J, Ramirez-Aguilar M, Moreno-Macias H, Reyes-Ruiz N, d Estela, et al. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City. *Thorax.* 2004 Jan;59(1):8–10.
61. Romieu I, Ramirez-Aguilar M, Sienra-Monge JJ, Moreno-Macías H, del Rio-Navarro BE, David G, et al. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *European Respiratory Journal.* 2006 Nov 1;28(5):953 – 959.
62. David GL, Romieu I, Sienra-Monge JJ, Collins WJ, Ramirez-Aguilar M, del Rio-Navarro BE, et al. Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Reduced:Quinone Oxidoreductase and Glutathione S-Transferase M1 Polymorphisms and Childhood Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003 Nov 15;168(10):1199–204.
63. Li Y-F, Gauderman WJ, Avol E, Dubeau L, Gilliland FD. Associations of Tumor Necrosis Factor G-308A with Childhood Asthma and Wheezing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 May 1;173(9):970–6.
64. Schroer KT, Biagini Myers JM, Ryan PH, LeMasters GK, Bernstein DI, Villareal M, et al. Associations between Multiple Environmental Exposures and Glutathione S-transferase P1 on Persistent Wheezing in a Birth Cohort. *The Journal of Pediatrics.* 2009 Mar;154(3):401–408.e1.
65. Chen C, Arjomandi M, Tager IB, Holland N, Balmes JR. Effects of antioxidant enzyme polymorphisms on ozone-induced lung function changes. *European Respiratory Journal.* 2007 Oct 1;30(4):677 –683.
66. Islam T, Berhane K, McConnell R, Gauderman WJ, Avol E, Peters JM, et al. Glutathione-S-Transferase (GST) P1, GSTM1, Exercise, Ozone and Asthma Incidence in School Children. *Thorax.* 2009 Mar;64(3):197–202.
67. Lee Y-L, Lin Y-C, Lee Y-C, Wang J-Y, Hsiue T-R, Guo YL. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism and air pollution as interactive risk factors for childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 2004 Nov;34(11):1707–13.

68. Castro-Giner F, Künzli N, Jacquemin B, Forsberg B, de Cid R, Sunyer J, et al. Traffic-Related Air Pollution, Oxidative Stress Genes, and Asthma (ECHRS). *Environ Health Perspect.* 2009 Dec;117(12):1919–24.
69. Lee Y-L, McConnell R, Berhane K, Gilliland FD. Ambient ozone modifies the effect of tumor necrosis factor G-308A on bronchitic symptoms among children with asthma. *Allergy.* 2009 Sep;64(9):1342–8.
70. Yang IA, Holz O, Jorres RA, Magnussen H, Barton SJ, Rodriguez S, et al. Association of Tumor Necrosis Factor- α Polymorphisms and Ozone-induced Change in Lung Function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005 Jan 15;171(2):171–6.
71. Mendy A, Gasana J, Vieira ER, Forno E, Patel J, Kadam P, et al. Endotoxin exposure and childhood wheeze and asthma: a meta-analysis of observational studies. *J Asthma.* 2011 Sep;48(7):685–93.
72. Adler A, Tager I, Quintero DR. Decreased prevalence of asthma among farm-reared children compared with those who are rural but not farm-reared. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005 Jan;115(1):67–73.
73. Ege MJ, Bieli C, Frei R, van Strien RT, Riedler J, Üblagger E, et al. Prenatal farm exposure is related to the expression of receptors of the innate immunity and to atopic sensitization in school-age children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006 Apr;117(4):817–23.
74. Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* 2001 Oct 6;358(9288):1129–33.
75. Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* 2002 Sep 19;347(12):869–77.
76. Wlasiuk G, Vercelli D. The Farm Effect, or: When, What and How a Farming Environment Protects from Asthma and Allergic Disease. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology.* 2012;
77. Romagnani S. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology.* 2004 Jul;112(3):352–63.
78. Sordillo JE, Sharma S, Poon A, Lasky-Su J, Belanger K, Milton DK, et al. Effects of endotoxin exposure on childhood asthma risk are modified by a genetic polymorphism in ACAA1. *BMC Med. Genet.* 2011;12:158.
79. Smit LAM, Siroux V, Bouzigon E, Oryszczyn M-P, Lathrop M, Demenais F, et al. CD14 and Toll-like Receptor Gene Polymorphisms, Country Living, and Asthma in Adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009 Mar 1;179(5):363–8.
80. Bieli C, Eder W, Frei R, Braun-Fahrlander C, Klimecki W, Waser M, et al. A polymorphism in CD14 modifies the effect of farm milk consumption on allergic diseases and CD14 gene expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007 Dec;120(6):1308–15.
81. Hwang B-F, Liu I-P, Huang T-P. Gene–Environment Interaction Between Interleukin-4 Promoter and Molds in Childhood Asthma. *Annals of Epidemiology [Internet].* 2012 Mar [cited 2012 Mar 6]; Available from: [http://www.annalsofepidemiology.org/article/S1047-2797\(12\)00014-2/abstract](http://www.annalsofepidemiology.org/article/S1047-2797(12)00014-2/abstract)

82. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Association between exposure to farming, allergies and genetic variation in CARD4/NOD1. *Allergy*. 2006 Sep;61(9):1117–24.
83. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004 Mar;113(3):482–8.
84. Cartier A, Sastre J. Clinical assessment of occupational asthma and its differential diagnosis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2011 Nov;31(4):717–728, vi.
85. Vandenplas O, Malo J-L. Definitions and types of work-related asthma: a nosological approach. *European Respiratory Journal*. 2003 Apr 1;21(4):706–712.
86. Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2005;172(3):280–305.
87. Vandenplas O. Occupational Asthma: Etiologies and Risk Factors. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011 Jul;3(3):157–67.
88. Bernstein DI. Allergic reactions to workplace allergens. *JAMA*. 1997 Dec 10;278(22):1907–13.
89. van Kampen V, Merget R, Baur X. Occupational airway sensitizers: an overview on the respective literature. *Am. J. Ind. Med*. 2000 Aug;38(2):164–218.
90. Mapp CE. AGENTS, OLD AND NEW, CAUSING OCCUPATIONAL ASTHMA. *Occup Environ Med*. 2001 May;58(5):354–60.
91. Bernstein DI, Wang N, Campo P, Chakraborty R, Smith A, Cartier A, et al. Diisocyanate asthma and gene-environment interactions with IL4RA, CD-14, and IL-13 genes. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2006 Dec;97(6):800–6.
92. Kim S-H, Cho B-Y, Park C-S, Shin E-S, Cho E-Y, Yang E-M, et al. Alpha-T-catenin (CTNNA3) gene was identified as a risk variant for toluene diisocyanate-induced asthma by genome-wide association analysis. *Clinical & Experimental Allergy*. 2009 Feb;39(2):203–12.
93. Mapp C. Glutathione S-transferase GSTP1 is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002 May;109(5):867–72.
94. Bignon JS, Aron Y, Ju LY, Kopferschmitt MC, Garnier R, Mapp C, et al. HLA class II alleles in isocyanate-induced asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1994 Jan;149(1):71–5.
95. Cho HJ, Kim S-H, Kim J-H, Choi H, Son J-K, Hur G-Y, et al. Effect of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms on work-related respiratory symptoms and sensitization to wheat flour in bakery workers. *Annals of allergy asthma immunology official publication of the American College of Allergy Asthma Immunology*. 2011;107(1):57–64.
96. Melén E, Nyberg F, Lindgren CM, Berglind N, Zucchelli M, Nordling E, et al. Interactions between Glutathione S-Transferase P1, Tumor Necrosis Factor, and Traffic-Related Air Pollution for Development of Childhood Allergic Disease. *Environ Health Perspect*. 2008 Aug;116(8):1077–84.
97. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc. Assoc. Am. Physicians*. 1999 Oct;111(5):383–9.
98. Ogata M. Acatlasemia. *Hum. Genet*. 1991 Feb;86(4):331–40.

99. Islam T, McConnell R, Gauderman WJ, Avol E, Peters JM, Gilliland FD. Ozone, Oxidant Defense Genes, and Risk of Asthma during Adolescence. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008 Feb 15;177(4):388–95.
100. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010 Sep 1;501(1):116–23.
101. BERGAMASCHI E, DE PALMA G, MOZZONI P, VANNI S, VETTORI MV, BROECKAERT F, et al. Polymorphism of Quinone-metabolizing Enzymes and Susceptibility to Ozone-induced Acute Effects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001 May 1;163(6):1426–31.
102. Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 1998 Nov 15;336(Pt 1):1–17.
103. Roy-Gagnon M-H, Moreau C, Bherer C, St-Onge P, Sinnett D, Laprise C, et al. Genomic and genealogical investigation of the French Canadian founder population structure. *Hum Genet.* 2011 Jan;129(5):521–31.
104. Templeton AR. The Theory of Speciation VIA the Founder Principle. *Genetics.* 1980 Apr;94(4):1011–38.
105. Moreau C, Vézina H, Labuda D. [Founder effects and genetic variability in Quebec]. *Med Sci (Paris).* 2007 Nov;23(11):1008–13.
106. Robert Choinière, Marc Ferland, Jérôme Martinez, Michel Pageau, Yves Sauvageau. Portrait de santé du Québec et de ses régions 2006 ❑ Des statistiques
rapport national sur l'état de santé de la population du Québec. 2006.
107. Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide on the expressions of MUC5AC and ICAM-1 in airway of asthmatic rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2007 Aug;48(3):284–91.
108. Li R, Meng Z, Xie J. Effects of sulfur dioxide on the expressions of EGF, EGFR, and COX-2 in airway of asthmatic rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2008 May;54(4):748–57.
109. Li R, Meng Z. Effects of SO₂ derivatives on expressions of MUC5AC and IL-13 in human bronchial epithelial cells. *Arch Toxicol.* 2007 May;81(12):867–74.
110. Winterton DL, Kaufman J, Keener CV, Quigley S, Farin FM, Williams PV, et al. Genetic polymorphisms as biomarkers of sensitivity to inhaled sulfur dioxide in subjects with asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 2001 Feb;86(2):232–8.
111. Abramson MJ, Benke GP, Cui J, de Klerk NH, Del Monaco A, Dennekamp M, et al. Is potroom asthma due more to sulphur dioxide than fluoride? An inception cohort study in the Australian aluminium industry. *Occupational and Environmental Medicine.* 2010 Oct 1;67(10):679–685.
112. Taiwo OA, Sircar KD, Slade MD, Cantley LF, Vegso SJ, Rabinowitz PM, et al. Incidence of asthma among aluminum workers. *J. Occup. Environ. Med.* 2006 Mar;48(3):275–82.
113. Barnard C, McBride D, Firth H, Herbison G. Assessing individual employee risk factors for occupational asthma in primary aluminium smelting. *Occup Environ Med.* 2004 Jul;61(7):604–8.
114. Vandenplas O, Delwiche JP, Vanbilsen ML, Joly J, Roosels D. Occupational asthma caused by aluminium welding. *Eur. Respir. J.* 1998 May;11(5):1182–4.

115. Andersson E, Knutsson A, Hagberg S, Nilsson T, Karlsson B, Alfredsson L, et al. Incidence of asthma among workers exposed to sulphur dioxide and other irritant gases. *European Respiratory Journal*. 2006 Apr 1;27(4):720–725.
116. Henneberger PK, Olin A-C, Andersson E, Hagberg S, Torén K. The Incidence of Respiratory Symptoms and Diseases Among Pulp Mill Workers With Peak Exposures to Ozone and Other Irritant Gases*. *Chest*. 2005 Oct 1;128(4):3028–3037.
117. Mirabelli MC, Wing S. Proximity to pulp and paper mills and wheezing symptoms among adolescents in North Carolina. *Environmental Research*. 2006;102(1):96–100.
118. Environment Canada - Air - Pulp and Paper [Internet]. [cited 2011 Sep 13]. Available from: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=CB1E071C-1>
119. Environment Canada - Air - Lumber and Allied Wood Products [Internet]. [cited 2011 Sep 13]. Available from: <http://www.ec.gc.ca/Air/default.asp?lang=En&n=542779CB-1>
120. Environment Canada - Air - Residential Wood Heating [Internet]. [cited 2011 Sep 13]. Available from: <http://www.ec.gc.ca/residentiel-residential/default.asp?lang=En&n=E9FE1750-1>
121. Mykhaylova N, Brook JR. A novel way of preventing and managing allergic disease and asthma: real-time index-based monitoring of environmental factors. *AllerGen Seventh Annual Research Conference: Innovation from cell to society*. 2012 Feb 5;
122. Liu J, Ballaney M, Al-alem U, Quan C, Jin X, Perera F, et al. Combined Inhaled Diesel Exhaust Particles and Allergen Exposure Alter Methylation of T Helper Genes and IgE Production In Vivo. *Toxicol Sci*. 2008 Mar;102(1):76–81.
123. London SJ. Gene–Air Pollution Interactions in Asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2007 Jul;4(3):217–20.
124. 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*. 2010 Sep 23;363(13):1211–21.
125. Kooperberg C, LeBlanc M. Increasing the power of identifying gene × gene interactions in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol*. 2008 Apr;32(3):255–63.
126. Ege MJ, Strachan DP, Cookson WOCM, Moffatt MF, Gut I, Lathrop M, et al. Gene–environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011 Jan;127(1):138–144.e4.
127. Accordini S, Janson C, Svanes C, Jarvis D. The Role of Smoking in Allergy and Asthma: Lessons from the ECRHS. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2012 Apr [cited 2012 Apr 30]; Available from: <http://www.springerlink.com/content/flm6763241244208/>
128. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1987 Jul;136(1):225–44.
129. Wenzel S. Severe asthma: from characteristics to phenotypes to endotypes. *Clinical & Experimental Allergy*. 2012;42(5):650–8.
130. Wong M, Day N, Luan J, Chan K, Wareham N. The detection of gene–environment interaction for continuous traits: should we deal with measurement error by bigger

- studies or better measurement? *International Journal of Epidemiology*. 2003 Feb 1;32(1):51–57.
131. Bono R, Piccioni P, Traversi D, Degan R, Grosa M, Bosello G, et al. Urban air quality and carboxyhemoglobin levels in a group of traffic policemen. *Science of the Total Environment*. 2007;376(1-3):109–15.
 132. Muñoz B, Magaña JJ, Romero-Toledo I, Juárez-Pérez E, López-Moya A, Leyva-García N, et al. The relationship among IL-13, GSTP1, and CYP1A1 polymorphisms and environmental tobacco smoke in a population of children with asthma in Northern Mexico 10.1016/j.etap.2011.12.007 □: Environm
Pharmacology | ScienceDirect.com. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2012 Mar;33(2):226–32.
 133. Schultz EN, Devadason SG, Khoo S-K, Zhang G, Bizzintino JA, Martin AC, et al. The role of GSTP1 polymorphisms and tobacco smoke exposure in children with acute asthma. *J Asthma*. 2010 Sep;1–8.
 134. Matt GE, Hovell MF, Quintana PJE, Zakarian J, Liles S, Meltzer SB, et al. The Variability of Urinary Cotinine Levels in Young Children: Implications for Measuring ETS Exposure. *Nicotine & Tobacco Research*. 2007 Jan 1;9(1):83–92.
 135. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10604–9.
 136. Perera F, Tang W, Herbstman J, Tang D, Levin L, Miller R, et al. Relation of DNA Methylation of 5'-CpG Island of ACSL3 to Transplacental Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Childhood Asthma. *PLoS ONE*. 4(2).
 137. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J. Biochem. Mol. Biol*. 2003 Jan 31;36(1):95–109.
 138. Liu J, Ballaney M, Al-alem U, Quan C, Jin X, Perera F, et al. Combined Inhaled Diesel Exhaust Particles and Allergen Exposure Alter Methylation of T Helper Genes and IgE Production In Vivo. *Toxicol Sci*. 2008 Mar;102(1):76–81.
 139. Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K, Garantzotis S, Li Z, Tomfohr J, et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest*. 2008 Oct 1;118(10):3462–9.
 140. Håberg SE, London SJ, Stigum H, Nafstad P, Nystad W. Folic acid supplements in pregnancy and early childhood respiratory health. *Arch. Dis. Child*. 2009 Mar;94(3):180–4.
 141. Vercelli D. Genetics, epigenetics, and the environment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004 Mar;113(3):381–6.
 142. Miller RL. Prenatal maternal diet affects asthma risk in offspring. *J Clin Invest*. 2008 Oct 1;118(10):3265–8.
 143. Miller RL, Ho S. Environmental Epigenetics and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Mar 15;177(6):567–73.
 144. Kumar RK, Hitchins MP, Foster PS. Epigenetic changes in childhood asthma. *Disease Models & Mechanisms*. November;2(11-12):549–553.
 145. Brand S, Kesper DA, Teich R, Kilic-Niebergall E, Pinkenburg O, Bothur E, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology [Internet]*. 2012

- Jan [cited 2012 Feb 22]; Available from: [http://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(11\)02931-9/abstract](http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(11)02931-9/abstract)
146. Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur. Respir. J.* 2008 Jan;31(1):179–97.
 147. Hahn LW, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene–gene and gene–environment interactions. *Bioinformatics.* 2003 Feb 12;19(3):376–382.
 148. Schmidt M, Hauser ER, Martin ER, Schmidt S. Extension of the SIMLA Package for Generating Pedigrees with Complex Inheritance Patterns: Environmental Covariates, Gene-Gene and Gene-Environment Interaction. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2005;4:Article15–Article15.