

VANESSA T VAILLANCOURT

**ÉTUDE D'ASSOCIATION DES GÈNES IMPLIQUÉS
DANS L'ACTIVITÉ DU GÈNE *IL1R2* AVEC LES
PHÉNOTYPES RELIÉS À L'ASTHME**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures 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 es sciences (M. Sc.).

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

et

DÉPARTEMENT DES SCIENCES HUMAINES
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
SAGUENAY

JANVIER 2012

REMERCIEMENTS

Ce mémoire n'aurait pas pu être possible sans l'appui de plusieurs personnes et je tiens à les remercier personnellement.

Tout d'abord, merci à ma directrice, Catherine. Tu es une personne passionnée, intègre et tu as toujours trouvé du temps pour répondre à mes questions, malgré ton horaire très chargé. Merci pour tes encouragements, pour m'avoir accordé ta confiance et donné un merveilleux projet. Merci de m'avoir permis de voyager pour présenter mes travaux et ainsi vivre de belles expériences. Tu es une source d'inspiration pour moi et j'apprécie le travail en ta compagnie.

Ensuite, je voudrais remercier Anne-Marie pour son aide. Merci à toi pour les nombreuses réponses à mes questions, tes suggestions et les discussions, qu'elles aient pour sujet la science, ou autre chose. Tu es un modèle pour moi et ton enthousiasme rend l'ambiance de travail agréable.

Puis, je tiens à remercier mes amis qui m'ont apporté leur soutien durant ces deux années. Merci à Marie-Hélène, Simon-Pierre, Marianne, Mélissa, pour vos moments de folie en ma compagnie et votre bonne humeur. Un grand merci également à tous mes collègues du laboratoire, spécialement Andréanne, pour sa bonne compagnie ainsi que Valérie et Jessica, sans qui les journées seraient moins enjouées.

Je veux également remercier mon conjoint, Jérôme. Merci pour ton support dans les moments de découragements et tes précieux conseils. Ta sagesse et ton calme m'ont rassurée dans les situations difficiles.

Enfin, je remercie mes parents et les membres de ma famille pour leurs bons mots et leur intérêt envers mes études.

À mes plus grands admirateurs,

Brigitte et Mario

RÉSUMÉ

Les gènes ayant une activité biologique en lien avec le gène du récepteur de type 2 de l'interleukine 1 (*IL1R2*) sont des déterminants génétiques de l'asthme allergique

L'asthme est une maladie chronique des voies respiratoires qui se traduit par une hyperactivité, une obstruction bronchique et un remodelage. Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sous-tendent le développement de cette maladie. En effet, plus de 300 gènes ont été jusqu'à présent associés à l'asthme. Dans ce mémoire, il sera question de certains de ces gènes associés avec les phénotypes reliés à l'asthme et qui sont en lien avec les activités du gène du récepteur de type 2 de l'interleukine 1 (*IL1R2*). Le gène *IL1R2* est différemment exprimé dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques comparativement aux sujets témoins et a également été associé avec l'atopie. Un criblage pangénomique (GWAS) a été réalisé sur cinq études d'asthme indépendantes (SLSJ, EGEA, CAPPS, SAGE et BUSSELTON) afin d'identifier des polymorphismes associés aux différents phénotypes reliés à l'asthme. Sept gènes ont été associés: *beta-site APP-cleaving enzyme-1 (BACE1)* et la métalloprotéinase 2 (*MMP2*) avec l'asthme et l'asthme allergique, *spleen focus forming virus proviral integration oncogene (SPII)* avec l'atopie et l'asthme atopique, *endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP1)* avec l'asthme allergique, *interleukin 1 receptor accessory protein (IL1RAP)* et *interleukin 1 alpha (IL1A)* avec l'atopie, et le gène *interleukin 1 receptor type 1 (IL1R1)* avec l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique. Ces résultats soulignent l'importance du rôle d'*IL1R2* dans l'asthme et suggèrent qu'il serait pertinent de mieux caractériser sa voie biologique à l'aide d'études génétiques fonctionnelles afin d'avoir une meilleure connaissance du rôle d'*IL1R2* dans la physiopathologie de l'asthme.

AVANT-PROPOS

Le premier chapitre de ce mémoire se divise en trois sections. Il est consacré à la description du phénotype et de la génétique de l'asthme ainsi qu'à la description de la famille du gène de l'interleukine 1, dont fait partie le récepteur de type deux, le sujet principal de l'article du chapitre 2. En effet, le deuxième chapitre de ce mémoire est tiré de l'article : "Genes involved in interleukin-1 receptor type II (*IL1R2*) activities are genetic determinants of allergic asthma" Vanessa T. Vaillancourt, Denise Daley, Julie E. Park, Andrew Sandford, Allan Becker, Anita L. Kozyrskyj, Alan L. James, Arthur W Musk, Florent Monier, Peter Paré, Thomas J. Hudson, Emmanuelle Bouzigon, Florence Demenais, and Catherine Laprise.

J'ai réalisé les analyses d'association pour l'étude familiale du Saguenay–Lac-St-Jean (SLSJ) et rédigé le manuscrit. Denise Daley et Julie E. Park ont réalisé les études d'association pour les échantillons de *The Canadian Asthma Primary Prevention Study* (CAPPS) et *The Study of Asthma Genes and the Environment* (SAGE). Andrew Sandford et Peter Paré sont les principaux chercheurs de la cohorte CAPPS. Allan Becker, Anita L. Kozyrskyj, sont les responsables de l'échantillon SAGE et Alan L. James et Arthur W Musk sont les principaux chercheurs de l'échantillon Busselton. Emmanuelle Bouzigon et Florence Demenais sont les principales chercheuses de l'échantillon *Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma* (EGEA) et Florent Monier a réalisé les études d'association pour cet échantillon. Catherine Laprise et Thomas J. Hudson sont les chercheurs responsables de la collection familiale du SLSJ. Catherine Laprise a également effectué le design de l'étude et a dirigé toutes les étapes menant à la réalisation de l'article.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
RÉSUMÉ	III
AVANT-PROPOS.....	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	X
CHAPITRE 1:.....	2
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	2
1 COMPOSANTE PHÉNOTYPIQUE.....	3
1.1 Prévalence et définition.....	3
1.2 Les phénotypes de l’asthme	3
1.3 Facteurs environnementaux	5
1.4 Physiopathologie.....	6
2 COMPOSANTE GÉNÉTIQUE	9
2.1 Approches méthodologiques.....	9
2.2 Choix de la population	11
2.3 Génétique de l’asthme.....	12

3	RÉCEPTEUR DE TYPE II DE L'INTERLEUKINE 1	14
3.1	La famille de l'interleukine 1	14
3.1.1	Interleukines et cytokines	14
3.1.2	Les partenaires de l'interleukine 1	14
3.1.3	Les rôles de l'interleukine 1	16
3.1.4	Implication dans des pathologies	16
3.2	Les récepteurs de l'interleukine 1	17
4	HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	22
	CHAPITRE 2:	23
	POLYMORPHISMS WITHIN GENES INVOLVED INTERLEUKIN-1 RECEPTOR TYPE II (IL1R2) ACTIVITIES ARE ASSOCIATED WITH ALLERGIC ASTHMA	23
	RÉSUMÉ	24
	GENES INVOLVED IN INTERLEUKIN-1 RECEPTOR TYPE II (<i>IL1R2</i>) ACTIVITIES ARE GENETIC DETERMINANTS OF ALLERGIC ASTHMA	25
	ABSTRACT	26
	INTRODUCTION	28
	METHODS	30
	Phenotypes	30
	Samples	30
	Genes and SNPs selection	31
	Statistical analysis	32
	RESULTS	33
	DISCUSSION	34
	ACKNOWLEDGMENTS	38
	REFERENCES	40
	ENDOPLASMIC RETICULUM AMINOPEPTIDASE 1 (<i>ERAP1</i>)	46
	CHAPITRE 3:	57

DISCUSSION GÉNÉRALE	57
4.1 Absence de réplication stricte.....	58
4.1.1 Origine de l'échantillon	58
4.1.2 Type d'échantillon.....	59
4.1.3 Phénotype	59
4.1.4 Statistiques.....	61
4.2 Interprétation générale	62
4.3 Perspectives.....	62
RÉFÉRENCES.....	64

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Représentation schématique des principaux mécanismes de remodelage des voies respiratoires des sujets asthmatiques ainsi que des principales cellules structurales et inflammatoires impliquées.....	7
Figure 2 Représentation graphique des différents types d'études avec leurs forces (+) et leurs faiblesses (-).....	12
Figure 3 Représentation graphique des différents rôles de l'interleukine 1	15
Figure 4 Représentation graphique de la structure des récepteurs de l'interleukine 1	18
Figure 5 Représentation graphique de la structure du gène <i>IL1R2</i> et localisation du SNP rs740044	21
Figure 6 Schema of the proteins involved in the <i>IL1R2</i> gene activities analyzed in this study.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Characteristics and distribution of the studied phenotypes in the samples.....	43
Tableau 2 Involvement of the selected genes on <i>IL1R2</i> activities.....	45
Tableau 3 Significant associations with asthma	46
Tableau 4 Significant associations with atopy.....	47
Tableau 5 Significant associations with allergic asthma	48
Tableau 6 Significant associations before correction with asthma.....	49
Tableau 7 Significant associations before correction with atopy	51
Tableau 8 Significant associations before correction with allergic asthma.....	53

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique
 ADRB2 : Récepteur adrénergique de type beta 2
 ALOX15 : Lipoxigénase arachidonate 15
 ARN : Acide ribonucléique
 ARNm: Acide ribonucléique messenger
 BACE : *Beta-site APP cleaving enzyme*
 CAPPS : *The Canadian Asthma Primary Prevention Study*
 CASP1 : Caspase 1
 COL1A1 : Collagène de type 1 alpha 1
 COPD : Maladie chronique obstructive des poumons
 EGEA : *The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma*
 ERAP1 : Aminopeptidase 1 du réticulum endoplasmique
 FBAT : *Family based association test*
 FOX3P : *Forkhead box P3*
 GWAS : *Genome wide association study*
 HLA-DRB1 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2, DR, beta 1
 HRB : Hyperréactivité bronchique
 HSPD1 : *Heat shock 60 kDa protein 1*
 ICE : *Interleukine 1 converting enzyme*
 IFNG : Interferon gamma
 Ig : Immunoglobuline
 IL : Interleukine
 IL1A : Interleukine 1 alpha
 IL1B : Interleukine 1 beta
 IL1R : Récepteur de l'interleukine
 L1RA : Antagoniste du récepteur de l'interleukine 1
 IL1RAP : Protéine accessoire du récepteur de l'interleukine 1
 IL1RL1 : *Interleukine 1 receptor like 1*
 IL1RN : Récepteur antagoniste de l'interleukine 1
 IL4R : Récepteur de l'interleukine 4
 IRAK : *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*
 Kb : Kilobase
 kDa : Kilodalton
 MEC : Matrice extracellulaire
 MMP : Métalloprotéinase
 MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene (88)*
 PCR : Réaction de polymérase en chaîne
 PRNP : Protéine prion
 SAGE : *The Study of Asthma Genes and the Environment*
 SERPINH1 : *Serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1*
 SLSJ : Saguenay–Lac-Saint-Jean
 SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide
 SPI1 : *Spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1*
 TAB: *TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein*

TAK1: *TGF-beta activated kinase 1*

TNF : *Tumor necrosis factor*

TRAF6: *TNF receptor-associated factor 6*

CHAPITRE 1:

Introduction générale

1 Composante phénotypique

1.1 Prévalence et définition

L'asthme est une maladie respiratoire touchant les enfants ainsi que les adultes et ayant une morbidité et une mortalité de plus en plus élevée mondialement. [1, 2] En 2004, sur l'ensemble du globe, environ 300 millions de personnes souffraient d'asthme. [3] En 2008, au Canada seulement, on retrouvait plus de deux millions d'asthmatiques de 12 ans et plus. [4] Selon le dernier rapport de *Global Initiative for Asthma*, la prévalence de l'asthme dans la population d'Amérique du Nord était de 11,2 %, soit l'un des plus hauts au monde. [3] Les médicaments utilisés pour traiter l'asthme génèrent des revenus de plus de cinq milliards de dollars par année mondialement. En ce qui concerne la physiopathologie, l'asthme est une maladie du système respiratoire caractérisée par trois éléments clés. Il s'agit de l'obstruction et de l'inflammation des voies aériennes, ainsi que de l'hyperactivité bronchique (HRB). [5] Les symptômes cliniques sont la dyspnée, la toux ainsi que le sifflement lors de la respiration due à la diminution de la lumière des voies respiratoires. [2] L'asthme est un trait complexe, ce qui signifie que plusieurs facteurs génétiques et environnementaux interviennent et interagissent dans le développement et la manifestation clinique de la maladie. [6] Cette notion de trait complexe explique pourquoi il existe plusieurs phénotypes différents et une sévérité variable chez les sujets asthmatiques.

1.2 Les phénotypes de l'asthme

Les classifications des phénotypes de l'asthme sont variables, certaines se basent sur les symptômes, d'autres sur les cellules inflammatoires. Handoyo *et al.* ont proposé pas moins de huit phénotypes d'asthme. Entre autres, l'asthme atopique, l'asthme à l'effort, l'asthme sévère et l'asthme à prédominance de médiateurs inflammatoires. [7] La communauté scientifique tente donc de préciser et de classer les sous phénotypes reliés à l'asthme. Certains amènent une classification basée sur le type cellulaire impliqué dans la réponse immunitaire. À titre d'exemple, l'asthme neutrophilique correspond à l'asthme où l'on retrouve une forte production de neutrophiles en réponse au stimulus. [8] Malgré ces

efforts, il reste encore beaucoup de travail à faire pour établir une meilleure classification. Dans le contexte de ce mémoire, deux principaux types d'asthme seront traités, soit l'asthme allergique (aussi appelé asthme atopique) et l'asthme non allergique. La différence entre les deux types d'asthme réside dans ce qui déclenche la réponse immunitaire. Chez les asthmatiques allergiques, c'est un allergène, par exemple la poussière ou les animaux (protéines souvent sécrétées au niveau de la peau de l'animal), qui déclenche la réponse immunitaire. [9] Cette forme d'asthme touche 80 % des enfants asthmatiques et de 40 à 50 % des adultes asthmatiques. [10] Dans le cas de l'asthme non allergique, la réponse immunitaire est déclenchée par un facteur autre qu'un allergène, par exemple un effort physique ou l'air froid, et il n'y a pas de stimulus spécifique. [7]

L'asthme allergique, provoqué par une hyperréactivité, se subdivise en deux endotypes, soit l'asthme allergique médié par les immunoglobulines de type E (IgE) et l'asthme allergique non médié par les IgE. [9] Les IgE se retrouvent sur les basophiles et surtout sur les mastocytes localisés dans les voies aériennes supérieures et dans les bronches. Elles jouent un rôle dans la réponse immunitaire face aux helminthes et sont souvent associées aux réactions d'hypersensibilité, comme l'asthme. [11] Dans l'asthme allergique, il existe également deux types de réponses à l'allergène, la réponse immédiate, la réponse retardée et ceux qui présentent les deux types de réponses (immédiate et retardée). [12] La réponse immédiate implique une réexposition à un allergène, ce qui déclenche dans l'heure des symptômes tels que des démangeaisons, un sifflement et une toux. La réponse retardée débute au même moment que la réponse immédiate, seulement les symptômes apparaissent de 3 à 9 heures plus tard. Elle est présente chez 50% des adultes et 75% des enfants atteints d'asthme allergique. [13]

La sévérité de l'asthme varie selon plusieurs facteurs tels que le sexe et l'âge. En effet, on retrouve chez les enfants de moins de 13 ans une plus grande incidence et prévalence chez les garçons et l'asthme est plus sévère, alors qu'à la puberté cette tendance s'inverse. [14, 15] À l'âge adulte, l'asthme est plus sévère chez les sujets de sexe féminin. [16] Il y a également plus d'hospitalisations et de réadmissions pour les femmes,

et les séjours à l'hôpital sont plus longs et les rémissions plus lentes. [17] Malgré tout, la notion de phénotype reste vague.

1.3 Facteurs environnementaux

Comme mentionné précédemment, ce sont les interactions entre les gènes (G X G) et entre les gènes et l'environnement (G X E) qui influencent la susceptibilité à l'asthme. Plusieurs types de composantes présentes dans l'environnement peuvent influencer le développement de l'asthme à travers leurs effets sur la génétique. La pollution de l'air extérieur et intérieur et les allergènes tels que les squames d'animaux, le pollen et la poussière en sont quelques exemples. [18-20] Le milieu de travail constitue aussi un élément à considérer puisque les substances volatiles présentes dans l'air peuvent prédisposer l'individu à l'apparition de l'asthme. Par exemple, les peintres sont exposés aux isocyanates et les individus utilisant des produits de nettoyage chimiques voient augmenter leur risque de développer l'asthme. [21] Ces facteurs peuvent s'annuler (antagoniste) ou s'amplifier l'un et l'autre (synergie).

De plus, chacun peut avoir un impact différent d'une personne à l'autre. Par exemple, l'exposition aux chats et les infections virales durant l'enfance peuvent avoir un rôle de protection chez certains et d'augmentation du risque de développer l'asthme chez d'autres individus. [22-24] L'hypothèse de l'hygiène est d'ailleurs basée sur cette observation. En effet, l'exposition à des allergènes durant l'enfance force le système immunitaire à être actif et efficace alors que la grande utilisation de détergents antibactériens, d'antibiotiques, de médicaments à grand spectre diminue l'exposition à des bactéries et rend le système immunitaire moins alerte. L'influence de l'environnement sur les gènes est plus particulièrement observable grâce aux études avec des jumeaux monozygotes. [25] En effet, il existe différents phénotypes et niveaux de sévérité d'asthme chez deux personnes partageant exactement le même ADN. Cette différence peut être causée par une modification de l'ADN par l'environnement (signaux épigénétiques), dont les principaux reconnus sont les méthylations (ajout d'un groupement méthyl sur des sites où une cytosine précède une guanine – îlots CpG), les changements dans l'enroulement des histones et les petits ARN interférents. [26] Il existe également des prédispositions qui

favorisent l'apparition de l'asthme. L'atopie, par exemple, correspond à une prédisposition que possède l'organisme à produire un taux d'IgE plus élevé que la normale suite à une exposition à un allergène. Cette hypersensibilité mène donc à une réponse du système immunitaire exagérée et augmente les risques de développer l'asthme. [9]

1.4 Physiopathologie

La physiopathologie de l'asthme est complexe, mais bien décrite dans plusieurs ouvrages. Pour ce qui est de ce mémoire, les principaux aspects traités seront l'inflammation et le remodelage puisque c'est dans ce processus que le gène d'intérêt traité, *IL1R2*, est le plus grandement impliqué.

L'activation et la migration des cellules inflammatoires, comme les CD4+, les éosinophiles, les neutrophiles et les mastocytes, à travers la membrane basale jusqu'au site de réaction dans la muqueuse des voies respiratoires, amènent un changement physiologique constant chez les asthmatiques : le remodelage des voies respiratoires. [27-30] Ce remodelage est défini par plusieurs caractéristiques illustrées dans la figure 1, soit une perte de l'intégrité de l'épithélium, un épaissement de la membrane basale, une fibrose sous-épithéliale, une hypertrophie des cellules caliciformes à mucus et des glandes de la sous-muqueuse ainsi qu'une augmentation de la masse du muscle lisse et de la vascularisation. [31-35]

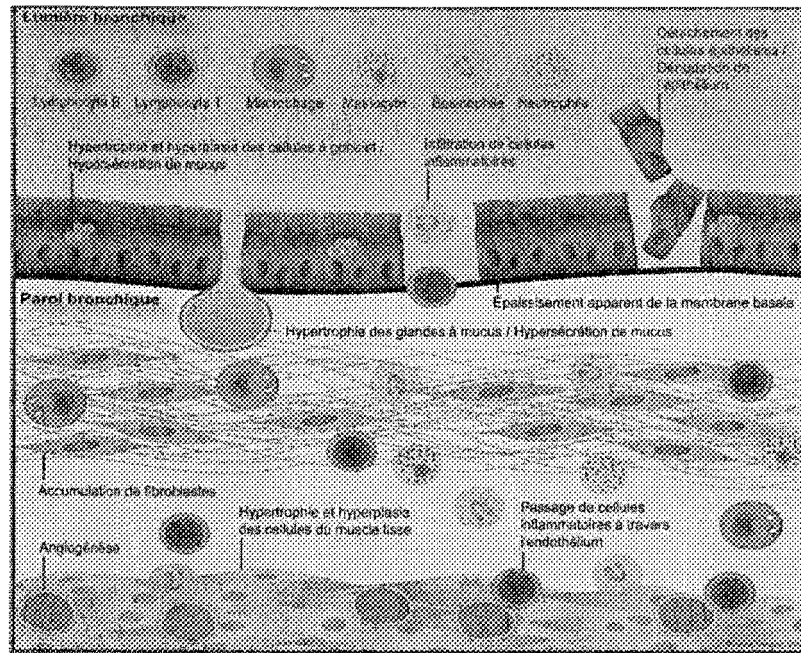


Figure 1 Représentation schématique des principaux mécanismes de remodelage des voies respiratoires des sujets asthmatiques ainsi que des principales cellules structurales et inflammatoires impliquées

Le remodelage entraîne plusieurs modifications des voies respiratoires. Tout d'abord, il y a un recrutement et une infiltration de cellules inflammatoires dans la paroi bronchique. Puis, surviennent de nombreux changements de la paroi bronchique, de l'épithélium, ou encore du muscle lisse. Par exemple, une perte de l'intégrité de l'épithélium, un épaississement de la membrane basale, une fibrose sous-épithéliale, une hypertrophie des cellules caliciformes à mucus et des glandes de la sous-muqueuse ainsi qu'une augmentation de la masse du muscle lisse et de la vascularisation. (Figure tirée de la thèse de doctorat de Karine Tremblay [36])

L'intégrité de l'épithélium est modifiée par la diminution du nombre de cellules ciliées, l'hyperplasie des cellules caliciformes à mucus, la desquamation de l'épithélium ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance. [31, 35, 37, 38] Cette perte d'intégrité diminue également la capacité de protection contre les particules inhalées comme les allergènes. [39] Cette diminution de la surface de l'épithélium des voies respiratoires provoque une hausse de l'HRB et donc prédispose l'individu à développer l'asthme. [39] La membrane basale réticulaire (*lamina reticularis*) peut subir un épaississement, ce qui

augmente la rigidité et rend la membrane moins souple lors de la contraction des muscles lisses, amenant ainsi encore une fois une HRB. [40] L'épaississement ne constitue toutefois pas une barrière contre la migration des cellules inflammatoires puisqu'elles la traversent facilement. [40] On retrouve également la fibrose sous-épithéliale parmi les modifications de la membrane basale entraînées par la réaction asthmatique. Cette fibrose est provoquée par un dépôt excessif de protéines provenant de la matrice extracellulaire (MEC), par exemple le collagène (type I, III et V) et la fibronectine. [33, 34, 41] En effet, on retrouve souvent un déséquilibre entre la production et la dégradation des protéines de la MEC chez les asthmatiques. [42, 43] Les métalloprotéinases (MMP) participent au maintien de cette équilibre puisqu'elles jouent entre autres un rôle dans la dégradation du collagène. Plusieurs travaux ont déjà relié les MMP2, 3, 8 et 9 à l'asthme et à l'inflammation des voies respiratoires par l'entremise de leur rôle sur la migration des éosinophiles et l'hyperplasie des muscles lisses. [44-48] La MMP9 est d'ailleurs retrouvée en plus grande quantité dans les expectorations des asthmatiques et sa concentration est corrélée avec la sévérité de la maladie. [46, 48, 49]

Un autre phénomène observable lors du remodelage est l'augmentation du volume ainsi que du nombre de cellules du muscle lisse présent dans les voies respiratoires. Ces cellules participent au processus d'inflammation en sécrétant des chimiokines, des cytokines ainsi que des protéines de la MEC. [50, 51] Des expérimentations *in vitro* ont permis de démontrer que les chimiokines induisent la migration des cellules du muscle lisse jusqu'à la zone sous-épithéliale et augmentent leur contractilité. [52] L'augmentation de la taille des glandes de la sous-muqueuse et des cellules caliciformes à mucus présentent dans les voies respiratoires est une autre caractéristique du remodelage. [29, 40] Les glandes sécrètent donc plus de mucus ce qui réduit la lumière des voies respiratoires. [35] Cette activation des différentes composantes des voies respiratoires est directement reliée à la sévérité de l'asthme, et ce fait est bien démontré, entre autres, grâce aux travaux de James et ses collègues. [53] En effet, il a observé que la masse des voies respiratoires des sujets décédés à la suite d'un *status asthmaticus* ou asthme sévère était de 50 à 300 % plus élevée que chez les sujets décédés d'une autre cause non liée à la santé respiratoire, alors que les

individus atteints d'asthme léger à modéré présentaient des bronches ayant une masse de 10 à 100 % plus élevée. [34, 53]

2 Composante génétique

2.1 Approches méthodologiques

L'asthme est considéré comme une maladie polygénique, ce qui signifie que plusieurs gènes sont inclus dans les divers mécanismes menant au développement des différents phénotypes de la maladie. Il existe plusieurs types d'approches méthodologiques lorsque l'on tente de relier des gènes à une maladie. La première est l'approche par gènes candidats qui consiste à établir une liste de gènes susceptibles d'être impliqués dans la maladie en raison de leur rôle biologique naturel et de réaliser une étude d'association génétique. [54] Cette méthode est utilisée pour identifier des gènes avec des allèles fréquents et à effet mineur, mais elle est inefficace pour identifier des gènes ayant un rôle insoupçonné dans la maladie. [54, 55] La méthode par voie biologique ressemble beaucoup à l'approche par gènes candidats, mais contrairement à cette approche, les gènes choisis ont un lien biologique entre eux. Dans l'approche par voie biologique, tel qu'utilisée entre autres par Bossé *et al.*, le gène de départ est choisi également selon les études précédentes, mais les autres gènes sont sélectionnés par la suite selon leur lien biologique avec ce premier gène. [56, 57] Cette technique permet donc d'identifier une voie biologique importante dans un trait et non pas seulement un gène en particulier. Les autres avantages de celle-ci seront traités dans la section discussion.

La deuxième approche est l'étude pangénomique aussi appelée *genome wide association study* (GWAS). Le GWAS consiste à génotyper un très grand nombre de polymorphismes (SNP) chez un très grand nombre de sujets afin d'identifier des associations possibles entre des variants génétiques et une maladie ou encore une caractéristique d'un trait (par exemple le taux d'éosinophiles ou le volume expiratoire forcé). [58, 59] Cette méthode ne nécessite pas d'hypothèse ni de réflexion biologique au départ, une très grande quantité de *loci* sont inclus dans l'analyse sans nécessairement être suspectés d'être impliqués dans la maladie. [54] Cette méthode possède une grande

puissance statistique en raison de la taille de l'échantillon, mais implique l'analyse d'allèles couverts par un ensemble de SNP marqueurs ou TagSNP, c'est-à-dire un SNP qui représente une région du génome comportant un fort déséquilibre de liaison, ou d'un haplotype seulement. Ainsi, les interactions entre différents allèles ou entre différents SNP ne sont que rarement analysées. [60] De plus, la grande taille de l'échantillon amène une correction pour analyses multiples très conservatrice et les gènes à effet mineur présents dans des physiopathologies comme l'asthme peuvent passer inaperçus.

Le clonage positionnel est une autre méthode utilisée afin d'identifier des gènes responsables d'un trait en particulier. Elle est de mise lorsqu'on connaît seulement la région chromosomique approximative du gène ou de la mutation qui est associée à un phénotype particulier. Elle fait généralement suite à des études de type GWAS ou encore à une étude de liaison génomique où un *locus* précis a été identifié. [61] On peut donc par la suite procéder au génotypage de cette région jusqu'au moment où la position exacte du gène ou de la mutation est identifiée.

Il y a également l'étude d'expression qui est couramment employée dans l'objectif d'identifier de nouvelles pistes de recherche pour des études fonctionnelles. La transcription, la stabilité de l'ARN messenger, la traduction ou encore l'épissage sont toutes des étapes susceptibles d'entraîner une variabilité de l'expression génétique. [59] Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'ARN messenger (ARNm) des gènes d'intérêt dans un type cellulaire ou encore un tissu en particulier et de comparer, par exemple, les niveaux d'ARNm entre des sujets atteints et des sujets contrôles ou encore avant et après traitement pour vérifier l'efficacité d'une molécule thérapeutique. [62] Plusieurs outils sont offerts afin d'y parvenir. Par exemple, le PCR en temps réel permet de cibler quelques gènes alors que les micropuces permettent de mesurer l'expression de milliers de gènes en même temps. Ce type d'étude fait l'objet de plusieurs articles et de nombreux gènes ont été identifiés comme étant plus ou moins exprimés chez les asthmatiques. [62-66]

2.2 Choix de la population

Les études génétiques de type GWAS, gènes candidats ou encore par voie biologique peuvent être réalisées grâce à un échantillon de cas-témoin ou encore d'échantillons composés de gens apparentés (familles ou couples de jumeaux). Les stratégies d'études faisant appel à des cas-témoins sont sans aucun doute les plus fréquemment utilisées puisqu'il est plus facile de recruter les individus et les analyses sont relativement simples. [67] Dans ce type d'étude, on compare la fréquence d'un allèle de susceptibilité ou encore de protection entre les personnes atteintes et les non-atteintes en effectuant des test de Student ou encore des ANOVA. Dans les travaux en génétique de l'asthme certains échantillons de ce type sont bien documentés, Busselton (Australie), CAPPS (*The Canadian Asthma Primary Prevention Study*), et ECRHS (*European Community Respiratory Health Survey*). [68-70] Les résultats obtenus grâce aux études de cas-témoins semblent difficiles à répliquer dans d'autres populations. [71] De plus, il est préférable d'apparier les sujets pour différents facteurs tels que l'âge et le sexe, afin de limiter leur effet confondant sur les résultats de l'étude, ce qui peut rendre difficile le recrutement. Toutefois, cette méthode est plus rapide et moins couteuse que l'approche familiale. En effet, une personne est plus facile à recruter qu'une famille entière. [54] Les collections familiales sont souvent composées de trios, comprenant les parents (au moins un des deux hétérozygotes pour l'allèle en question) ainsi que leur enfant atteint. Dans certaines études, comme l'étude EGEA (*The Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma*) ou la collection familiale du SLSJ (Saguenay—Lac-St-Jean) [72, 73], on retrouve la famille élargie. De plus, l'étude SLSJ compte plusieurs familles avec des sujets répartis sur plusieurs générations. Ce type d'échantillons permet de comparer la transmission d'un allèle spécifique entre les enfants atteints et non atteints avec la valeur théorique, soit 50 %. Ainsi, un allèle qui serait plus transmis aux enfants atteints, serait un allèle de susceptibilité et serait associé à la maladie. Cette méthode est très efficace pour détecter des gènes ayant des allèles à faible fréquence et haute pénétrance avec de grands effets sur le phénotype, mais n'est pas suffisamment puissante pour détecter des gènes ayant des allèles à fréquence plus élevée et à effet moindre. [54] La méthode par familles

possède un avantage sur celle du cas-témoin puisqu'elle n'est pas sensible à la stratification de la population. [67]

Gènes candidats	Vole biologique	GWAS	Clonage positionnel	Expression
Cas-Témoins ou Familial	Cas-Témoins ou Familial	Cas-Témoins	Cas-Témoins ou Familial	Cas-Témoins, jumeaux
+ Identifie des gènes avec des allèles fréquents et à moindre effet	+ Identifie des gènes inattendus	+ Identifie un grand nombre de gènes	+ Criblage plus fin	+ Permet de mieux comprendre le rôle d'un SNP
- Inefficace pour identifier gènes ayant un rôle insoupçonné dans la maladie	- Moins reconnu, correction plus sévère	- Correction sévère, perte d'information pertinente, coûteux	- Doit être jumelé à un autre type d'étude	- Diffère selon le tissu, variabilité intra-individuel

Figure 2 Représentation graphique des différents types d'études avec leurs forces (+) et leurs faiblesses (-)

La figure ci-dessus présente les différents types d'étude avec leurs avantages et désavantages. De plus, il est possible d'y voir le type d'échantillon optimal pour chacun des types. Par exemple, une étude de type GWAS est optimale avec un échantillon de type cas-témoins. Il est donc important de bien choisir sa méthodologie selon notre hypothèse de départ et ce que l'on veut vérifier.

2.3 Génétique de l'asthme

Grâce à toutes ces formes d'études, de nombreux gènes à effet mineur impliqués dans la physiopathologie de l'asthme ont pu être identifiés. [74] Ce n'est pas moins de 300 gènes qui ont été associés avec l'asthme et les allergies jusqu'à maintenant. [58] Une revue exhaustive des travaux réalisés en génétique de l'asthme permet de constater que 18 études de liaisons indépendantes ont permis de lier 16 régions chromosomiques à l'asthme ou aux conditions qui sont reliées à l'asthme. [75] De plus, à ce jour, la synthèse d'une centaine d'études par gènes candidats, analyses de liaisons, GWAS et d'expression, ont permis d'identifier plus de 61 gènes associés à l'asthme ou à ses phénotypes dans au moins cinq études indépendantes. [76, 77] Les chromosomes 2, 5, 6, 12 et 13 contiennent la majorité de ces gènes associés. [58, 78] Les gènes codant pour le récepteur de l'interleukine 4 (*IL4*),

13 (*IL13*) et 18 (*IL18*) ainsi que la métalloprotéinase 33 (*ADAM33*) et le facteur de nécrose tumoral alpha (*TNF*) sont les gènes les plus connus qui ont été associés avec l'asthme ou ses sous-phénotypes. [79] Quant aux gènes les plus fréquemment associés, *ADRB2*, *HLA-DRB1*, *IL4R*, *ALOX15*, *HSPD1*, *PRNP* et *SERPINH1* ont été associés dans au moins 30 études indépendantes. [58, 77]

3 Récepteur de type II de l'interleukine 1

3.1 La famille de l'interleukine 1

3.1.1 *Interleukines et cytokines*

L'interleukine est un type de molécule appartenant à la famille des cytokines. Les cytokines sont des molécules solubles pléiotropes qui sont sécrétées principalement par les macrophages, les monocytes et les lymphocytes, mais également par les cellules endothéliales et épithéliales. Elles sont rapidement dégradées et ont donc une courte demi-vie. [5] Elles jouent un rôle dans plusieurs aspects du système immunitaire, notamment dans la division, la différenciation et l'activation des différents types cellulaires ainsi que dans l'inflammation. [11] Une cytokine peut agir sur la cellule qui l'a sécrétée, sur une autre cellule ou encore en synergie avec d'autres cytokines. Les cellules cibles possèdent des récepteurs spécifiques à leur cytokine sur la surface membranaire et cette dernière s'y lie avec une haute affinité. [28] Lorsque les cytokines sont capables de chimiotactisme, i.e de stimuler le déplacement de certains types cellulaires (attraction ou répulsion) en fonction d'un gradient chimique, elles sont appelées chimiokines alors que lorsqu'elles transmettent les signaux entre les diverses cellules du système immunitaire, elles portent le nom d'interleukines. Les interleukines forment un groupe de plus de 25 membres, dont l'interleukine 1 (IL1), qui facilitent la voie Th1, Th2 ou Th17 et guident ainsi la réponse immunitaire. [80]

3.1.2 *Les partenaires de l'interleukine 1*

On compte trois membres dans la famille des gènes de l'*IL1*, soit les agonistes interleukine 1 alpha (*IL1A*) et beta (*IL1B*) ainsi que le récepteur antagoniste (*IL1RA*). L'homologie entre la structure des trois gènes suppose qu'ils proviennent d'un gène commun présent il y a 350 millions d'années. [81] L'IL1 est une cytokine sécrétée par les macrophages, monocytes, lymphocytes et les cellules endothéliales. [82] Plusieurs facteurs peuvent provoquer sa sécrétion, entre autres les endotoxines bactériennes, les virus, les antigènes et d'autres cytokines. [83] L'IL1 joue un rôle dans la prolifération et la

différenciation des lymphocytes T et B, des macrophages, des fibroblastes, des ostéoblastes et des cellules épithéliales (voir figure 3). Cette interleukine est présente sous deux formes, IL1 α et IL1 β (codés par les gènes *IL1A* et *IL1B* respectivement). IL1 α se trouve à la membrane cellulaire alors que l'IL1 β est extracellulaire. La région promotrice du gène *IL1B* contient un motif TATA, retrouvé habituellement sur les gènes inductibles, contrairement à *IL1A* qui est induit grâce à une région de 4,2 kDa au début de sa séquence ainsi qu'une région promotrice centrale. [84] Ces deux formes de IL1 sont d'abord produites sous forme de précurseurs de 31 kDa appelés pro-IL1 α et pro-IL1 β . La pro-IL1 α est produite en association avec le cytosquelette d'actine et est biologiquement active. [85] Elle produit la forme mature de la protéine en étant clivée par la protéinase de type *calpain*. [81] Ce clivage peut être accéléré par les ions calcium. [86] Après la traduction, la pro-IL1 α reste dans le cytosol, peut subir une myristoylation (5 %) (une modification post-transcriptionnelle), et être acheminée à la membrane, mais n'est pas emmagasinée dans une organelle quelconque. [81, 87] La pro-IL1 β quant à elle, est inactive biologiquement et doit être clivée par la caspase-1, aussi appelée *IL1 converting enzyme* (ICE), afin d'être active. [83] La pro-IL1 β est retrouvée dans le cytosol et est transportée à la membrane lorsqu'elle est clivée puis myristoylée. [81]

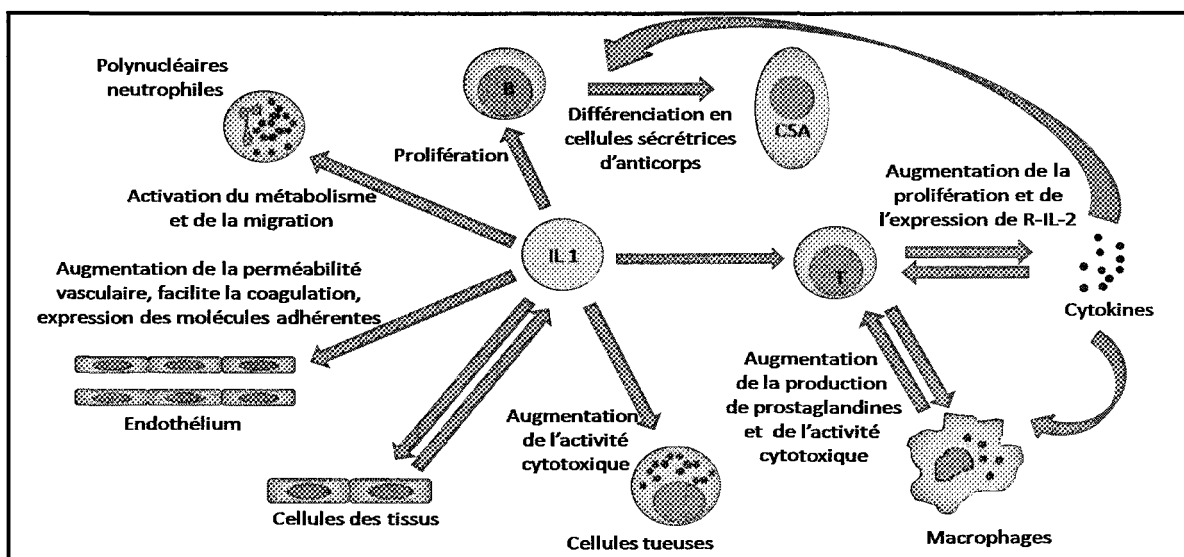


Figure 3 Représentation graphique des différents rôles de l'interleukine 1

La figure ci-dessus présente les différents effets de l'interleukine 1. Elle agit sur plusieurs phénomènes et plusieurs types cellulaires. Entre autres, elle augmente la cytotoxicité par l'entremise des cellules tueuses et des macrophages et favorise la prolifération des lymphocytes B et du

récepteur de l'interleukine 2. Également, elle agit sur de l'endothélium en augmentant la perméabilité vasculaire ainsi que la coagulation. (image tirée et modifiée de Roitt & *al.*[11])

3.1.3 Les rôles de l'interleukine 1

L'IL1 a également une influence sur la production de lymphokines, la résorption osseuse, la synthèse de protéines de phase aigüe et la fièvre. [88] Cette cytokine a aussi un rôle à jouer dans la migration des neutrophiles hors de la moelle osseuse ainsi que sur leur chimiotactisme. [5] Il a aussi été démontré que l'IL1 avait un impact sur le système cardiovasculaire en influençant la coagulation et sur la régulation de la pression sanguine. [89, 90] Elle favorise la dissolution des caillots en augmentant la production de l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène, et ensuite, en diminuant la production de l'activateur de plasminogène. Cette interleukine réduit aussi l'expression de thrombomoduline et du récepteur de la protéine C provenant des cellules endothéliales, ce qui favorise une bonne coagulation. [91]

3.1.4 Implication dans des pathologies

Comme mentionné précédemment, les interleukines sont sécrétées par les différentes cellules impliquées dans la réponse immunitaire acquise, que ce soit Th1, Th2 ou Th17. [88] Elles jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. D'ailleurs, certaines maladies ont été reliées à la régulation des gènes faisant partie de la famille d'IL1 ou encore à la présence de polymorphismes dans ces mêmes gènes. En effet, la concentration d'IL1 augmente chez les sujets atteints notamment d'infections (virales, bactériennes, parasitaires), de leucémie, d'Alzheimer, de maladies auto-immunes et d'asthme. [81] Un polymorphisme dans le cinquième exon du gène *IL1B* a été associé avec le diabète tandis que le SNP rs1143634 situé dans l'exon 4 a été associé à l'obésité, une maladie à composante inflammatoire. [92, 93] Plusieurs autres SNPs ont été identifiés dans le gène *IL1A* et certains ont été associés à des maladies inflammatoires telles que la rhinosinusite et le cancer du sein. [94, 95].

3.2 Les récepteurs de l'interleukine 1

L'action des cytokines nécessite la présence de leur récepteur spécifique ainsi que leur liaison avec celui-ci, ce qui mène à la transmission du signal. Les récepteurs d'IL1 forment une famille de neuf membres. [83] L'IL1 possède deux principaux récepteurs dont il sera question ici, le récepteur de type 1 (IL1R1) ainsi que le récepteur de type 2 (IL1R2). Il est important de mentionner la protéine accessoire d'IL1R (IL1RAcP) qui forme un complexe avec le récepteur ainsi que l'antagoniste du récepteur d'IL1 (IL1RA). Les deux récepteurs sont codés par deux gènes différents soit *IL1R1* et *IL1R2* situés sur le chromosome 2q14. [82]

IL1R1 est un récepteur de 80 kDa retrouvé majoritairement sur les lymphocytes T, les cellules épithéliales, les kératinocytes, les cellules dendritiques, les hépatocytes et les fibroblastes. [81, 96] Bien que ce type de récepteurs ne se retrouve pas en grande quantité dans l'organisme, il déclenche plusieurs mécanismes simultanés et possède une affinité très forte pour ses ligands agonistes, IL1 α et β , ainsi que pour IL1RA. [81] En effet, le nombre de récepteurs de type 1 varie de 5000 sur les cellules spécialisées à 50 sur les cellules primaires. [97] Il nécessite 10 fois moins de ligands que la plupart des autres récepteurs puisque la signalisation est possible avec 10 récepteurs par cellules. [81, 98] Le complexe formé du récepteur de type 1 et d'IL1 α est internalisé et acheminé au noyau tandis que le récepteur est lentement dégradé. [99] IL1R1 est composé de trois domaines immunoglobuline ainsi que d'un domaine « toll-like ». Le domaine immunoglobuline est impliqué dans les interactions entre protéines et entre les protéines et leur ligand. [100] Le domaine « toll-like » d'IL1R1 fût identifié grâce à l'homologie qu'il partage avec la protéine de *Drosophila melanogaster* et il est similaire au régulateur du chimiotactisme CheY présent chez les bactéries. [101, 102] Ce domaine de 200 acides aminés est formé des trois régions conservées que l'on nomme *Box* 1, 2 et 3. Des études précédentes ont suggéré que *Box* 1 et 2 sont responsables de la liaison avec les molécules de signalisation alors que *Box* 3 est principalement impliqué dans la localisation du récepteur en interagissant avec le cytosquelette (voir figure 4). [103]

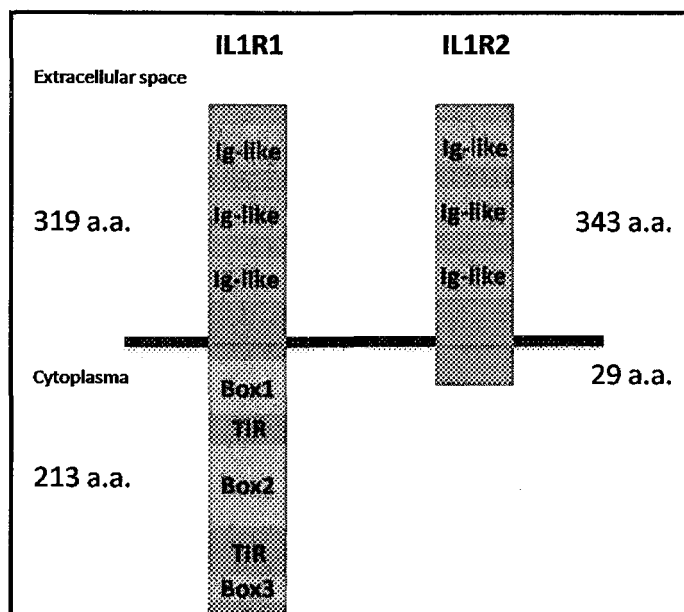


Figure 4 Représentation graphique de la structure des récepteurs de l'interleukine 1

Les deux récepteurs sont très semblables hormis l'absence du domaine cytoplasmique pour le récepteur de type 2 qui est essentiel à la signalisation cellulaire.

La liaison entre IL1 β et le récepteur de type 1 se fait grâce à deux sites de liaison, l'un dans la structure en tonneau et l'autre à l'arrière de la molécule. [104, 105] Cependant, ce complexe n'est pas suffisant pour l'induction d'un signal puisque celui-ci nécessite la liaison avec IL1RAcP, partageant une forte homologie avec IL1R1. [106] Une fois la formation du complexe formée entre IL1, IL1R1 et IL1RAcP, il y a recrutement de l'adaptateur MyD88, de la protéine Tollip ainsi que des kinases IRAK1 et IRAK4. A phosphorylation des protéines IRAK amène le recrutement de la protéine Pellino1. Par la suite, les protéines TAB1 et TAB2 sont recruté et font parti du nouveau complexe IRAK1-TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2. IRAK1 est ubiquitiné et dégradé alors que TAB1 et TAB2

subisse des phosphorylations. Ces phosphorylations facilitent l'acheminement du complexe dans le cytosol. L'inhibiteur du facteur de transcription NF-KB est par la suite phosphorylé et ce dernier est maintenant disponible et entre dans le noyau. C'est NF-KB qui déclenche la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués notamment dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Ce complexe mènera aussi à l'activation des protéines kinases mitogènes (MAPK). [100, 107, 108] Le récepteur de type 1 est quant à lui impliqué dans certaines maladies inflammatoires. Un SNP dans le gène codant pour le récepteur de type 1 a été associé au diabète auto-immun. [109] Un autre SNP présent dans le gène *IL1RA* a aussi été associé à des maladies inflammatoires cutanées comme la dermatite (*lichen sclerosus*) et le psoriasis. [110, 111]

Le récepteur de type 2 a une taille de 68 kDa et est principalement présent sur les lymphocytes B, les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules de la moelle osseuse, mais il est également exprimé par les lymphocytes T et les cellules épithéliales. [96, 112] Ce récepteur est composé des trois domaines immunoglobulines extracellulaires et d'un domaine intracellulaire de 29 acides aminés auquel il manque le domaine « toll-like » essentiel à la transduction du signal (voir figure 4). [113] Le récepteur de type 2 est présent sous forme soluble et transmembranaire. La forme soluble provient du clivage de la forme transmembranaire par une ou plusieurs métalloprotéinase(s) (MMP2 est la seule connue à ce jour) ou encore par un épissage alternatif. [114, 115] Cette forme d'IL1R2 ne possède pas les domaines cytoplasmiques et transmembranaires, mais peut se lier à IL1 β sous forme de précurseur ou sous forme mature ainsi qu'avec IL1RAcP. [116, 117] La liaison avec la pro-IL1 β empêche son clivage et vient donc réguler négativement la quantité d'IL1 β . [118] Sa liaison avec les formes matures d'IL1 et l'absence de signalisation empêchent la réponse cellulaire normalement induite par IL1. IL1R2 agit donc de deux façons. Tout d'abord comme un récepteur leurre entraînant une compétition avec le récepteur de type 1 pour l'occupation du site par IL1 et ensuite en régulant négativement la réponse des cellules face à IL1, puisqu'il n'y a pas de signalisation lorsqu'il est lié à celui-ci. [113] Après son internalisation dans la cellule suite à une endocytose médiée par les puits de clathrine, le récepteur de type 2 est rapidement retourné à la membrane afin d'être recyclé. [119, 120] IL1R2 semble donc également agir en tant que vidangeur de l'IL1

présent sur les sites inflammatoires en s'y liant et en l'internalisant sans signalisation ultérieure. [121]

Les ligands d'IL1R2 sont reconnus pour réguler son expression et ceci a été constaté entre autres chez le modèle murin, puisque lorsqu'il y a une augmentation d'IL1 α et IL1 β , le nombre de récepteurs s'accroît. [122] Ce fait a également été démontré par l'étude de Bellehumeur *et al.*, réalisée en 2009, dans laquelle le traitement avec IL1 β induit l'augmentation d'IL1R1 ainsi que d'IL1R2 et IL1RA à la manière d'une dose-réponse. [121] Cependant, IL1 β régule à la baisse la forme transmembranaire de ce récepteur puisqu'il y a internalisation du complexe IL1-IL1R2, ce qui a pour effet de diminuer le nombre de récepteurs à la membrane. [119] On peut donc en déduire qu'il augmente la forme soluble du récepteur seulement. En augmentant la concentration d'IL1R1 et d'IL1RA en activant la transcription des gènes, IL1 β augmente également le mécanisme de régulation négative en induisant l'accroissement du nombre de récepteurs de type 2 de forme transmembranaire en stabilisant l'ARN messenger (ARNm) du gène *IL1R2*, maintenant ainsi l'équilibre entre les deux voies de régulation. [121] L'augmentation de l'IL1R2 transmembranaire provoque l'élévation du nombre de récepteurs solubles, ce qui est concordant avec le fait que le récepteur soluble provient du clivage de la forme transmembranaire. [123] D'après les travaux de Ciu *et al.* en 2003, l'aminopeptidase 1 du réticulum endoplasmique (ERAP1) serait nécessaire pour le clivage de l'IL1R2 soluble et il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la protéine ERAP1 et le clivage d'IL1R2. Il y a également deux promoteurs différents contrôlant l'activité d'une partie de l'exon 1 (1A et 1B) du gène *IL1R2*. Certains facteurs de transcription comme SPI1 et FOX3P seraient essentiels pour l'expression de ce gène. [124, 125]

D'autres cytokines peuvent également réguler le niveau de récepteurs IL1R2. L'interféron gamma est l'un d'entre eux. Kitaya *et al.*, ont démontré qu'une exposition à l'interféron gamma régule à la baisse la concentration d'IL1R2. De plus, cette même exposition augmente de plus de deux fois la concentration de CASP1, le gène codant pour la protéine caspase 1. [126] Comme mentionné précédemment, cette protéine est responsable du clivage de la pro-IL1 β . [83] Cette augmentation de CASP1 pourrait donc

suggérer une augmentation de pro-IL1 β , cependant ce fait n'a pas été vérifié par les chercheurs lors de cette étude. L'interleukine 4, 13 et le TNF régulent également IL1R2 puisque les cellules polymorphonucléaires traitées avec celles-ci ont un niveau d'IL1R2 plus élevé que les cellules non traitées. [113, 127, 128] De plus, il semble qu'un traitement avec IL2 chez des patients atteints de cancer augmente la concentration d'IL1R2 dans le plasma sanguin. [129]

Plusieurs études ont démontré que les concentrations d'IL1R2 étaient plus élevées lors de la présence de certaines maladies. En effet, la quantité de ce récepteur s'accroît dans le plasma des patients atteints de septicémie (infection bactérienne) et l'expression plus élevée de l'ARNm codant pour IL1R2 était également observable chez les neutrophiles de ces patients [130] ainsi que dans des biopsies bronchiques de patients asthmatiques. [64] Ce type de récepteur s'est également révélé plus présent dans le liquide cébrospinal des individus souffrant de méningite comparativement à des sujets sains. [131] Il faut également que les gènes codant pour des récepteurs dont le domaine de type « toll-like » est absent, comme IL1R2, ont un rôle important à jouer dans le développement de maladies atopiques telles que l'asthme. [132] Le SNP rs740044 du gène *IL1R2* a été associé dans des études récentes avec l'allergie et ce SNP sera le sujet de ce projet [62] (voir figure 5).

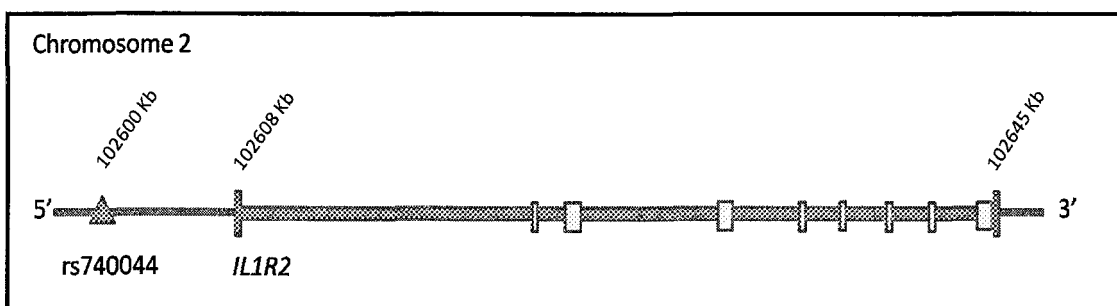


Figure 5 Représentation graphique de la structure du gène *IL1R2* et localisation du SNP rs740044

La séquence du gène *IL1R2* est d'une longueur de 37 Kb et comprend neuf exons. Le polymorphisme rs740044, situé dans la région promotrice, a été associé avec l'atopie dans une étude combinant quatre échantillons canadiens.

4 Hypothèses et objectifs

Avec une augmentation de la prévalence et de la fréquence, l'asthme est une maladie provoque une hausse des décès, de la morbidité ainsi que des coûts reliés au système de santé. Il est important de mener des recherches afin d'améliorer la prévention et le traitement de l'asthme allergique. Plus spécifiquement, l'implication des SNPs dans le développement de maladies allergiques et la présence d'un domaine "toll-like" permettent de croire que le gène *IL1R2* pourrait avoir un rôle dans l'asthme allergique. De plus, le rôle joué par les interleukines dans les maladies allergiques est considérable et un changement dans le nombre ou la forme du récepteur de IL1 pourrait donc avoir un impact majeur sur la réponse immunitaire provoquée par l'asthme allergique. Également, en rassemblant les résultats d'études d'expression et d'étude d'association sur le gène *IL1R2*, nous pensons que les gènes impliqués dans les activités du gène *IL1R2* pourraient être impliqués dans l'asthme et les phénotypes qui y sont reliés.

Ces éléments justifient donc la pertinence d'étudier le récepteur de type 2 de l'interleukine 1 ainsi que ses polymorphismes dans un contexte d'asthme allergique.

CHAPITRE 2:

Polymorphisms within genes involved interleukin-1 receptor type II (IL1R2) activities are associated with allergic asthma

RÉSUMÉ

Le gène *interleukin-1 receptor type-2 (IL1R2)* est différemment exprimé dans les biopsies bronchiques des patients asthmatiques allergiques comparativement aux sujets témoins et a également été associé avec l'atopie. Une étude d'association entre les gènes impliqués dans l'activité d'*IL1R2* et différents phénotypes reliés à l'asthme a été réalisée sur cinq échantillons (SLSJ, EGEA, CAPPS, SAGE et BUSSELTON) afin d'identifier des gènes d'intérêt. Sept gènes ont été associés: *beta-site APP-cleaving enzyme-1 (BACE1)* et la metalloprotéinase 2 (*MMP2*) avec l'asthme et l'asthme allergique, *spleen focus forming virus proviral integration oncogene (SPII)* avec l'atopie et l'asthme atopique, *endoplasmic reticulum aminopeptidase (ERAP1)* avec l'asthme allergique, *interleukin 1 receptor accessory protein (IL1RAP)* et *interleukin 1 alpha (IL1A)* avec l'atopie, et le gène *interleukin 1 receptor type 1 (IL1R1)* avec l'asthme, l'atopie et l'asthme allergique. Ces résultats renforcent l'idée du rôle d'*IL1R2* dans l'asthme et suggèrent qu'il est pertinent de mieux caractériser sa voie biologique afin d'avoir une meilleure connaissance de la biologie moléculaire du trait.

Genes involved in interleukin-1 receptor type II (*IL1R2*) activities are genetic determinants of allergic asthma

Vanessa T. Vaillancourt, BSc,¹ Denise Daley, PhD,^{2,3} Julie E. Park, MSc,^{2,3} Andrew Sandford, PhD,^{2,3} Allan Becker, MD,⁴ Anita L. Kozyrskyj, PhD,⁴ Alan L. James, MD,⁵ Arthur W Musk, MD,⁶ Florent Monier, MSc,⁷⁻⁹ Peter Paré, MD,^{2,3} Thomas J. Hudson, MD,¹⁰ Emmanuelle Bouzigon, MD, PhD,⁷⁻⁹ Florence Demenais, MD,⁷⁻⁹ and Catherine Laprise, PhD,¹
Chicoutimi, Quebec, Toronto, Ontario, Winnipeg, Manitoba, Vancouver, British Columbia, Canada, Nedlands, Australia and Paris, France

Capsule summary: This study shows the significance of the genes involved in the *IL1R2* gene activities in allergic asthma and the power of using a group of genes biologically related with the candidate gene to define the genetic contribution to common diseases.

Key words: Asthma, *IL1R2*, polymorphism, atopy, association study, GWAS, allergic asthma

From ¹Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Canada; ² University of British Columbia, James Hogg Research Centre, Vancouver, Canada; ³ Respiratory Division, Department of Medicine, UBC ⁴ Women and Children's Health Research Institute, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Canada; ⁵ Department of Pulmonary Physiology and Sleep Medicine, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Western Australia; ⁶ Department of Respiratory Medicine, Sir Charles Gairdner Hospital, Perth, Western Australia; ⁷ INSERM, U946, Genetic Variation and Human Diseases Unit, Paris, France; ⁸ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, France; ⁹ Fondation Jean Dausset-Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), Paris, France; ¹⁰ Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, Canada
 V. T. Vaillancourt is an Allergen trainee and supported by the Campagne de développement de l'Université du Québec à Chicoutimi, and the Réseau en Santé respiratoire du Québec. A. Sandford is the chairholder of Canada Research Chair in Genetic Susceptibility to Inflammatory Airway Diseases. D. Daley has received grant support from Allergen, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Michael Smith Foundation for Health Research. T.J. Hudson is currently funded by a Senior Investigator Award of the Ontario Institute for Cancer Research and was the recipient of a Clinician-Scientist Award in Translational Research by the Burroughs Wellcome Fund, an Investigator Award from the Canadian Institutes of Health Research and by Allergen Network. P. D. Paré has received grant support from Merck. A. L. James has received grant support from Merck, Sharpe, and Dohme. C. Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair on genetic determinants in asthma and the director of the Inflammation and Remodeling Strategic Group of the Respiratory Health Network of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), which partially support the French Canadian study and member of Allergen network.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

ABSTRACT

Background: The interleukin-1 receptor type II (*IL1R2*) is overexpressed in allergic asthmatics subjects and an association study combining four samples showed that *IL1R2* gene variants are associated with allergy.

Objective: This study aimed to test the association between genetic variants in genes involved in *IL1R2* activities and asthma-related phenotypes.

Methods: We performed association studies in four familial and one case-control samples to identify genetic variants within genes related to *IL1R2* associated with asthma related phenotypes.

Results: We found significant association with at least one gene and phenotype in all asthma samples, but no gene was associated in more than one study (before correction). Throughout the study, we found that the beta-site APP-cleaving enzyme 1 (*BACE1*) gene ($p=0.003$ and 0.002), the interleukin 1 receptor type 1 (*IL1R1*) gene ($p=0.001$ and 0.002), the interleukin 1 receptor accessory protein (*IL1RAP*) gene ($p=0.0007$) and the métalloprotéinase (*MMP2*) gene ($p=0.001$), were significantly associated with asthma. Also, the spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1 (*SPI1*) gene ($p=0.005$), the *IL1R1* gene ($p=0.0009$) and the interleukin 1 alpha (*IL1A*) gene ($p=0.003$) were associated with atopy. Finally, the *SPI1* gene ($p=0.002$), the *MMP2* gene ($p=0.0004$), the *BACE1* gene ($p=0.003$ and 0.0003), the endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (*ERAP1*) gene ($p=0.0007$ and 0.001), and the *IL1R1* gene ($p=0.002$) were associated with allergic asthma.

Conclusion: Polymorphisms in the genes involved in the *IL1R2* activity (*IL1A*, *IL1RAP*, *BACE1*, *IL1R1*, *MMP2*, *SPI1* and *ERAP1*) are associated with asthma, atopy and allergic asthma. These results indicate the relevance of the genes involved in *IL1R2* activities in asthma.

Abbreviations used

BACE1: Beta-site APP cleaving enzyme 1
BACE2: Beta-site APP cleaving enzyme 2
CAPPS: The Canadian Asthma Primary Prevention Study
EGEA: The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma
ERAP1: Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
FBAT: Family based association test
GWAS: Genome wide association study
IFNG: Interferon gamma
IL1: Interleukin 1
IL13: Interleukin 13
IL1A: Interleukin 1 alpha
IL1B: Interleukin 1 beta
IL1R1: Interleukin 1 receptor type I
IL1R2: Interleukin 1 receptor type II
IL1RAP: Interleukin 1 receptor accessory protein
IL1RN: Interleukin 1 receptor antagonist
IL4: Interleukin 4
MMP: Metalloprotease
MMP2: Matrix metalloprotease 2
SAGE: The Study of Asthma Genes and the Environment
SLSJ: Saguenay–Lac-Saint-Jean
SNP: Single nucleotide polymorphism
SPI1: Spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1

INTRODUCTION

Asthma is a common disease and genetic factors contribute to its pathogenesis. [1] Atopy, which also shows a genetic predisposition, is characterized by the excessive production of IgE in response to environmental allergens and is an important risk factor of asthma. Both atopy and allergic asthma are common. Airway inflammation, obstruction and hyperresponsiveness which are typical of asthma are initiated by the activation of T_H2 cell types and cytokines. [2] Genes can have independent effects on the pathophysiology of asthma and/or can interact with other genetic or environmental factors. Using different approaches including the integration of genetics (association studies) and transcriptomics (microarrays, qPCR), more than 300 genes have been related to asthma, including 30 genes which have been replicated in at least five studies. [3, 4] One of these genes is interleukin-1 receptor type II (*IL1R2*). Indeed, we demonstrated that *IL1R2* is differentially expressed in bronchial biopsies of allergic asthmatics compared with controls using microarrays [5] and found an association between rs740044 polymorphism ($p=0.0007$) and allergy in a study which involved four samples from Canada and Australia ($n>5500$). [6] Moreover, interleukin-1 (*IL1*) and its family members are frequently associated with inflammatory and auto-immune diseases [7, 8] and two genome wide association studies showed that the chromosome 2q12 locus, where some genes of the *IL1R2* pathway are located (*IL1R2*, *IL1RL2* and *IL18RAP*), is associated with asthma. [9, 10]

The *IL1R2* gene is located on chromosome 2q12-q22 and codes for the IL1R2 protein. This receptor is mainly expressed on B cells, macrophages, monocytes and neutrophils, but can also be expressed on T cells and epithelial cells. [11, 12] IL1R2 acts as decoy receptor and is involved in the negative regulation of the actions of IL1. [13] Indeed, this receptor does not possess the toll-like domain, which is essential for the signal transduction. [14] IL1R2 exists in soluble and transmembrane forms and both bind to IL1. The soluble form, which is the minor isoform, is produced through the cleavage of IL1R2 by one of many metalloproteinase(s) or by alternative splicing. [15, 16]

To the best of our knowledge, studies based on the implication of the genes involved in *IL1R2* gene activities had never been performed. However, single nucleotide

polymorphisms (SNPs) in genes that code for proteins that possess a toll-like receptor domain, as IL1R1 (IL1R2 homologue receptor) [14], are known to be implicated in atopic diseases, such as asthma. [17] This new information combined with the results from our previous expression and association studies led us to investigate the relevance of polymorphisms in the genes related to the IL1R2 activities in the pathophysiology of asthma, especially in an atopic context. Considering that strict replications of genetic association are rare and most of replications are only partial (same SNP and a different allele, same gene and a different SNP), as Ober and Hoffjan cited in their review, [18] and considering that there is a heterogeneity between populations owing to possible interactions of genes with gender and/or and environmental factors, [19] we performed our analyses in several populations using a biological approach instead of a candidate gene approach. Moreover, as no correlation was shown between expression and the associated SNP in *IL1R2*, we thought that this difference in the expression may be due to a mutation in genes that modulates IL1R2. It was reasoned that this would provide an overall view of the importance of the activity of IL1R2 in asthma related phenotypes. We performed an association study of genes involved in the IL1R2 activities and asthma-related phenotypes in five asthma collections from Canada, France, and Australia. The genetic analyses showed that 14 SNPs located in seven of the thirteen studied genes were associated with at least one of asthma-related phenotype in at least one asthma independent study.

METHODS

Phenotypes

Phenotypes were defined following the American Thoracic Society's criteria. [20] We defined subjects as asthmatic if: (1) they had asthma diagnosed by a physician; or if (2) they showed a positive methacholine provocation test (PC₂₀) combined with asthma related symptoms. Atopy was defined as a positive skin prick test response (wheal diameter \geq 3mm at 10 min) to at least one allergen. [21, 22] Allergic asthma was defined as the presence of both asthma and atopy.

Samples

Multiple individual comparisons were made in five mostly Caucasian (<5%) populations from Canada, France and Australia. The familial sample of Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) comprises 253 asthmatic probands and their family members (a total of 1 284 subjects). The SLSJ is a region of the province of Quebec in Canada. This French-Canadian population is known for its founder effect and has widely conserved chromosomal regions, which can facilitate the identification of genes associated with complex trait diseases. [23] This sample has been well described in previous publications. [22, 24]

The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma (EGEA) sample includes 348 nuclear families from France that were ascertained through asthmatic probands (253 families ascertained through at least one asthmatic offspring and 135 families ascertained through one asthmatic parent.) [25, 26] The Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE) sample is a nested case-control sample of 723 children and their parents recruited from a population-based sample of 13 980 children, born in the province of Manitoba, Canada, in 1995. The Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS) cohort comprises 549 children at high risk for developing asthma and their parents who, during the second and third trimester of pregnancy, were enrolled in an asthma-prevention study. [27] The Busselton Health Study is a case-control, community-

based cohort that includes 440 cases and 617 control subjects from a semi-rural town in Western Australia. [28, 29] Clinical characteristics of these populations are presented in Table 1 and online supplements are available for more detailed description.

Genes and SNPs selection

To identify genes involved in *IL1R2* activities, a review of relevant studies was done using combinations of the following keywords: *IL1R2*, interleukin 1 decoy receptor, expression, induce, regulate, decreased and increased. Thirteen genes were selected according to their direct effect on *IL1R2* expression or splicing including ligands, cleavage proteins and other IL1R family members or proteins that were proven to have an effect on IL1R2 level. These genes were selected even if they were previously associated in other populations such as *IL4* and *IL13*. They are listed in Table 2 with a brief description of their proposed interaction with *IL1R2*. Figure 6 illustrates the contribution of those genes on *IL1R2* activities. Briefly, genes selected code for natural ligands (*IL1A* and *IL1B*), competitor receptors, such as *IL1R1* and *IL1RN*, and an accessory protein (*IL1RAP*). There are also cytokines that modulate the production of IL1R2, such as *IL4*, *IL13*, and *IFNG*. Proteins that cleave the transmembrane form of IL1R2, coded by *BACE1*, *BACE2*, *MMP2*, and *ERAP1* genes are also components of this study. Finally, a transcription factor, the spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1 gene (*SPI1*), is essential to the production of IL1R2 through its binding to the PU pattern in the promoter region.

The relevance of a biological selection of genes was illustrated among others by Bossé *et al.* with the vitamin D receptor pathway. [30] To validate our gene selection, we submitted it to the GeneCoDis [31, 32] website and twelve of the thirteen genes were identified to be involved with *IL1R2* gene, whether in protein binding (12 genes) or cytokine-cytokine receptor interaction (8 genes). Only *BACE2* gene was not included in any of the pathways. However, this gene was included since a previous study showed it codes for a protein that cleaves the transmembrane form of IL1R2 and is coding for a homologue protein to BACE1. [33]

All samples included in the present study were genotyped using Illumina 610KQuad array (Illumina, San Diego, USA) at the Centre National de G notypage (CNG, Evry, France). [9] We selected SNPs that were located in a ± 10 Kb distance of the genes of interest. The SNPs fulfilling the following quality control criteria were considered in the analyses: call rate $\geq 95\%$, minor allele frequency $\geq 5\%$, Hardy-Weinberg equilibrium p value $\geq 5\%$ and Mendelian errors $\leq 1\%$.

Statistical analysis

To identify association between SNPs and asthma phenotypes, transmission disequilibrium was analyzed using the Family-Based Association Tests software (FBAT) (version 2.0.3, <http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/default.html>). Regions of strongly linked markers (LD blocks) were inferred using the definition proposed by Gabriel et al. [34] and implemented in Haploview. SNP associations were investigated under an additive genetic model using the ‘fbat’ command implemented in FBAT software. To account for the inclusion of multiple affected family members, analyses were made using the empiric variance estimator “-e”. [35] All the associations of SNPs obtained had to survive a multiple test correction for the number of independent tag SNPs [36] and the number of independent phenotypes, which was identified as two, using a matrix spectral decomposition (matSpD). As an example, for *IL1R1* gene, there were 10 independent TagSNPs, so the corrected threshold was 0.0025 [(0.05 / 10 TagSNPs) / 2 phenotypes].

RESULTS

A total of 5041 subjects from five samples (1284 in SLSJ, 789 in EGEA 766 in CAPPS, 1026 in SAGE and 1176 in BUSSELTON) were included in this study. The 198 SNPs that passed the quality control checks were tested individually with asthma, atopy, and allergic asthma under an additive genetic model with the empiric variance estimator.

After correction for multiple testing and independent phenotypes, 14 SNPs located in seven genes remained significant and were associated with asthma-related phenotypes in at least one study (Tables 3 to 5). In the SLSJ familial collection, there were significant associations between the *BACE1* gene and asthma and allergic asthma (rs522843 $p=0.004$ and 0.003 ; rs47210 $p=0.002$ and 0.0003 respectively) and between the *SPII* gene and atopy and allergic asthma (rs3740689 $p=0.005$ and 0.002 respectively). In the EGEA sample, the *IL1RI* gene was associated with asthma (rs3732131 $p=0.001$; rs871657 $p=0.002$; rs949963 $p=0.002$; rs10208708 $p=0.002$) and atopy (rs3732131 $p=0.0009$), and associations with allergic asthma were found for the *ERAPI* gene (rs13154629 $p=0.0007$; rs12173167 $p=0.0007$; rs10050860 $p=0.001$). In the CAPPS sample, rs2048874 located in the *IL1A* gene was associated with atopy ($p=0.003$). In the SAGE sample, the *IL1RAP* gene showed association with asthma (rs10513854 $p=0.0008$) and rs1030021, in the *IL1RI* gene, was associated with allergic asthma ($p=0.002$). Finally, in the BUSSELTON sample rs1005913 located in the *MMP2* gene was associated with asthma ($p=0.001$) and allergic asthma ($p=0.0004$). Complete results are shown in Tables E1 to E3 in the supplementary material.

DISCUSSION

Using a biological approach, we performed an association study between polymorphisms in genes involved in the *IL1R2* gene activity and asthma, atopy and allergic asthma. The impetus for this study was evidence that *IL1R2* is overexpressed in the bronchial biopsies of asthmatic subjects and that it was associated with atopy in a study combining four samples from Canada and Australia. [5, 9] Our association study indicated that the *BACE1* gene was associated with asthma and allergic asthma, the *SPI1* gene was associated with atopy and allergic asthma, the *IL1R1* gene was associated with asthma, atopy and allergic asthma, the *ERAP1* gene with allergic asthma, the *MMP2* gene with the asthma and allergic asthma, the *IL1A* gene was associated with atopy and the *IL1RAP* gene was associated with asthma. Some of the associated genes have already been reported to be associated with inflammatory diseases such as chronic rhinosinusitis (*IL1A*) [37] and with prostate cancer (*MMP2*). [38]

The majority of the SNPs associated are non coding SNPs. As the microarray design was based on the selection of tagSNPs and not on coding SNPs, the majority of the associated SNPs are located in introns or untranslated regions. Furthermore, the major part of the associated SNPs with asthma and other complex traits in the literature within the last two decades are non coding SNPs. [39] This observation suggests that the regulatory SNPs and aberrant DNA methylation profiling (epigenetics) should probably be more relevant in the molecular nature of the complex disease than the coding SNPs. [40] Only rs10050860 located in the *ERAP1* gene which codes for an asparagine instead of an aspartate at position 575, is associated with asthma related phenotypes. The Asp575Asn substitution in *ERAP1* was associated in four studies with ankylosing spondylitis, another inflammatory disease. [41] This genetic variant in the sequence induces a modification in physicochemical properties of the amino acid by changing an acidic amino acid for a polar one. This amino acid change could affect the binding specificity or the protein conformation and may influence the cleavage of the membrane form of IL1R2.

According to the literature, most of the associated genes observed in the present study are involved in lung physiology and in asthma. *IL1R1*, which codes for the type one receptor for IL1, which is mostly expressed on T cells [11, 42], can bind with its ligand IL1 and form a complex with IL1R1 accessory protein. [43] This results in signal transduction which activates the T_H1 pathway and leads to the activation of several immune pathways such as NF- κ B, JNK and mitogen activated protein kinases. [8, 44] IL1R1 is also implicated in inflammatory diseases such as osteoarthritis [45] and multiple sclerosis. [46] It is important to note that the soluble form of IL1R1 is known to be anti-inflammatory and immunosuppressive through the sequestration of IL1. [47] As asthma is an inflammatory disease, this gene may modulate the immune response caused by IL1.

The metalloproteinase MMP2 is known to be involved in tissue repair and remodeling of the lung by the degradation of collagen in the basement membrane. [48] This gelatinase is over-expressed in asthma and also up-regulated by IL4 and IL13. [49] The overproduction of MMP2 may lead to abnormal collagen deposition in the lung and a decrease in the airway lumen. [50] The MMP2 gene can also cleave the membrane form and increase the soluble form of IL1R2. Knowing that IL1 has a greater binding specificity for soluble IL1R2, this would facilitate the binding between them and result in a more efficient inhibition of the T_H1 pathway. This confirms the implication of metalloproteinases in the turnover of the extracellular matrix and the involvement in lung diseases. [48, 50, 51]

BACE1 and BACE2 are both implicated in the alternative splicing of the membrane-bound IL1R2 [33], but their role in the pathophysiology of asthma remains unclear. Indeed, these proteases are more implicated in brain diseases such as Alzheimer's disease through the cleavage of amyloid precursor proteins. [52] Nevertheless, we can hypothesize that the modulation of the soluble form of IL1R2 would affect the proportions of membrane-bound or soluble form of the receptor and thereby promote the T_H2 or T_H1 immune pathway.

The transcription factor *SPII* is required for the development of secreting interleukin 9 by T helper cells subset and dendritic cells. [53-55] A mouse model which lacks *SPII* showed attenuated allergic pulmonary inflammation. [53] Moreover, *SPII* has a

role in macrophage function in inflammation by its regulation of gene expression, [56] so this is a possible path for further exploration. [2]

As the concentration of IL1R2 modulates the activity of IL1, it is also important to look at the biological functions of this pro inflammatory cytokines. First of all, IL1B is implicated in the antigen production by its role on diffenciation of T and B cells and leads to the expantion and differentiation of CD4 T cells in Th17 cells by the induction of IL17. [57, 58] IL1 also acts on the cytotoxic activity of the natural killer cells in collaboration with IL2 and IFNG and increases the expression of adhesion molecules. [59, 60] Treg diffrenciation into Th17 cells and priming of Th17 cells from Natural naïve Treg precursore are also induce by IL1 (with IL2 contribution). [61] Genetic variants in the genes related to *IL1R2* activities may modulate the concentration of this receptor and at the same time modulates the disponibilty of IL1B. Those implication in antigen presentation and in differentiation of immune cells indicates that the modulation of IL1B by the decoy receptor IL1R2 may influence the inflammatory response.

Our study shows that 14 SNPs located in seven genes belonging to the *IL1R2* gene activities are associated with at least one asthma-related phenotype in at least one population, which is an important finding. Except for *IL1R1*, which is in the 2q12.1 region that contains the *IL1R2*, *IL1RL2* and *IL18RAP* genes and that was already associated with asthma, [9] this is the first time that significant association with an asthma-related phenotype is reported for *BACE1*, *SPII*, *ERAP1*, and *IL1RAP*. Moreover, at least one SNP in the *BACE2* (asthma), *IL1R1* (atopy), and *IL1RAP* (atopy), genes was associated in all five different samples, before correction. Our study demonstrates the relevance of using several populations to document the molecular biology of a trait as well as the genetic variability in distinct populations. Indeed, the associations found were not necessarily for the same allele of the same SNP or the same gene among these five independent studies, but several genes involved in the *IL1R2* gene activities were associated with asthma related phenotypes in each study. Thus, our study underlines the relevance of a biological approach to pinpoint the genes of interest, which not only increases our chances of identifying relevant genes involved in a specific disease but also increases the understanding of the molecular biology of the disease. Our study also points out that the mechanisms involved

are likely to be complex. Indeed, the difficulty to have association for a same SNP or a same allele across studies may be partly due to the limited sample size of each study. Also, the complex interactions between genes and also with the environment may vary across populations. Further studies taking into account potential interactions are needed to better understand our findings. Further fine-mapping and sequencing approaches are also needed to better characterize the molecular structure of the genes that were associated in this study and to identify the causal variants. Our results provide a strong basis for functional studies, such as studies of gene expression in bronchial biopsies, which will help to better understand the role of these genes in asthma physiopathology.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the families for their valuable participation to this study and the funding organisms. The Canadian studies (Saguenay–Lac-Saint-Jean, SAGE and CAPPS studies) were supported by AllerGen NCE Inc. (the Allergy, Genes and Environment Network), a national multidisciplinary research network. AllerGen is a member of the Networks of Centers of Excellence (NCE). The EGEA study was supported by the European Commission as part of GABRIEL (A multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the European Community) contract number 018996 under the Integrated Program LSH-2004-1.2.5-1 Post genomic approaches to understand the molecular basis of asthma aiming at a preventive or therapeutic control.

KEY MESSAGES

- The genes involved in the *IL1R2* gene activities have a role in the pathophysiology of asthma and atopy.
- The biological analysis approach is a logical continuation of the candidate gene approach to highlight genes involved in complex traits and this approach should be advantageous in term of defining the molecular biology of traits using independent studies.
- Genetic variability between distinct populations within regulatory SNPs, and interactions between non-coding SNPs and the environment can influence the associated genes and SNPs and validate the biological approach.

REFERENCES

1. Hizawa N: Genetic backgrounds of asthma and COPD. *Allergology International* 2009, 58(3):315-322.
2. Maddox L, Schwartz DA: The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med* 2002, 53:477-498.
3. Madore A-M, Laprise C: Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy* 2010, 3:107-121.
4. Lee SH, Park JS, Park CS: The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011, 3(4):236-244.
5. Chamberland A, Madore A-M, Tremblay K, Laviolette M, Laprise C: A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Experimental Lung Research* 2009, 35(5):399-410.
6. Sandford AJ, He J-Q, Akhabir L, Stefanowicz D, Becker AB, Chan-Yeung M, Tripp B, Zamar D, Bossé Y, Kozyrskyj AL *et al*: Associations of genetic polymorphisms in innate immunity genes with asthma and asthma-related phenotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Under review.
7. Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE: Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(2):1169-1175.
8. Dinarello CA: The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20(5 Suppl 27):S1-13.
9. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO: A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010, 363(13):1211-1221.
10. Torgerson DG, Ampleford EJ, Chiu GY, Gauderman WJ, Gignoux CR, Graves PE, Himes BE, Levin AM, Mathias RA, Hancock DB *et al*: Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 2011, 43(9):887-892.
11. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK: Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86(22):8946-8950.
12. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal* 1991, 10(10):2821-2832.
13. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994, 15(12):562-566.
14. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993, 261(5120):472-475.
15. Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB: Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(34):20965-20972.
16. Chang SY, Su PF, Lee TC: Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1alpha pathway. *Cytokine* 2009, 45(1):32-38.
17. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufer A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M *et al*: Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002, 360(9331):465-466.

18. Ober C, Hoffjan S: Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity* 2006, 7(2):95-100.
19. Lopez Herraiz D, Bauchet M, Tang K, Theunert C, Pugach I, Li J, Nandineni MR, Gross A, Scholz M, Stoneking M: Genetic variation and recent positive selection in worldwide human populations: evidence from nearly 1 million SNPs. *PLoS One* 2009, 4(11):e7888.
20. Society AT: ATS statement--Snowbird workshop on standardization of spirometry. *Annual Review of Respiratory Disease* 1979, 119(5):831-838.
21. Tremblay K, Lemire M, Provost V, Pastinen T, Renaud Y, Sandford AJ, Laviolette M, Hudson TJ, Laprise C: Association study between the CX3CR1 gene and asthma. *Genes and Immunity* 2006, 7(8):632-639.
22. 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. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007, 175(11):1109-1116.
23. Heyer E, Tremblay M, Desjardins B: Seventeenth-century European origins of hereditary diseases in the Saguenay population (Quebec, Canada). *Human Biology; An International Record Of Research* 1997, 69(2):209-225.
24. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, Hudson TJ: Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2004, 170(9):967-973.
25. Kauffmann F, Dizier MH, Pin I, Paty E, Gormand F, Vervloet D, Bousquet J, Neukirch F, Annesi I, Oryszczyn MP *et al*: Epidemiological study of the genetics and environment of asthma, bronchial hyperresponsiveness, and atopy: phenotype issues. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 156(4 Pt 2):S123-129.
26. Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, Ecochard D, Feingold J, Gormand F, Grimfeld A *et al*: EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy)--descriptive characteristics. *Clinical And Experimental Allergy: Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology* 1999, 29 Suppl 4:17-21.
27. Chan-Yeung M, Manfreda J, Dimich-Ward H, Ferguson A, Watson W, Becker A: A randomized controlled study on the effectiveness of a multifaceted intervention program in the primary prevention of asthma in high-risk infants. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000, 154(7):657-663.
28. James AL, Knuiman MW, Bartholomew HC, Musk ABW: What can Busselton population health surveys tell us about asthma in older people? *The Medical Journal Of Australia* 2005, 183(1 Suppl):S17-S19.
29. James AL, Palmer LJ, Kicic E, Maxwell PS, Lagan SE, Ryan GF, Musk AW: Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2005, 171(2):109-114.
30. Bossé Y, Lemire M, Poon AH, Daley D, He J-Q, Sandford A, White JH, James AL, Musk AW, Palmer LJ *et al*: Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respiratory Research* 2009, 10:98-98.
31. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A: GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* 2009, 37(Web Server issue):W317-322.
32. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A: GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* 2007, 8(1):R3.

33. Kuhn P-H, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, Lichtenthaler SF: Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *The Journal Of Biological Chemistry* 2007, 282(16):11982-11995.
34. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M *et al*: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, NY)* 2002, 296(5576):2225-2229.
35. Lake SL, Blacker D, Laird NM: Family-based tests of association in the presence of linkage. *American Journal of Human Genetics* 2000, 67(6):1515-1525.
36. Nyholt DR: A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *American Journal of Human Genetics* 2004, 74(4):765-769.
37. Mfunu Endam L, Cormier C, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M: Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Archives Of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 2010, 136(2):187-192.
38. Jacobs EJ, Hsing AW, Bain EB, Stevens VL, Wang Y, Chen J, Chanock SJ, Zheng SL, Xu J, Thun MJ *et al*: Polymorphisms in angiogenesis-related genes and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication Of The American Association For Cancer Research, Cosponsored By The American Society Of Preventive Oncology* 2008, 17(4):972-977.
39. Halvorsen M, Martin JS, Broadaway S, Laederach A: Disease-associated mutations that alter the RNA structural ensemble. *PLoS Genet* 2010, 6(8):e1001074.
40. Bowen H, Kelly A, Lee T, Lavender P: Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clin Exp Allergy* 2008, 38(9):1422-1431.
41. Chen R, Yao L, Meng T, Xu W: The association between seven ERAP1 polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis involving 8,530 cases and 12,449 controls. *Rheumatol Int* 2011.
42. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, 87(6):2095-2147.
43. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C: The interleukin 1 receptor family. *Developmental & Comparative Immunology* 2004, 28(5):415-428.
44. O'Neill LA, Dinarello CA: The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology Today* 2000, 21(5):206-209.
45. Solovieva S, Kämäräinen O-P, Hirvonen A, Hämäläinen S, Laitala M, Vehmas T, Luoma K, Näkki A, Riihimäki H, Ala-Kokko L *et al*: Association between interleukin 1 gene cluster polymorphisms and bilateral distal interphalangeal osteoarthritis. *The Journal Of Rheumatology* 2009, 36(9):1977-1986.
46. Sarial S, Shokrgozar MA, Amirzargar A, Shokri F, Radfar J, Zohrevand P, Arjang Z, Sahraian MA, Lotfi J: IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Iranian Journal Of Allergy, Asthma, And Immunology* 2008, 7(1):37-40.
47. Fernandez-Botran R, Chilton PM, Ma Y: Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy. *Adv Immunol* 1996, 63:269-336.
48. Cataldo D, Munaut C, Noel A, Franken F, Bartsch P, Foidart JM, Louis R: MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2000, 123(3):259-267.
49. Parks WC, Shapiro SD: Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001, 2(1):10-19.
50. Lagente V, Manoury B, Nenau S, Le Quement C, Martin-Chouly C, Boichot E: Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005, 38(10):1521-1530.

51. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melen E, Soderhall C, Hallberg J *et al*: MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations. *N Engl J Med* 2009, 361(27):2599-2608.
52. Cole SL, Vassar R: BACE1 structure and function in health and Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* 2008, 5(2):100-120.
53. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, Jabeen R, McKinley C, Ahyi AN, Han L *et al*: The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* 2010, 11(6):527-534.
54. Carotta S, Dakic A, D'Amico A, Pang SH, Greig KT, Nutt SL, Wu L: The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity* 2010, 32(5):628-641.
55. Carotta S, Wu L, Nutt SL: Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response. *Immunol Rev* 2010, 238(1):63-75.
56. Joo M, Kwon M, Azim AC, Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW: Genetic determination of the role of PU.1 in macrophage gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 372(1):97-102.
57. Marrack P, McKee AS, Munks MW: Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat Rev Immunol* 2009, 9(4):287-293.
58. Dinarello CA: Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011, 117(14):3720-3732.
59. Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991, 77(8):1627-1652.
60. Dinarello CA: Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual Review of Immunology* 2009, 27:519-550.
61. Deknuydt F, Bioley G, Valmori D, Ayyoub M: IL-1beta and IL-2 convert human Treg into T(H)17 cells. *Clin Immunol* 2009, 131(2):298-307.
62. Colotta F, Re F, Muzio M, Polentarutti N, Minty A, Caput D, Ferrara P, Mantovani A: Interleukin-13 induces expression and release of interleukin-1 decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 1994, 269(17):12403-12406.
63. Bellehumeur C, Blanchet J, Fontaine JY, Bourcier N, Akoum A: Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2009, 24(9):2193-2204.
64. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K: Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 1993, 90(13):6155-6159.
65. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G: Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal Of Biological Chemistry* 1995, 270(23):13757-13765.
66. Kitaya K, Yasuo T, Yamaguchi T, Fushiki S, Honjo H: Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2007, 20(5):689-697.
67. Cui XL, Rouhani FN, Hawari F, Levine SJ: Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *Journal of Immunology* 2003, 171(12):6814-6819.
68. Guay S, Akoum A: Stable inhibition of interleukin 1 receptor type II in Ishikawa cells augments secretion of matrix metalloproteinases: possible role in endometriosis pathophysiology. *Reproduction (Cambridge, England)* 2007, 134(3):525-534.
69. Vannier E, Ye K, Fenton M, Sims J, Dinarello C: IL-1 receptor type II gene expression: A role for PU.1. *Cytokine* 1995, 7:596.

Table 1 Characteristics and distribution of the studied phenotypes in the samples

	SLSJ		EGEA		CAPPS		SAGE		BUSSELTON	
	Probands ^a	Family members	Probands	Family members	Children	Parents	Children	Parents	Case	Control
	n = 253	n = 1031	n= 235	n= 554	n=266	n=500	n=430	n=596	n=440	n=617
Male : Female ratio	1 : 1.1	1 : 1.2	1.6	0.98	1:0.86	1:1.02	1:0.78	1:1.17	1:1.25	1:1.72
Mean age, yr (range)	18 (3-50)	44 (2-93)	15 (7-41)	17 (1-43)	7 (6-8)	39 (25-50)	9 (7-10)	40 (26-69)	49 (18-87)	54 (17-88)
Smoking status, n (%)										
Non smoker	211 (85)	473 (47)	46 (63)	156 (58)	NA	329 (66)	NA	365 (62)	668 (51)	3973 (50)
Ex-smoker	12 (5)	342 (34)	10 (14)	28 (11)	NA	110 (22)	NA	136 (23)	252 (19)	1584 (20)
Smoker	25 (10)	197 (19)	17 (23)	84 (31)	NA	59 (12)	NA	85 (14)	381 (29)	2468 (31)
FEV ₁ , % pred. (SD) ^b	92.7 (15.7)	94.6 (20.3)	92.7 (14.0)	98.7 (13.0)	93.8 (11.5)	NA	89.1 (12.3)	106.0 (15)	91.9 (18)	99.8 (19)
PC ₂₀ , mg/ml (SD) ^c	2.53 (3.51)	10.10 (4.97)	1.82 (2.63)	6.31 (6.76)	2.74 (3.21)	NA	3.54 (4.58)	13.04 (3.92)	NA	NA
PD ₂₀ ≤4mg, n (SD) ^d	NA	NA	121 (95.3)	194 (51.9)	NA	NA	NA	NA	528 (85.5)	311 (50)
Serum IgE, µg/l (SD) ^e	254.2 (4.9)	112.4 (4.4)	371.5 (3.2)	100.0 (5.0)	54.9 (4.4)	NA	25.0 (5.5)	NA	NA	NA
Subphenotypes (%)										
Asthma ^f	253 (100)	378 (37)	235 (100)	250 (42)	50 (20)	160 (48)	159 (37)	189 (32)	440 (100)	0
Atopy ^g	200 (79)	509 (49)	207 (91)	289 (54)	109 (44)	346 (69)	201 (47)	NA	308 (70)	360 (58)
Atopic asthma	200 (79)	257 (25)	207 (91)	131 (25)	38 (22)	127 (63)	106 (38)	NA	308 (70)	0

^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 FEV₁ = Mean calculated for the forced expiratory volume in one second in percentage of the predicted value.

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

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

^e IgE = Immunoglobulin E serum concentration.

^f Present asthma or past documented clinical history of asthma.

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

*Calculated from the larger sample of 9317 individuals.

Table 2 Involvement of the selected genes on *IL1R2* activities

Genes	Chromosome	Number of SNPs analyzed	Involvement in <i>IL1R2</i> activities	Reference
Interleukin 1 alpha (<i>IL1A</i>)	2q13	5	Ligands	[62, 63]
Interleukin 1 beta (<i>IL1B</i>)	2q13	4		
Interleukin 1 type 1 receptor (<i>IL1R1</i>)	2q12.1	33	Competitive receptor of <i>IL1R2</i>	[64]
Interleukin 1 receptor antagonist (<i>IL1RN</i>)	2q13	4	Competitive receptor of <i>IL1R1</i> and <i>IL1R2</i>	[42]
Interleukin 1 receptor accessory protein (<i>IL1RAP</i>)	3q28	40	Essential for the binding of <i>IL1</i> to <i>IL1R1</i>	[65]
Interleukin 4 (<i>IL4</i>)	5q31.1	5	<i>IL1</i> antagonist, upregulates <i>IL1R2</i>	[14]
Interleukin 13 (<i>IL13</i>)	5q31.1	4	Upregulates <i>IL1R2</i>	[62]
Interferon gamma (<i>IFNG</i>)	12q15	6	Downregulates <i>IL1R2</i>	[66]
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (<i>ERAPI</i>)	5q15	18	Involved in shedding of <i>IL1R2</i>	[67]
Beta-site APP-cleaving enzyme 1 (<i>BACE1</i>)	21q23.3	9	Upregulates <i>IL1R2</i> , involved in shedding of <i>IL1R2</i>	[33]
Beta-site APP-cleaving enzyme 2 (<i>BACE2</i>)	21q22.3	56		
Matrix metalloproteinase 2 (<i>MMP2</i>)	16q12.2	13	Upregulates <i>IL1R2</i>	[68]
Spleen focus forming virus proviral integration oncogene <i>spi1</i> (<i>SP1</i>)	11p11.2	3	Transcription factor	[69]

Table 3 Significant associations with asthma

Gene	SNP	Allele	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
Corr.	Genomic	MAF ^c	P value	P value	P value	P value	P value
Threshold ^a	Feature ^b		Families ^d	Families	Families	Families	OR
			/Z	/Z	/Z	/Z	
<i>IL1R1</i> 0.0025	rs3732131	G	0.07	0.001	-	0.47	0.46
	Intron	0.08	59 / 1.8	73 / 3.2		28 / -0.7	0.88
	rs949963	T	0.62	0.002	0.34	0.26	0.59
	5'UTR	0.16	97 / -0.5	142 / -3.0	23 / 1.0	56 / -1.1	1.07
	rs10208708	G	0.55	0.002	0.34	0.26	0.59
	5'UTR	0.16	95 / -0.6	142 / -3.0	23 / 1.0	56 / -1.1	1.07
	rs871657	T	0.67	0.002	0.34	0.26	0.59
	Intron	0.16	96 / -0.4	142 / -3.0	23 / 1.0	56 / -1.1	1.07
<i>IL1RAP</i> 0.001	rs10513854	T	0.45	0.43	-	0.0008	0.76
	Intron	0.18	90 / -1.6	121 / -0.8		46 / 3.4	1.0
<i>BACE1</i> 0.004	rs522843	C	0.004	0.70	0.06	0.49	0.57
	Intron	0.30	123 / -2.9	183 / 0.44	33 / -1.9	75 / -0.7	0.94
	rs473210	T	0.002	0.74	0.14	0.70	0.82
	Intron	0.38	137 / -3.1	185 / -0.4	32 / 2.1	82 / 0.4	0.98
<i>MMP2</i> 0.0036	rs1005913	T	0.44	0.93	0.15	0.75	0.001
	5'UTR	0.44	119/-0.8	199/-0.1	31/-1.4	63/-0.3	1.37

Definition of abbreviations: Corr. threshold = Corrected threshold, SNP = single nucleotide polymorphism, MAF = minor allele frequency, SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

- Not enough individuals contributed to the test

^a Corrected threshold for independent TagSNPs and independent phenotypes for each gene

^b According to UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>)

^c Major/minor allele as observed in the Saguenay–Lac-St-Jean sample. All MAFs were similar.

^d Number of families which were included in the analyses

Table 4 Significant associations with atopy

Gene	SNP	Allele	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
Corr. Threshold ^a	Genomic feature ^b	MAF ^c	P value Families ^d /Z	P value Families /Z	P value Families /Z	P value Families /Z	P value OR
<i>IL1A</i> 0.008	rs2048874 5' UTR	T 0.13	0.31 79 / 1.0	NA	0.003 34 / 3.0	0.57 49 / 1.9	0.47 1.09
<i>IL1R1</i> 0.002	rs3732131 Intron	G 0.08	0.12 46 / 1.6	0.0009 81 / 3.4	0.83 22 / 0.2	0.24 35 / -1.2	0.59 1.09
<i>SPII</i> 0.008	rs3740689 Intron	G 0.47	0.005 125 / 2.8	0.68 211 / -0.4	0.10 62 / -1.7	0.04 105 / -2.0	NA

Definition of abbreviations: Corr. threshold = Corrected threshold, SNP = single nucleotide polymorphism, MAF = minor allele frequency, UTR= Untranslated region, NA = Analyses were not performed. SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

^a Corrected threshold for independent TagSNPs and independent phenotypes for each gene

^b According to UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>)

^c Major/minor allele as observed in the Saguenay–Lac-St-Jean sample. All MAFs were similar.

^d Number of families which were included in the analyses

Table 5 Significant associations with allergic asthma

Gene	SNP	Allele	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
Corr. Threshold ^a	Genomic feature ^b	MAF ^c	P value Families ^d /Z	P value Families /Z	P value Families /Z	P value Families /Z	P value OR
<i>IL1R1</i> 0.0025	rs1030021 3'UTR	C 0.27	0.44 107 / -0.8	0.49 111 / 0.688	-	0.002	0.62 1.06
<i>ERAP1</i> 0.002	rs13154629 Intron	T 0.22	0.11 77 / -1.6	0.0007 93 / -3.4	-	0.56 40 / 0.6	0.09 0.83
	rs13173167 Intron	T 0.22	0.11 79 / -1.6	0.0007 93 / -3.4	-	0.67 40 / 0.4	0.08 0.82
	rs10050860 Coding D/N	T 0.22	0.13 82 / -1.5	0.001 92 / -3.3	-	0.78 41 / 0.3	0.08 0.82
<i>BACE1</i> 0.004	rs522843 Intron	C 0.30	0.003 108 / -2.9	0.60 122 / -0.5	0.03 26 / -2.1	0.81 55 / 0.2	0.99 0.99
	rs473210 Intron	T 0.41	0.0003 116 / -3.6	0.65 119 / 0.5	0.05 25 / -2.0	0.43 59 / 0.8	0.97 0.99
<i>MMP2</i> 0.003	rs1005913 5'UTR	G 0.44	0.29 102 / -1.1	0.93 199 / -0.1	0.14 24 / -1.4	0.71 44 / -0.4	0.0004 1.4
<i>SPII</i> 0.008	rs3740689 Intron	G 0.47	0.002 120 / 3.1	0.69 153 / -0.4	0.56 21 / -0.6	0.37 48 / -0.9	NA

Definition of abbreviations: Corr. threshold = Corrected threshold, SNP = single nucleotide polymorphism. MAF = minor allele frequency, UTR= Untranslated region, SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

- Not enough families contributed to the test

^a Corrected threshold for independent TagSNPs and independent phenotypes for each gene

^b According to UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>)

^c Major/minor allele as observed in the Saguenay–Lac-St-Jean sample. All MAFs were similar.

^d Number of families which were included in the analyses

Table 6. Significant associations before correction with asthma

Gene	SNPs	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
<i>ERAP1</i>	rs10515248	0.86	0.61	-	0.05	0.67
	rs27434	0.23	1.00	0.85	0.01	0.39
	rs30187	0.40	0.53	0.87	0.03	0.65
	rs34753	0.16	0.30	0.86	0.03	0.75
	rs13160562	0.55	0.05	0.58	0.54	0.65
	rs10050860	0.63	0.01	0.28	0.90	0.63
	rs13154629	0.57	0.01	0.28	0.90	0.70
	rs13173167	0.68	0.01	-	1.00	0.68
<i>BACE1</i>	rs522843	0.004	0.66	0.06	0.49	0.57
	rs473210	0.002	0.66	0.14	0.70	0.82
	rs560564	0.02	0.97	0.34	0.18	0.63
<i>BACE2</i>	rs1046210	0.59	0.20	0.03	0.83	0.61
	rs2837992	0.12	0.01	0.004	0.20	0.07
	rs914187	0.75	0.04	0.03	0.004	0.75
	rs1541103	0.24	0.01	0.24	0.02	0.36
	rs2009135	0.71	0.24	0.08	0.05	0.33
	rs2837981	0.42	0.01	0.08	0.04	0.70
	rs2837985	0.56	0.54	0.48	0.05	0.92
	rs960230	0.10	0.05	0.30	0.91	0.06
	rs9975388	0.11	0.01	0.09	0.34	0.09
	rs4818225	0.37	0.05	0.13	0.26	0.12
	rs17175402	0.01	0.51	0.71	0.34	0.15
	rs2837998	0.29	0.06	0.13	0.49	0.02
	rs4818226	0.44	0.12	0.24	0.63	0.01
	rs1964927	0.35	0.92	0.07	0.70	0.01
	rs2838006	0.26	0.09	0.07	0.63	0.01
<i>IFNG</i>	rs2193045	0.02	0.13	0.25	0.92	0.07
	rs2069718	0.03	0.22	0.12	0.28	0.54
<i>IL13</i>	rs2243204	0.04	0.53	-	0.19	0.59
<i>IL1R1</i>	rs1030021	0.81	0.89	0.40	0.03	0.88
	rs3917335	0.88	0.07	-	0.03	0.90
	rs11883987	0.11	0.02	0.25	1.00	0.65
	rs10187031	0.40	0.01	0.55	0.15	NA
	rs13001315	0.29	0.04	-	0.87	NA
	rs13035227	0.29	0.03	-	1.00	0.56
	rs2110727	0.50	0.02	0.55	0.15	0.57
	rs6754776	0.23	0.03	-	0.87	0.52
	rs10208708	0.55	0.002	0.34	0.26	0.59
	rs10184523	0.40	0.01	0.55	0.15	NA
	rs1558641	0.40	0.01	0.41	0.15	0.57
	rs1558640	0.40	0.01	0.55	0.15	0.57
	rs35318065	0.42	0.02	0.55	0.15	NA
	rs949963	0.62	0.002	0.34	0.26	0.59
	rs3732131	0.07	0.001	-	0.47	0.46
	rs3917254	0.02	0.14	-	0.60	0.77
<i>IL1RaP</i>	rs10937439	0.16	0.98	0.01	0.92	0.16
	rs6444435	0.94	0.23	0.02	0.41	NA

	rs9877268	0.27	0.55	0.05	0.92	0.18
	rs10513854	0.45	0.43	-	0.001	0.71
	rs2193874	0.18	0.17	0.50	0.03	0.87
	rs2193875	0.70	0.20	0.72	0.03	0.93
	rs2241343	0.67	0.59	-	0.02	0.17
	rs3773953	0.46	0.30	-	0.02	0.87
	rs4686554	0.40	0.47	0.72	0.04	0.44
	rs4687163	0.87	0.40	0.86	0.04	0.59
	rs6781037	0.71	0.17	0.73	0.04	0.99
	rs7626795	0.11	0.24	-	0.003	0.27
	rs4320092	0.57	0.03	0.72	0.72	0.31
	rs3773958	0.02	0.63	-	1.00	0.46
<i>IL4</i>	rs2243248	0.81	NA	-	0.03	0.96
<i>IL1B</i>	rs12621220	0.98	NA	0.02	0.67	0.60
<i>SPI1</i>	rs3740689	0.02	0.46	0.16	0.92	NA
	rs3729989	0.30	0.04	-	0.54	0.23
<i>MMP2</i>	rs1005913	0.44	0.93	0.15	0.75	0.001

SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

-: Not enough families to complete the analyses

NA: SNP not available in this population

Table 7. Significant associations before correction with atopy

Gene	SNPs	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
<i>ERAPI</i>	rs13173167	0.03	0.02	0.03	0.92	0.38
	rs10050860	0.05	0.02	0.06	1.00	0.37
	rs13154629	0.04	0.02	0.06	0.84	0.29
	rs26618	0.09	0.01	0.10	0.64	0.60
	rs34753	0.02	0.63	0.63	0.59	0.19
	rs25866	0.44	0.86	0.12	0.21	0.02
	rs13160562	0.21	0.04	0.40	0.86	0.26
<i>BACE1</i>	rs522843	0.04	0.63	0.51	0.67	0.23
	rs560564	0.22	0.64	0.60	0.81	0.01
	rs473210	0.01	0.80	0.92	0.80	0.14
<i>BACE2</i>	rs2016240	0.83	0.84	0.03	0.17	0.08
	rs2837992	0.34	0.31	0.01	0.28	0.34
	rs2837998	0.75	0.35	0.05	0.57	0.31
	rs3787944	0.35	0.27	0.04	0.13	0.38
	rs6517653	1.00	0.65	0.04	0.25	0.07
	rs7510366	0.80	0.92	0.05	0.68	0.79
	rs914183	0.67	0.56	0.40	0.02	0.34
	rs7278659	0.65	0.78	-	0.30	0.05
	rs8133778	0.90	0.72	0.46	0.24	0.01
	rs2838002	0.85	0.72	0.46	0.24	0.01
	rs2006737	0.65	0.69	0.58	0.73	0.04
	rs2838000	0.83	0.26	0.37	0.21	0.02
	rs17175402	0.04	0.07	-	0.37	0.15
<i>IL1A</i>	rs2048874	0.37	NA	0.003	0.06	0.47
<i>IL1R1</i>	rs2287047	0.19	0.93	0.04	0.02	0.11
	rs2160227	0.95	0.22	0.25	0.02	0.71
	rs2287049	0.14	0.51	0.11	0.03	0.11
	rs3917225	0.23	0.35	0.25	0.01	0.05
	rs3917318	1.00	0.14	0.20	0.02	0.71
	rs4851547	0.50	0.25	0.29	0.00	NA
	rs10208708	0.68	0.04	0.35	0.17	0.21
	rs949963	0.69	0.04	0.35	0.17	0.21
	rs871657	0.75	0.04	0.50	0.17	0.21
	rs3917289	0.45	0.02	-	0.13	0.21
	rs3171845	0.41	0.02	-	0.22	0.21
	rs3732131	0.12	0.001	0.83	0.24	0.59
	rs3917329	0.46	0.05	-	0.15	0.15
	rs11123911	0.01	0.27	0.85	0.19	NA
	rs13001315	0.03	0.16	0.37	0.22	NA
	rs13035227	0.03	0.13	0.30	0.11	0.70
	rs6754776	0.02	0.13	0.24	0.12	0.44
<i>IL1RAP</i>	rs766442	0.92	0.02	0.34	0.85	0.17
	rs9290935	0.54	0.05	0.03	0.59	0.48
	rs1024940	0.31	0.12	0.90	0.02	0.96
	rs1559018	0.22	0.15	0.90	0.03	0.98
	rs3773990	0.29	0.50	-	0.02	0.30
	rs4320092	0.40	0.02	0.90	0.63	0.50

	rs6444444	0.01	0.98	0.67	0.65	0.97
	rs2885373	0.01	0.98	0.67	0.82	0.97
	rs12053868	0.02	0.88	0.74	0.13	0.65
	rs4687150	0.21	0.91	0.40	0.45	0.03
<i>IL1B</i>	rs10169916	0.43	NA	0.02	0.67	0.94
	rs4849127	0.29	NA	0.05	0.32	0.74
<i>INFG</i>	rs2069727	0.04	0.53	0.40	0.87	0.17
	rs2069718	0.04	0.42	0.07	0.62	0.68
<i>MMP2</i>	rs17301608	0.02	0.51	0.56	0.40	0.31
	rs9302671	0.03	0.57	0.65	0.36	0.30
	rs8054459	0.04	0.71	0.69	0.57	0.81
	rs1005913	0.54	0.50	0.04	0.79	0.01
<i>SPII</i>	rs3740689	0.005	0.68	0.10	0.04	0.03

SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

-: Not enough families to complete the analyses

NA: SNP not available in this population

Table 8. Significant associations before correction with allergic asthma

Gene	SNPs	SLSJ	EGEA	CAPPS	SAGE	BUSSELTON
<i>ERAP1</i>	rs27434	0.20	0.58	0.53	0.04	0.98
	rs30187	0.42	0.98	0.85	0.02	0.61
	rs13160562	0.87	0.02	-	0.91	0.14
	rs10050860	0.13	0.001	-	0.78	0.08
	rs13154629	0.11	0.001	-	0.56	0.10
	rs27042	0.88	0.27	0.14	0.39	0.03
	rs13173167	0.11	0.001	-	0.67	0.08
	rs28096	0.72	0.03	0.86	0.82	0.14
<i>BACE1</i>	rs473210	0.0003	0.65	0.05	0.43	0.97
	rs522843	0.003	0.60	0.03	0.81	0.99
	rs560564	0.03	0.42	-	0.17	0.54
	rs687740	0.04	0.88	0.08	0.38	0.42
<i>BACE2</i>	rs2016240	0.51	0.93	-	0.03	0.75
	rs6517653	0.57	0.87	-	0.05	0.64
	rs1541103	0.90	0.03	0.63	0.03	0.02
	rs914187	0.20	0.22	0.14	0.02	0.25
	rs2837981	0.09	0.04	-	0.14	0.11
	rs960230	0.07	0.02	-	0.41	0.04
	rs9975388	0.03	0.04	0.35	0.09	0.01
	rs17175402	0.01	0.24	-	0.51	0.10
	rs746064	0.03	0.46	-	0.90	0.05
	rs9983496	0.03	0.27	0.32	0.54	0.38
	rs2837992	0.04	0.13	0.06	0.12	0.17
	rs4818225	0.18	0.14	0.37	0.07	0.01
	rs2837998	0.12	0.13	0.35	0.29	0.03
	rs2838000	0.59	0.08	-	0.33	0.01
	rs1964927	0.23	0.28	0.21	0.29	0.03
	rs2838006	0.22	0.28	0.21	0.25	0.03
	rs4818226	0.31	0.25	0.47	0.16	0.02
	rs2837970	0.08	0.64	-	0.90	0.02
<i>IL13</i>	rs20541	0.24	0.05	-	0.50	0.49
	rs2243204	0.02	0.64	-	0.56	0.51
<i>IL1A</i>	rs2048874	0.51	NA	-	0.02	0.51
<i>IL1R1</i>	rs10184523	0.60	0.04	-	0.02	NA
	rs10187031	0.60	0.05	-	0.02	NA
	rs10208708	0.81	0.05	-	0.02	0.72
	rs1030021	0.44	0.49	-	0.002	0.61
	rs1558640	0.60	0.05	-	0.02	0.78
	rs1558641	0.60	0.04	-	0.02	0.78
	rs2110727	0.73	0.06	-	0.02	0.78
	rs2160227	0.50	0.59	-	0.01	0.63
	rs2287047	0.32	0.78	0.85	0.02	0.84
	rs2287048	0.60	0.04	-	0.02	0.73
	rs2287049	0.26	0.70	0.47	0.02	0.95
	rs35318065	0.58	0.06	-	0.02	NA
	rs3917304	0.44	0.49	-	0.01	0.63
	rs3917318	0.44	0.49	-	0.01	0.59

	rs871657	0.81	0.05	-	0.02	0.72
	rs949963	0.81	0.05	-	0.02	0.72
	rs2287048	0.60	0.04	-	0.02	0.73
	rs3732131	0.06	0.005	-	-	0.80
	rs3917329	0.41	0.04	-	0.18	0.87
<i>ILIRAP</i>	rs1024940	0.59	0.11	-	0.02	0.74
	rs10513854	0.14	0.78	-	0.01	0.71
	rs2193874	0.11	0.82	0.58	0.01	0.87
	rs2193875	0.62	0.83	-	0.02	0.93
	rs2241343	0.89	0.79	-	0.003	0.17
	rs3773986	0.31	0.68	-	0.02	0.60
	rs4687161	0.12	0.94	-	0.04	0.53
	rs4687163	0.55	0.85	-	0.04	0.59
	rs6781037	0.59	0.83	-	0.02	0.99
	rs7626795	0.13	0.43	-	0.01	0.27
	rs9290935	0.19	0.04	-	0.32	0.27
	rs4320092	0.35	0.04	1.00	0.41	0.31
	rs11714779	NA	0.85	-	-	0.05
	rs3773958	0.01	0.55	-	0.56	0.46
	rs6444444	0.01	0.50	-	0.87	0.51
	rs2885373	0.01	0.50	-	0.87	0.51
<i>INFG</i>	rs2069718	0.05	0.85	0.37	0.20	0.27
<i>MMP2</i>	rs17301608	0.01	0.05	0.56	0.25	0.22
	rs1005913	0.29	0.61	0.14	0.71	0.000
	rs16955194	0.61	0.88	-	-	0.04
	rs9302671	0.01	0.07	0.58	0.24	0.13
<i>SPII</i>	rs3740689	0.002	0.69	0.56	0.37	NA

SLSJ = Saguenay–Lac-Saint-Jean, EGEA = The Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, CAPPS = The Canadian Asthma Primary Prevention Study, SAGE = The Study of Asthma Genes and the Environment

-: Not enough families contributed to the test

NA: SNP not available in this population

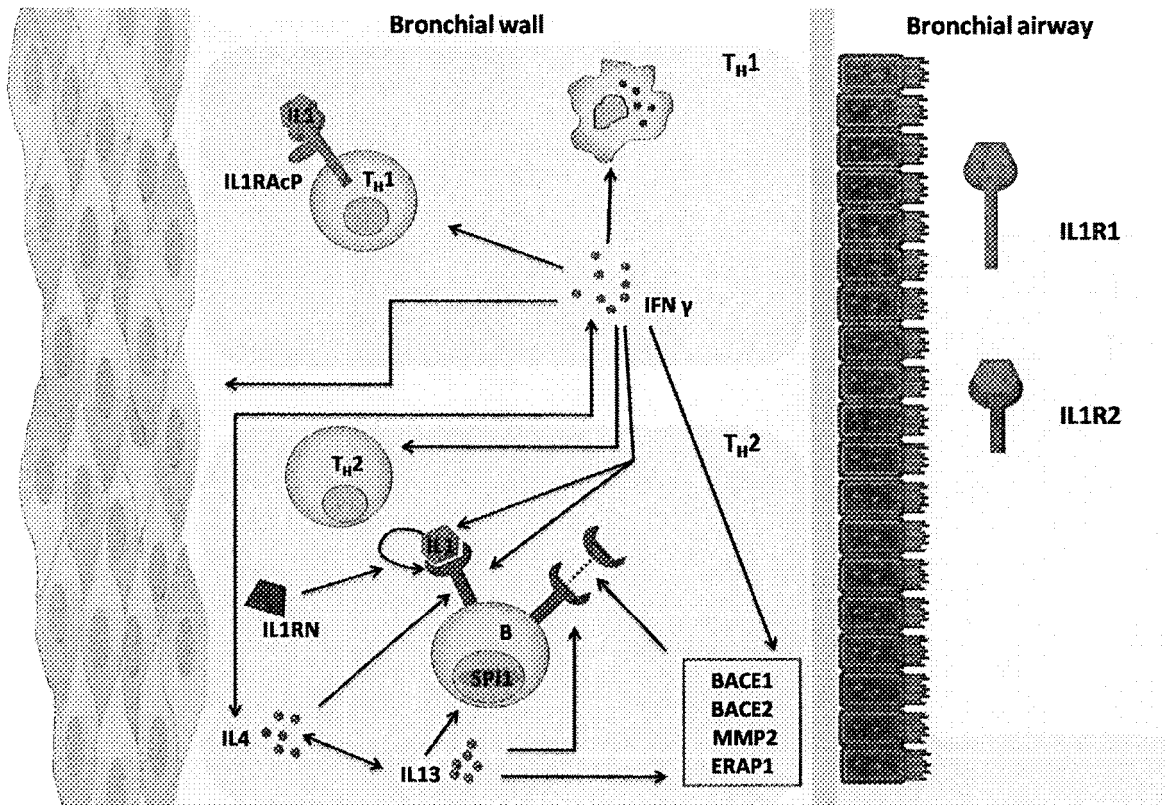


Figure 6 Schema of the proteins involved in the IL1R2 gene activities analyzed in this study

This figure represents the potential actions and interactions of genes involved in the *IL1R2* gene activities, in a bronchus of an asthmatic subject. The actions of each gene are represented by arrows. The upper panel shows possible involvement of IL1 and its receptor (IL1R1) in the T_H1 immune response and the bottom panel shows the actions of IL1R2 in the T_H2 immune response

CHAPITRE 3:

Discussion générale

Les résultats de cette étude ont permis d'obtenir des associations entre des gènes faisant partie de la voie biologique d'*IL1R2* et l'asthme, l'atopie et/ou l'asthme allergique. En effet, il existe une association significative entre les SNP situés dans les gènes *IL1R1*, *IL1RAP* et *BACE1* et l'asthme, *IL1A*, *IL1R1* et *SPI1* et l'atopie, ainsi que *ERAP1*, *BACE1*, *MMP2* et *SPI1* et l'asthme allergique (voir tables 3 à 5).

Les éléments qui seront discutés dans cette section visent à compléter les éléments discutés dans la section discussion de l'article présentés au chapitre 3 dans un contexte plus large. Ainsi, les principales raisons de l'absence de réplification stricte seront plus détaillées dans cette section.

4.1 Absence de réplification stricte

La principale limite de cette étude est que les gènes associés aux phénotypes reliés à l'asthme n'ont pas été associés dans tous les échantillons. Toutefois, plusieurs rapportent la difficulté d'obtenir une réplification stricte (même allèle du même gène pour un même phénotype). [78] Plusieurs paramètres peuvent expliquer la difficulté d'obtenir une réplification dans l'étude des traits complexes.

4.1.1 Origine de l'échantillon

Tout d'abord, les échantillons utilisés dans la présente étude étaient composés de familles provenant de différentes régions (Saguenay–Lac-St-Jean, Manitoba, Alberta, France, et Australie). La variabilité génétique (interaction G X G), la structure des populations ainsi que l'environnement (interactions G X E) sont différents d'une région à l'autre, et pourraient expliquer, du moins en partie, l'absence de réplification stricte des associations entre les différentes populations étudiées. [73, 133] Il est important de mentionner que la population du SLSJ a une structure bien particulière, dite à effet fondateur. Ainsi, elle est caractérisée par une faible variabilité génétique et une conservation de larges haplotypes. [134] Ce type de population est favorable lors d'étude de traits complexes puisque celui-ci améliore les chances d'identifier un polymorphisme

d'intérêt. [135] De plus, cette homogénéité apporte également une économie au niveau de coûts de génotypage. En effet, puisque les haplotypes contiennent plus d'allèles et s'étendent sur de plus grandes régions chromosomiques, le nombre de polymorphismes devant être choisis pour bien représenter les différentes régions du génome (TagSNP) est minimal.

4.1.2 Type d'échantillon

Le type d'échantillon est également différent, soit des collections familiales ou encore des cohortes cas-témoins. Ceci implique des différences dans la composition des études et il est possible de constater, entre autres, que les cohortes cas-témoins sont beaucoup plus sensibles à la stratification de la population que les échantillons familiaux. [67] Il faut également mentionner que le recrutement des échantillons familiaux n'a pas été fait de la même façon. En effet, les échantillons du SLSJ et EGEA ont été construits sur la base du recrutement d'un proband alors que les échantillons CAPPS et SAGE sont des cohortes où le recrutement a été fait chez les femmes enceintes où le risque d'avoir un enfant asthmatique était élevé (ayant un asthmatique apparenté ou encore deux individus apparentés souffrant d'une autre maladie de type allergique reliée aux IgE). Ainsi, même si les échantillons du SLSJ, EGEA, CAPPS et SAGE sont tous de type familial, leur composition n'est pas la même et il est possible de constater que la prévalence d'asthme est beaucoup plus faible dans les échantillons CAPPS et SAGE comparativement aux études SLSJ et EGEA, rendant ces études moins puissantes pour l'identification de « gènes d'asthme ». Donc, le type de l'étude ainsi que la méthode de recrutement influencent les résultats des associations génétiques et rendent la réplique stricte plus difficile.

4.1.3 Phénotype

Outre l'aspect génétique des échantillons utilisés, il y a également l'aspect phénotypique qui est à considérer. Les caractéristiques démographiques des échantillons, tels que l'âge des individus, le sexe de même que leur condition respiratoire n'est pas similaire d'une population à une autre. Par exemple, les membres de la famille composant la population EGEA souffrent d'asthme plus sévère que ceux de la population du SLSJ. Ainsi, un gène associé dans l'échantillon du SLSJ, mais pas dans celui de EGEA, tel que *BACE1*, pourrait ne pas être associé à l'asthme de façon générale, mais plutôt à l'asthme

léger qui est plus associé aux sensibilisations allergéniques. De plus, la proportion de personnes atteintes d'asthme allergique parmi les membres de la famille des échantillons du SLSJ et EGEA est plus élevée, ce qui pourrait également avoir une influence sur les associations. Le nombre de familles incluses dans les analyses pour chacun des échantillons est différent et influence donc la puissance statistique du test. En effet, si un plus petit nombre d'individus était inclus pour une association, il serait plus difficile de détecter une association significative pour un SNP à effet moindre.

En plus de la sévérité de l'asthme, l'âge pourrait également expliquer en partie les résultats différents d'un échantillon à l'autre. Les phénotypes d'asthme sont reconnus pour être différents entre les enfants et les adultes (« *childhood* versus *adulthood asthma* /*child-onset asthma* versus *adult-onset asthma* ») et de manière encore plus évidente entre les enfants eux-mêmes. [136] De plus, l'étude de van Wonderen, qui a répertorié plus de 60 définitions d'asthme chez les enfants dans les articles parus entre 1998 et 2008, démontre bien cette affirmation. [137] De façon générale, le système immunitaire est également différent selon l'âge de l'individu. Par exemple, l'intensité des lymphocytes T lors des réactions de synapses diminue ce qui rend la réponse immune moins intense. Les lymphocytes B sont également touchés puisqu'ils produisent moins d'anticorps chez les adultes. [138, 139] Cette diminution dans l'activité des lymphocytes amène une diminution de la production d'interleukines, par exemple l'IL1 et l'IL2. [140] On pourrait donc croire que la production d'IL1R2 est également compromise, soit directement, ou encore via la baisse de production de l'IL1. Ces différences dans la production d'IL1R2 chez les individus selon leur âge pourraient expliquer que les associations n'étaient pas répliquées. Par exemple, le gène *IL1RAP*, associé à l'asthme seulement dans l'échantillon SAGE, pourrait être en réalité associé à un asthme chez les enfants (*childhood asthma*) et non pas à l'asthme en général. En effet, une étude publiée récemment par Moffatt *et al.* a démontré que les associations génétiques les plus fortes sont celles reliées à un asthme infantile. [141]

4.1.4 Statistiques

La majorité des associations obtenues lors de cette étude n'ont pas résisté à la correction pour analyses multiples de type Bonferroni. En effet, 116 associations ayant une valeur p inférieure à 0,05 avaient été identifiées ($116 / (198 \times 5 \times 2) = 5,9\%$), alors qu'après correction, seulement 14 polymorphismes étaient toujours associés significativement ($14 / (198 \times 5 \times 2) = 0,7\%$). Le type d'échantillon utilisé, soit majoritairement des études familiales, peut expliquer pourquoi peu d'associations étaient significatives après l'application de la correction. Dans l'article de Haldar et *al.*, il a été démontré que ce type d'échantillon est sensible aux faux négatifs, ce qui peut indiquer que les valeurs p obtenues sont plus élevées qu'elles ne devraient l'être. [67] Ainsi, certaines associations n'ont peut-être pas pu résister à la correction en raison de leur valeur p plus élevée. Toutefois, comme le pourcentage de faux négatifs avant correction se situe à 5%, il est possible de croire que 0,9% des résultats étaient de vrais positifs. Ainsi, le nombre d'associations qui résiste à la correction de 0,7% semble comparable.

Les échantillons utilisés ont une puissance assez élevée pour ce genre d'étude puisque celle-ci a déjà été calculée par M. Lemire, mathématicien du Centre d'innovation Génome Québec et Université McGill, à l'aide d'un modèle de simulation en utilisant une prévalence d'asthme de 15 % et une fréquence allélique de 2,5 %. [142] Ces paramètres sont sévères, puisque la prévalence d'asthme observée dans les échantillons étudiés est d'environ 60 % et la fréquence allélique, selon les variants génétiques, est généralement au-dessus de 10 %. [143] Il s'est avéré que l'échantillon devait comprendre 200 individus pour être assez puissant et obtenir des associations significatives. De plus, ces simulations avaient été faites en 2000 alors que la collection familiale du SLSJ comprenait 600 individus alors que les échantillons utilisés dans cette étude comprennent tous plus de 700 sujets. Aussi, la puissance de l'association entre un SNP et une maladie est plus élevée lorsque le nombre de famille utilisée pour le test est supérieur à 35 et que la fréquence de l'allèle associé se situe entre 5 et 50 %. Pour la presque totalité des associations, le nombre de trios qui ont participé à l'analyse est largement suffisant. Il y a seulement quelques exceptions, au niveau des cohortes CAPPS et SAGE, pour lesquelles les résultats ont été

mis de côté en raison d'un nombre trop faible de familles contribuant aux tests (inférieur à 20).

4.2 Interprétation générale

Cette étude démontre que l'approche par voie biologique peut être une méthode complémentaire à la méthode par gènes candidats. En effet, si aucune association significative n'est obtenue pour un gène X dans le cadre d'une approche par gènes candidats, celui-ci ainsi que ses partenaires d'interaction seront sans doute mis de côté. Or, avec une approche par voie biologique, les gènes présents dans la voie du gène X seront peut-être associés et ainsi l'ensemble de ces gènes sera pris en considération dans de futures expérimentations. En plus des explications fournies précédemment, le fait que l'asthme soit une maladie ayant une multitude de gènes à moindre effet influençant son développement (polygénique), combiné au fait que les échantillons sont de natures différentes, sont des arguments qui appuient le fait que les gènes ne soient pas associés dans tous les échantillons. De plus, cette étude démontre qu'il serait possible de définir de façon plus précise et sur une base génétique, les différents phénotypes d'asthme. Par exemple, certains gènes associés seulement dans un échantillon d'asthmatiques plus léger pourraient devenir des critères pour définir un asthme plus léger. Ceci souligne également l'importance de mener les analyses dans différentes populations, les plus comparables possible, afin d'être certain d'avoir la bonne information du polymorphisme concernant l'effet ainsi que le sens de cet effet. Une vue d'ensemble du trait est avantageuse en plus de cibler des populations où le trait complexe est représenté par le phénotype le plus uniforme possible dans le spectre possible de représentation phénotypique (phénotypage fin).

4.3 Perspectives

Cette étude a permis de déterminer que les gènes reliés aux activités d'*IL1R2* étaient impliqués dans l'asthme. Afin de mieux comprendre de quelle manière ce gène intervient dans le développement de l'asthme, des études de génétique fonctionnelle sont nécessaires. Pour ce faire, le séquençage du gène ainsi que des études fonctionnelles mesurant le taux de production de la protéine IL1R2 (en conditions basales et suite à une stimulation avec les interleukines 1 β , 4 et 13) chez des asthmatiques et chez des témoins sont en cours. De plus,

comme l'environnement à un impact important au niveau de cette maladie, l'étude de la méthylation de l'ADN du gène *IL1R2* serait intéressante. Ces nouvelles informations permettront d'avoir une meilleure caractérisation du gène *IL1R2* et ainsi de mieux comprendre son rôle dans l'asthme.

De plus, il serait pertinent de s'intéresser aux gènes les plus prometteurs suite aux études d'associations, par exemple *BACE1* et *IL1R1*. Le séquençage de ces gènes pourrait permettre d'identifier d'autres mutations qui pourraient être associées à l'asthme. De plus, des études fonctionnelles aideraient à caractériser l'effet de ces mutations sur l'activité protéique et permettraient de comprendre par quels mécanismes les protéines codées par ces gènes interagissent avec *IL1R2*. Ainsi, l'asthme serait mieux caractérisé et une nouvelle médication plus adaptée à chaque individu pourrait être développée.

CHAPITRE 4:

Références

1. Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR: Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* 2009, 181(9):E181-190.
2. Ganong WF: Physiologie médicale, 2nd edn. Bruxelles: De Boeck université; 2005.
3. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R: Global Burden of Asthma. In.: Global Initiative for Asthma; 2004.
4. Statistique-Canada. Asthme, selon le sexe, provinces et les territoires Updated on: November 11th 2009. Cited on: 2010 January 15th, [<http://www40.statcan.gc.ca/l02/cst01/demo02a-fra.htm>]
5. Chapel H, Haeney M, Misbah S, Snowden N: Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques, 4 edn. Bruxelles: De Boeck Université; 2004.
6. Maddox L, Schwartz DA: The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med* 2002, 53:477-498.
7. Handoyo S, Rosenwasser LJ: Asthma phenotypes. *Current Allergy And Asthma Reports* 2009, 9(6):439-445.
8. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE: Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 2004, 113(1):101-108.
9. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Bruijnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P *et al*: A revised nomenclature for allergy. . *Allergy* 2001, 56(9):813-824.
10. Haahtela T, Heiskala M, Suoniemi I: Allergic disorders and immediate skin test reactivity in Finnish adolescents. *Allergy* 1980, 35(5):433-441.
11. Roitt IM, Brostoff J, Male D: Immunologie, 4th edn. Paris: De Boeck Université; 2007.
12. Herxheimer H: The late bronchial reaction in induced asthma. *International archives of allergy and applied immunology* 1952, 3(4):323-328.
13. O'Byrne P: Asthma pathogenesis and allergen-induced late responses. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 1998, 102(5):S85-89.
14. Bjornson CL, Mitchell I: Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gend Specif Med* 2000, 3(8):57-61.
15. Meurer JR, George V, Subichin S, Yauck J, Layde P: Asthma severity among children hospitalized in 1990 and 1995. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 2000, 154(2):143-149.
16. Chen Y, Stewart P, Johansen H, McRae L, Taylor G: Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol* 2003, 56(2):180-187.
17. Chen Y, Dales R, Stewart P, Johansen H, Scott G, Taylor G: Hospital readmissions for asthma in children and young adults in Canada. *Pediatr Pulmonol* 2003, 36(1):22-26.
18. Dales R, Liu L, Wheeler AJ, Gilbert NL: Quality of indoor residential air and health. *CMAJ* 2008, 179(2):147-152.
19. Gilliland FD, Islam T, Berhane K, Gauderman WJ, McConnell R, Avol E, Peters JM: Regular smoking and asthma incidence in adolescents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2006, 174(10):1094-1100.
20. Chen CH, Xirasagar S, Lin HC: Seasonality in adult asthma admissions, air pollutant levels, and climate: a population-based study. *J Asthma* 2006, 43(4):287-292.
21. Bakerly ND, Moore VC, Vellore AD, Jaakkola MS, Robertson AS, Burge PS: Fifteen-year trends in occupational asthma: data from the Shield surveillance scheme. *Occup Med (Lond)* 2008, 58(3):169-174.
22. Almqvist C, Egmar AC, Hedlin G, Lundqvist M, Nordvall SL, Pershagen G, Svartengren M, van Hage-Hamsten M, Wickman M: Direct and indirect exposure to pets - risk of

- sensitization and asthma at 4 years in a birth cohort. *Clinical and Experimental Allergy* 2003, 33(9):1190-1197.
23. Henriksen AH, Holmen TL, Bjermer L: Sensitization and exposure to pet allergens in asthmatics versus non-asthmatics with allergic rhinitis. *Respir Med* 2001, 95(2):122-129.
 24. Lemanske RF, Jr., Busse WW: Asthma: Factors underlying inception, exacerbation, and disease progression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2006, 117(2 Suppl Mini-Primer):S456-461.
 25. Koppelman GH, Los H, Postma DS: Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *Eur Respir J* 1999, 13(1):2-4.
 26. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J *et al*: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102(30):10604-10609.
 27. Kroegel C, Virchow JC, Jr., Luttmann W, Walker C, Warner JA: Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *European Respiratory Journal* 1994, 7(3):519-543.
 28. Coico R, Sunshine G: Immunology, 6th edn. New Jersey: John Wiley & Son's Inc; 2009.
 29. Dunnill MS: The pathology of asthma. *Ciba Foundation Study Group* 1971, 38:35-46.
 30. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: Mast cells. *Physiological Reviews* 1997, 77(4):1033-1079.
 31. Naylor B: The shedding of the mucosa of the bronchial tree in asthma. *Thorax* 1962, 17:69-72.
 32. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T: Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992, 101(4):916-921.
 33. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989, 1(8637):520-524.
 34. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ: Airway remodeling in asthma. *The Journal Of Clinical Investigation* 1999, 104(8):1001-1006.
 35. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A: The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *The American Review Of Respiratory Disease* 1993, 147(2):405-410.
 36. Tremblay K: Comparaison de différentes approches méthodologiques dans l'identification de déterminants génétiques de susceptibilité ou de protection pour l'asthme Chicoutimi: Université Laval; 2009.
 37. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T: Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *The American Review Of Respiratory Disease* 1985, 131(4):599-606.
 38. Ordonez C, Ferrando R, Hyde DM, Wong HH, Fahy JV: Epithelial desquamation in asthma: artifact or pathology? *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2000, 162(6):2324-2329.
 39. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB: Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *The American Review Of Respiratory Disease* 1989, 140(6):1745-1753.
 40. Barnes PJ, Rodger IW, Thomson NC: Asthma: basic mechanisms and clinical management, 3th edn. London: Academic Press; 1998.
 41. Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, Boutet M: Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 1997, 112(1):45-52.
 42. Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M: Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 1999, 160(2):725-729.

43. Laitinen A, Altraja A, Kampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA: Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 1997, 156(3 Pt 1):951-958.
44. Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C, Tillie I, Hartmann D, Wallaert B, Tonnel AB, Lafuma C: Contribution of 92 kDa gelatinase/type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 1999, 159(4 Pt 1):1298-1307.
45. Prikk K, Maisi P, Piriälä E, Reintam M-A, Salo T, Sorsa T, Sepper R: Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods And Pathology* 2002, 82(11):1535-1545.
46. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, Mautino G, D'Accardi P, Bousquet J, Bonsignore G: Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 1998, 158(6):1945-1950.
47. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y, Iwata M, Noda Y, Takagi K, Nakashima N, Torii K: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *The Journal Of Asthma: Official Journal Of The Association For The Care Of Asthma* 2001, 38(6):477-484.
48. Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW: Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 2003, 111(6):1345-1352.
49. Cataldo DD, Bettiol J, Noël A, Bartsch P, Foidart J-M, Louis R: Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. *Chest* 2002, 122(5):1553-1559.
50. Johnson PR: Role of human airway smooth muscle in altered extracellular matrix production in asthma. *Clinical And Experimental Pharmacology & Physiology* 2001, 28(3):233-236.
51. Hakonarson H, Maskeri N, Carter C, Grunstein MM: Regulation of TH1- and TH2-type cytokine expression and action in atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *The Journal Of Clinical Investigation* 1999, 103(7):1077-1087.
52. Joubert P, Lajoie-Kadoch S, Labonté I, Gounni AS, Maghni K, Wellemans V, Chakir J, Laviolette M, Hamid Q, Lamkhieoued B: CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *Journal Of Immunology* 2005, 175(4):2702-2708.
53. James AJ: Relationship between airway wall thickness and airway hyperresponsiveness In: *Airway Wall Remodelling in Asthma*. Edited by Stewart AG. Boca Raton: CRC Press; 1997: 1-27.
54. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H: The genetics of asthma and allergic disorders. *Discovery medicine* 2011, 11(56):35-45.
55. Risch N, Merikangas K: The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996, 273(5281):1516-1517.
56. Bossé Y, Lemire M, Poon AH, Daley D, He J-Q, Sandford A, White JH, James AL, Musk AW, Palmer LJ *et al*: Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respiratory Research* 2009, 10:98-98.
57. Goldstein JL, Brown MS: Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science* 2001, 292(5520):1310-1312.
58. Lee SH, Park JS, Park CS: The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy, asthma & immunology research* 2011, 3(4):236-244.

59. Hardy J, Singleton A: Genomewide association studies and human disease. *The New England journal of medicine* 2009, 360(17):1759-1768.
60. Bourgain C, Genin E, Cox N, Clerget-Darpoux F: Are genome-wide association studies all that we need to dissect the genetic component of complex human diseases? *European journal of human genetics : EJHG* 2007, 15(3):260-263.
61. Cheung VG, Spielman RS, Ewens KG, Weber TM, Morley M, Burdick JT: Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association. *Nature* 2005, 437(7063):1365-1369.
62. Chamberland A, Madore A-M, Tremblay K, Laviolette M, Laprise C: A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Experimental Lung Research* 2009, 35(5):399-410.
63. Izuhara K, Saito H: Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergology International: Official Journal Of The Japanese Society Of Allergology* 2006, 55(4):361-367.
64. Laprise C, Sladek R, Ponton A, Bernier MC, Hudson TJ, Laviolette M: Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* 2004, 5(1):21.
65. Patel AC: Basic science for the practicing physician: gene expression microarrays. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008, 101(3):325-332.
66. Rolph MS, Sisavanh M, Liu SM, Mackay CR: Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. *Pharmacol Ther* 2006, 109(1-2):284-294.
67. Halder T, Ghosh S: Power comparison between population-based case-control studies and family-based transmission-disequilibrium tests: An empirical study. *Indian J Hum Genet* 2011, 17 Suppl 1:S27-31.
68. Ferrari M, Tardivo S, Zanolin ME, Olivieri M, Lampronti G, Biasin C, Poli A, Balestreri F, de Marco R, Lo Cascio V: Serious childhood respiratory infections and asthma in adult life. A population based study. ECRHS Italy. European Community Respiratory Health Survey. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 1999, 83(5):391-396.
69. James AL, Knuiman MW, Bartholomew HC, Musk ABW: What can Busselton population health surveys tell us about asthma in older people? *The Medical Journal Of Australia* 2005, 183(1 Suppl):S17-S19.
70. Chan-Yeung M, Ferguson A, Watson W, Dimich-Ward H, Rousseau R, Lilley M, Dybuncio A, Becker A: The Canadian Childhood Asthma Primary Prevention Study: outcomes at 7 years of age. *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* 2005, 116(1):49-55.
71. Simundic AM: Methodological issues of genetic association studies. *Clin Chem Lab Med* 2010, 48 Suppl 1:S115-118.
72. Kauffmann F, Dizier MH: EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy)--design issues. EGEA Co-operative Group. *Clinical And Experimental Allergy: Journal Of The British Society For Allergy And Clinical Immunology* 1995, 25 Suppl 2:19-22.
73. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, Hudson TJ: Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* 2004, 170(9):967-973.
74. Lawrence S, Beasley R, Doull I, Begishvili B, Lampe F, Holgate ST, Morton NE: Genetic analysis of atopy and asthma as quantitative traits and ordered polychotomies. *Annals of Human Genetics* 1994, 58(Pt 4):359-368.
75. Steinke JW, Rich SS, Borish L: Genetics of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, 121(2 Suppl):S384-387.

76. Vercelli D: Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology* 2008, 8(3):169-182.
77. Madore A-M, Laprise C: Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy* 2010, 3:107-121.
78. Ober C, Hoffjan S: Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes and Immunity* 2006, 7(2):95-100.
79. Hizawa N: Genetic backgrounds of asthma and COPD. *Allergology International* 2009, 58(3):315-322.
80. Male D: Immunology: an illustrated outline, 4th edn. London: Mosby; 2004.
81. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, 87(6):2095-2147.
82. Mizel SB: The interleukins. *FASEB Journal* 1989, 3(12):2379-2388.
83. Dinarello CA: The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20(5 Suppl 27):S1-13.
84. Mora M, Carinci V, Bensi G, Raugei G, Buonamassa DT, Melli M: Differential expression of the human IL-1 alpha and beta genes. *Progress in Clinical and Biological Research* 1990, 349:205-216.
85. Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM, Lovett DH: Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *Journal of Cellular Physiology* 1992, 152(2):223-231.
86. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K: Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990, 87(14):5548-5552.
87. Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH: The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90(15):7245-7249.
88. Aymeric J-L, Lefranc G: Immunologie humaine. Bruxelles: De Boeck; 2009.
89. Grignani G, Maiolo A: Cytokines and hemostasis. *Haematologica* 2000, 85(9):967-972.
90. Isoda K, Kamezawa Y, Tada N, Sato M, Ohsuzu F: Myocardial hypertrophy in transgenic mice overexpressing human interleukin 1alpha. *J Card Fail* 2001, 7(4):355-364.
91. Esmon CT: Possible involvement of cytokines in diffuse intravascular coagulation and thrombosis. *Baillieres Clin Haematol* 1994, 7(3):453-468.
92. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J: A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *European Journal of Clinical Investigation* 1992, 22(6):396-402.
93. Manica-Cattani MF, Bittencourt L, Rocha MIU, Algarve TD, Bodanese LC, Rech R, Machado MM, Santos GFF, Gottlieb MG, Schwanke CHA *et al*: Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009, 314(1):84-89.
94. Mfunu Endam L, Cormier C, Bossé Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M: Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Archives Of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 2010, 136(2):187-192.
95. Han W, Kang SY, Kang D, Park SK, Lee JY, Kim H, Park AK, Noh DY: Multiplex genotyping of 1107 SNPs from 232 candidate genes identified an association between IL1A polymorphism and breast cancer risk. *Oncology reports* 2010, 23(3):763-769.
96. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK: Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86(22):8946-8950.

97. Shirakawa F, Tanaka Y, Ota T, Suzuki H, Eto S, Yamashita U: Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cells. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1987, 138(12):4243-4248.
98. Auron PE: The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1998, 9(3-4):221-237.
99. Mizel SB, Kilian PL, Lewis JC, Paganelli KA, Chizzonite RA: The interleukin 1 receptor. Dynamics of interleukin 1 binding and internalization in T cells and fibroblasts. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1987, 138(9):2906-2912.
100. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C: The interleukin 1 receptor family. *Developmental & Comparative Immunology* 2004, 28(5):415-428.
101. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95(2):588-593.
102. Gay NJ, Keith FJ: Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991, 351(6325):355-356.
103. Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK: Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275(7):4670-4678.
104. Labriola-Tompkins E, Chandran C, Varnell TA, Madison VS, Ju G: Structure-function analysis of human IL-1 alpha: identification of residues required for binding to the human type I IL-1 receptor. *Protein Engineering* 1993, 6(5):535-539.
105. Gruetter MG, van Oostrum J, Priestle JP, Edelmann E, Joss U, Feige U, Vosbeck K, Schmitz A: A mutational analysis of receptor binding sites of interleukin-1 beta: differences in binding of human interleukin-1 beta muteins to human and mouse receptors. *Protein Engineering* 1994, 7(5):663-671.
106. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G: Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal Of Biological Chemistry* 1995, 270(23):13757-13765.
107. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86(7):2336-2340.
108. Martin M, Resch K: Interleukin 1: more than a mediator between leukocytes. *Trends in Pharmacological Sciences* 1988, 9(5):171-177.
109. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, Dinarello CA, Nerup J: Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 1994, 19(3):169-178.
110. Clay FE, Cork MJ, Tarlow JK, Blakemore AI, Harrington CI, Lewis F, Duff GW: Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism association with lichen sclerosis. *Human Genetics* 1994, 94(4):407-410.
111. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, Duff GW: Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Human Genetics* 1993, 91(4):403-404.
112. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *The EMBO Journal* 1991, 10(10):2821-2832.
113. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993, 261(5120):472-475.

114. Liu C, Hart RP, Liu XJ, Clevenger W, Maki RA, De Souza EB: Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271(34):20965-20972.
115. Chang SY, Su PF, Lee TC: Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1alpha pathway. *Cytokine* 2009, 45(1):32-38.
116. Symons JA, Young PR, Duff GW: Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, 92(5):1714-1718.
117. Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU: The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1998, 161(12):6871-6877.
118. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 1994, 15(12):562-566.
119. Bourke E, Cassetti A, Villa A, Fadlon E, Colotta F, Mantovani A: IL-1 beta scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils. *Journal Of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2003, 170(12):5999-6005.
120. Trowbridge IS, Collawn JF, Hopkins CR: Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annual Review Of Cell Biology* 1993, 9:129-161.
121. Bellehumeur C, Blanchet J, Fontaine JY, Bourcier N, Akoum A: Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. *Human Reproduction (Oxford, England)* 2009, 24(9):2193-2204.
122. Bristulf J, Gatti S, Malinowsky D, Bjork L, Sundgren AK, Bartfai T: Interleukin-1 stimulates the expression of type I and type II interleukin-1 receptors in the rat insulinoma cell line Rinn5F; sequencing a rat type II interleukin-1 receptor cDNA. *European Cytokine Network* 1994, 5(3):319-330.
123. Giri JG, Newton RC, Horuk R: Identification of soluble interleukin-1 binding protein in cell-free supernatants. Evidence for soluble interleukin-1 receptor. *The Journal Of Biological Chemistry* 1990, 265(29):17416-17419.
124. Vannier E, Ye K, Fenton M, Sims J, Dinarello C: IL-1 receptor type II gene expression: A role for PU.1. *Cytokine* 1995, 7:596.
125. Mercer F, Kozhaya L, Unutmaz D: Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells. *Plos One* 2010, 5(1):e8639-e8639.
126. Kitaya K, Yasuo T, Yamaguchi T, Fushiki S, Honjo H: Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *International Journal of Molecular Medicine* 2007, 20(5):689-697.
127. Orlando S, Matteucci C, Fadlon EJ, Buurman WA, Bardella MT, Colotta F, Introna M, Mantovani A: TNF-alpha, unlike other pro- and anti-inflammatory cytokines, induces rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human myelomonocytic cells. *Journal Of Immunology* 1997, 158(8):3861-3868.
128. Colotta F, Re F, Muzio M, Polentarutti N, Minty A, Caput D, Ferrara P, Mantovani A: Interleukin-13 induces expression and release of interleukin-1 decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 1994, 269(17):12403-12406.
129. Orencole SF, Fantuzzi G, Vannier E, Dinarello CA: Circulating levels of IL-1 soluble receptors in health and after endotoxin or IL-2. *Cytokine* 1995, 7:542.
130. Giri JG, Wells J, Dower SK, McCall CE, Guzman RN, Slack J, Bird TA, Shanebeck K, Grabstein KH, Sims JE: Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential

- role for type II receptor in regulation of IL-1 responses. *Journal Of Immunology* 1994, 153(12):5802-5809.
131. van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Vannier E, van Dalen R, Pesman G, Bartelink AK, Dinarello CA, van der Meer JW: The pattern of interleukin-1beta (IL-1beta) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections. *Blood* 1997, 90(3):1101-1108.
 132. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufer A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M *et al*: Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 2002, 360(9331):465-466.
 133. Lopez Herraez D, Bauchet M, Tang K, Theunert C, Pugach I, Li J, Nandineni MR, Gross A, Scholz M, Stoneking M: Genetic variation and recent positive selection in worldwide human populations: evidence from nearly 1 million SNPs. *PLoS One* 2009, 4(11):e7888.
 134. Scriver CR: Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annual Review Of Genomics And Human Genetics* 2001, 2:69-101.
 135. Heyer E, Tremblay M, Desjardins B: Seventeenth-century European origins of hereditary diseases in the Saguenay population (Quebec, Canada). *Human Biology; An International Record Of Research* 1997, 69(2):209-225.
 136. Le Souef PN: Variations in genetic influences on the development of asthma throughout childhood, adolescence and early adult life. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006, 6(5):317-322.
 137. Van Wonderen KE, Van Der Mark LB, Mohrs J, Bindels PJ, Van Aalderen WM, Ter Riet G: Different definitions in childhood asthma: how dependable is the dependent variable? *Eur Respir J* 2010, 36(1):48-56.
 138. Haynes L, Maue AC: Effects of aging on T cell function. *Curr Opin Immunol* 2009, 21(4):414-417.
 139. McElhaney JE, Effros RB: Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol* 2009, 21(4):418-424.
 140. Inamizu T, Chang MP, Makinodan T: Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice. *Immunology* 1985, 55(3):447-455.
 141. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson WO: A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010, 363(13):1211-1221.
 142. Borenstein M, Kane J, Buchbinder J: Monte Carlo simulation of statistical power. *Psychopharmacology Bulletin* 1987, 23(2):300-302.
 143. Tremblay K: Étude d'association entre certains gènes candidats et l'asthme dans une cohorte familiale originaire du Saguenay-Lac-Saint-Jean : réflexion sur l'analyse d'interaction gène-gène. *Master thesis*. Chicoutimi, Ste-Foy; 2003.

