

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude d'association entre l'asthme et le gène  
*plasminogen activator, urokinase*  
dans la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean**

par  
Philippe Bégin

Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en sciences biomédicales

janvier, 2008



© Philippe Bégin, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude d'association entre l'asthme et le gène  
*plasminogen activator, urokinase*  
dans la population du Saguenay-Lac-Saint-Jean

présenté par :

Philippe Bégin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Karim Maghni, président-rapporteur  
Catherine Laprise, directeur de recherche  
Céline Bergeron, membre du jury



## Résumé

**INTRODUCTION:** L'activateur du plasminogène type urokinase interagit avec son récepteur sur les cellules inflammatoires et migratrices pour moduler la protéolyse extracellulaire, l'adhésion et l'activation cellulaires. Il est essentiel au développement d'une réponse immunitaire appropriée et est impliqué dans le remodelage tissulaire. Le gène *plasminogen activator, urokinase* (PLAU), codant pour cet enzyme, est situé en chromosome 10q24, une région génomique ayant démontré un déséquilibre de liaison pour l'asthme dans un échantillon familial du Saguenay–Lac-Saint-Jean. Nous posons ici l'hypothèse que le gène PLAU agirait comme un modulateur de la susceptibilité à l'asthme.

**MÉTHODE:** Le gène PLAU a été séquencé et ses variants analysés pour associations génétiques avec des traits liés à l'asthme dans l'échantillon familial du Saguenay–Lac-Saint-Jean (231 familles, 1139 sujets). Deux cohortes additionnelles ont été étudiées pour valider les observations (CAPPS, 238 trios, et SAGE, 237 trios).

**RÉSULTATS:** Dans l'échantillon original, selon un modèle dominant, les allèles rs2227564C (P141) et rs2227566T ont été associés avec l'asthme ( $p = 0.011$ ;  $p = 0.045$ ) et l'hyperréactivité bronchique (HRB) ( $p = 0.026$ ;  $p = 0.038$ ). L'haplotype fréquent était également associé à l'asthme, l'atopie et l'HRB ( $p = 0.031$ ;  $p = 0.043$ ;  $p = 0.006$ ). Bien qu'aucune association significative n'ait été détectée pour les polymorphismes individuels dans la cohorte CAPPS, une association négative a été observée dans la cohorte SAGE entre l'allèle rs4065C et l'atopie selon des modèles additif ( $p = 0.005$ ) et dominant ( $p = 0.0001$ ).

**CONCLUSION:** Ces résultats suggèrent un rôle pour la voie biologique de l'urokinase dans la pathogenèse de l'asthme.

**Mots-clés :** asthme, hyperréactivité bronchique, atopie, étude d'association, test de déséquilibre de transmission (TDT), haplotypes, urokinase, PLAU, 10q24, activation du plasminogène.

## Abstract

**RATIONALE:** Urokinase plasminogen activator interacts with its receptor on inflammatory and migrating cells to regulate extracellular matrix degradation, cell adhesion and inflammatory cell activation. It is necessary for the development of an appropriate immune response and is involved in tissue remodeling. The plasminogen activator, urokinase (PLAU) gene codes for this enzyme and is located on chromosome 10q24. This region has demonstrated evidence for linkage in a genome scan for asthma in a sample from northeastern Quebec. Here, we hypothesized that PLAU may function as a regulator of asthma susceptibility. **METHOD:** We sequenced PLAU and tested for genetic association between identified variants and asthma related traits in a French-Canadian family collection (231 families, 1139 subjects). Additional studies were carried out in two other family-based Canadian cohorts (CAPPS, 238 trios, and SAGE, 237 trios).

**RESULTS:** In the original sample, under dominant model, the common alleles rs2227564C (P141) and rs2227566T were associated with asthma ( $p = 0.011$ ;  $p = 0.045$ ) and with airway hyperresponsiveness (AHR) ( $p = 0.026$ ;  $p = 0.038$ ). Analysis of the linkage disequilibrium pattern also revealed association of the common haplotype for asthma, atopy and AHR ( $p = 0.031$ ;  $p = 0.043$ ;  $p = 0.006$ ). Whereas no significant association was detected for single PLAU SNPs in the CAPPS cohort, association was observed in the SAGE cohort between the rs4065C allele and protection from atopy in additive ( $p = 0.005$ ) and dominant ( $p = 0.0001$ ) genetic models.

**CONCLUSION:** This suggests a role for the urokinase plasminogen activation pathway in the pathogenesis of asthma.

**Key words:** asthma, airway hyperresponsiveness, atopy, association study, transmission disequilibrium test (TDT), haplotypes, urokinase, PLAU, 10q24, plasminogen activation.

## Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RERMERCIEMENTS</b> .....	<b>xi</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>4</b>
<b>1. DÉFINITION DE L'ASTHME</b> .....	<b>4</b>
<b>2. GÉNÉTIQUE DE L'ASTHME</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Les approches</i> .....	<b>6</b>
2.2 <i>Les méthodes d'analyse</i> .....	<b>8</b>
2.3 <i>Études d'expression génique</i> .....	<b>9</b>
2.5 <i>Études d'association et de liaison génétique</i> .....	<b>12</b>
2.6 <i>Interactions gène-gène</i> .....	<b>12</b>
2.7 <i>Interactions gène-environnement</i> .....	<b>13</b>
2.8 <i>Voies biologiques communes</i> .....	<b>14</b>
<b>3. SYSTÈME D'ACTIVATION DU PLASMINOGÈNE</b> .....	<b>15</b>
3.1 <i>Les enzymes protéolytiques dans l'asthme</i> .....	<b>15</b>
3.2 <i>Le système d'activation du plasminogène (PAS) dans l'asthme</i> .....	<b>23</b>
3.2.1 <i>Le PAS dans le processus inflammatoire</i> .....	<b>28</b>
3.2.3 <i>Le PAS dans le remodelage bronchique</i> .....	<b>34</b>
3.2.4 <i>Le PAS dans l'hyperréactivité bronchique</i> .....	<b>37</b>
<b>ARTICLE</b> .....	<b>39</b>
<b>SUPPLÉMENT EN LIGNE</b> .....	<b>73</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>95</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>104</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>xii</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Clinical characteristics of the SLSJ familial sample subjects .....	62
Tableau 2. Clinical characteristics of the CAPPS and SAGE cohorts subjects .....	63
Tableau 3. Genotyped SNPs characteristics.....	64
Tableau 4. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the SLSJ familial sample ..	65
Tableau 5. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the SLSJ familial sample.....	66
Tableau 6. Common haplotypes found in the linkage disequilibrium block listed with their frequency.....	67
Tableau 7. Family-based association test results between the PLAU haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models for the SLSJ familial sample .....	68
Tableau 8. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the SAGE cohort.....	69
Tableau 9. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the SAGE cohort.....	70
Tableau E1. Oligonucleotides and annealing temperatures used for amplification of sequenced fragments .....	84
Tableau E2. Oligonucleotides used in FP-TDI genotyping assays .....	85
Tableau E3. Allele frequencies stratified by ethnicity in the CAPPS and SAGE cohorts .....	86
Tableau E4. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the CAPPS cohort ...	87
Tableau E5. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the CAPPS cohort ..	88
Tableau E6. Family-based association test results between PLAU haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the CAPPS cohort .....	89

Tableau E7. Family-based association test results between PLAU haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the SAGE cohort .....	90
Tableau E8. Family-based association test results between PLAU 4-SNP haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the SLSJ familial sample .....	91
Tableau E9. Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes and under the additive and dominant models for the combined CAPPS and SAGE cohorts .....	92
Tableau E10. Family-based association test results between PLAU haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models for the combined CAPPS and SAGE cohorts .....	93



## Liste des figures

Figure R1. Système d'activation du plasminogène.....	24
Figure R2. Rôle central de la plasmine dans l'asthme.....	29
Figure 1. <i>PLAU</i> gene sequenced region and identified SNPs scaled location.....	71
Figure 2. Pairwise linkage disequilibrium pattern of <i>PLAU</i> studied single nucleotide polymorphisms (SNPs). .....	72
Figure E1. Pairwise linkage disequilibrium pattern of <i>PLAU</i> (CAPPS, SAGE).....	94

## Liste des symboles et abréviations

$\alpha_2$ -AP	<i><math>\alpha_2</math>-antiplasmin</i>
ADN	Acide Désoxiribonucléique
AHR	<i>Airway Hyperresponsiveness</i>
AREs	<i>AU-rich elements</i>
ARN	Acide ribonucléique
CAGE	<i>Composite Atopy Gene Expression</i>
CAPPS	<i>Canadian Asthma Primary Prevention Study</i>
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
DEP	Débit expiratoire de pointe
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
FEV <sub>1</sub>	<i>Forced Expiratory Volume (1s)</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GM-GSF	<i>Granulocyte-Macrophage Growth Stimulating Factor</i>
HRB	Hyperréactivité bronchique
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine
INF	Interféron
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
kDa	kiloDalton
MAC	<i>Major Attack Complex</i>
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE	<i>Neutrophilic Elastase</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator inhibitor, type 1</i>
PAI-2	<i>Plasminogen Activator inhibitor, type 2</i>
PAR	<i>Protease Activated Receptor</i>
PAS	<i>Plasminogen Activation System</i>
PC <sub>20</sub> (met)	Concentration de méthacholine causant une chute de 20% du VEMS
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PEF	<i>Peak Expiratory Flow</i>
PLAU gène	<i>PLasminogen Activator Urokinase type</i>
PLAUR gène	<i>PLasminogen Activator Urokinase type Receptor</i>
QtL	<i>Quantative trait Loci</i>
SAGE	<i>Study of Asthma, Genes and Environment</i>
SERPIN	<i>Serine Protease Inhibitor</i>
SLSJ	Saguenay-Lac-Saint-Jean
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

TDT	<i>Transmission Desiquilibrium Test</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
Th	<i>T Helper</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
uPAR	<i>urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	<i>Ultra-violet</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VCAM	<i>Vascular Cellular Adhesion Molecule</i>
VEMS	<i>Volume expiratoire maximal en 1 seconde</i>

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier l'équipe du Centre de médecine génique communautaire de l'Université de Montréal (CMGC) situé au Centre de santé et de services sociaux de Chicoutimi : Tarek Bouhali, Annie Chamberland, Sébastien Claveau, Catherine Laprise, Anne-Marie Madore, Nadia Mior, Josianne Morin, Karine Tremblay, Nancy Tremblay et Denise Tremblay. Leur dynamisme et leur professionnalisme ont fait de mon passage au CMGC une expérience enrichissante tant sur le plan académique que personnel.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux organismes suivants pour leur soutien financier : le comité des stages d'été en recherche de l'Université de Montréal (COPSÉ), les compagnies pharmaceutiques du Canada (Rx&D), les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), la Fédération de recherche en Santé du Québec (FRSQ) et le Réseau d'excellence en recherche sur les allergies, les gènes et l'environnement (AllerGen).

Mes remerciements vont également à Peter Paré, Andrew Sandford et à l'ensemble des coauteurs de l'article pour leur collaboration précieuse, ainsi qu'à l'équipe de révision de l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, pour ses commentaires constructifs qui ont su augmenter grandement la qualité du manuscrit ci-présenté.

Merci à Gilles Bleau pour son aide administrative essentielle.

Une reconnaissance tout à fait particulière doit être donnée à ma directrice de maîtrise Catherine Laprise pour sa généreuse supervision tout au long de ce projet.

Enfin, merci aux pneumologues et pédiatres de même qu'à Muriel Grenon, responsable du recrutement et de l'évaluation de la fonction respiratoire, et à l'ensemble des participants, sans qui ce projet n'aurait pas été possible.

## Introduction

L'asthme constitue l'une des maladies chroniques les plus communes dans le monde et le fardeau social qui en découle est substantiel. À l'échelle planétaire, le nombre d'individus atteints d'asthme est estimé à 300 millions et le coût économique associé dépasserait ceux de la tuberculose et du VIH combinés (Masoli et al. 2004; OMS 2006). La maladie se caractérise par un remodelage et une inflammation chronique des voies respiratoires qui entraînent une hyperréactivité des bronches et le développement de symptômes (dyspnée, sibilances, toux, sensation d'oppression thoracique, etc) (Bousquet et al. 2000). Les bases génétiques de la maladie sont bien établies et ont été démontrées par des études de jumeaux (van Beijsterveldt et Boomsma 2007). Selon notre compréhension actuelle de sa transmission, l'asthme constituerait un trait complexe, résultant à la fois de l'interaction de l'environnement avec une multitude de variants génétiques, n'exerçant individuellement qu'un modeste effet sur le phénotype (Busse et Lemanske 2001). Selon une revue par Blumenthal (2005), 12 criblages génomiques (*genome screens*) complets et 2 incomplets ont été publiés, identifiant un total de 20 régions chromosomiques liées à l'asthme. Une revue récente par Ober et Hoffjan (2006) rapporte que plus d'une centaine de gènes auraient été associés à l'asthme et fait état d'un groupe de gènes élites répliqués dans plus de 10 études indépendantes. L'identification de nouveaux facteurs génétiques et l'évaluation de leur contribution aux processus de remodelage et d'inflammation constituent une étape importante dans la compréhension de la pathogenèse de l'asthme et dans le développement de stratégies de traitements mieux ciblées.

Les trois stratégies généralement employées dans l'identification des gènes de susceptibilité à un trait complexe sont le clonage positionnel, l'approche par gène candidat et la « *genome-wide association study*. » De nouvelles technologies sont également utilisées en ce sens, soit les micropuces d'ADN et les méthodes de calculs (*computational methods*) tel G2D « Genes to disease ». Ces différentes stratégies sont de surcroît fréquemment combinées, par exemple en sélectionnant des gènes candidats situés dans les régions identifiées par clonage positionnel (Ober et Moffatt 2000). C'est

ainsi que les régions en déséquilibre de liaison bien établi, notamment sur les chromosomes 5, 6, 11 et 12, ont été largement étudiées, à la recherche de gènes associés avec l'asthme (Blumenthal 2005). Des résultats récents tendent toutefois à suggérer que la région 10q24 serait également en déséquilibre de liaison (Laprise et al. 2003; Choudry et al. 2005). Cette région n'avait jusqu'à maintenant jamais été associée à l'asthme.

La technologie des micropuces à ADN est un autre outil efficace dans l'identification de gènes candidats. Une étude récente employant cette technologie a permis de démontrer une différence significative du patron d'expression de 74 gènes dont le gène *Plasminogen Activator Inhibitor type 2* (PAI-2), une enzyme protéolytique 11 fois plus exprimée dans le tissu bronchique de sujets asthmatiques (Laprise et al. 2004). La seule fonction connue de PAI-2 consiste à inhiber l'activateur du plasminogène type Urokinase (uPA), une sérine protéase codée par le gène PLA1 (10q24) et classiquement associée au processus de fibrinolyse.

La littérature actuelle semble indiquer qu'en plus du processus fibrinolytique, l'uPA, en interagissant avec son récepteur uPAR, modulerait plusieurs étapes de la cascade inflammatoire (Mondino et Blasi 2004). Dans les tissus périphériques, le complexe uPA/uPAR participerait normalement au phénomène de remodelage tissulaire et aux processus inflammatoires locaux (Kucharewicz et al. 2003). Dans le cas d'infection ou dans une activation anormale de la cascade d'activation du plasminogène, le complexe uPA/uPAR pourrait d'abord favoriser le recrutement et l'activation des cellules de la réponse immunitaire innée, en plus d'activer des cytokines pro-inflammatoires latentes, et possiblement de favoriser la génération de nouveaux déterminants antigéniques reconnus par les cellules de la réponse immunitaire acquise (Gyetko et al. 1994; Syrovets et al. 2001). Dans les organes lymphoïdes périphériques, uPA/uPAR pourrait favoriser l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T, contribuant ainsi au développement de l'immunité acquise (Gyetko et al. 1999).

Une concentration élevée d'uPA a notamment été observée dans l'analyse post-mortem de tissu bronchique provenant de patients décédés de *status asthmaticus* et cette

surexpression a été reproduite dans une culture de cellules épithéliales bronchiques soumise à des pressions élevées et soutenues reproduisant le stress du bronchospasme (Chu et al. 2006). Par ailleurs, les éosinophiles bronchiques prélevés suite à une provocation bronchique allergénique surexpriment le complexe uPA/uPAR comparativement aux éosinophiles qui demeurent en circulation périphérique (Brooks et al. 2006). La suppression d'uPA de ces éosinophiles bronchiques diminue la capacité d'adhésion cellulaire *in vitro*, alors que sa restauration la stimule, appuyant l'hypothèse d'un rôle du complexe uPA/uPAR dans l'infiltration éosinophilique (Brooks et al. 2006).

Bien que le gène PLAU n'ait jamais été étudié en association avec l'asthme, il a néanmoins été associé à d'autres maladies impliquant les processus inflammatoire et de protéolyse extracellulaire. Le variant P141 modifie l'affinité de l'enzyme pour ses substrats et a été associé à la maladie d'Alzheimer (Finckh et al. 2003; Riemenschneider et al. 2006) de même qu'à une malignité accrue du cancer colorectal (Przybylowska et al. 2002). Le variant rs4065C, situé dans la région 3' UTR, pourrait pour sa part moduler l'expression de l'enzyme et a été associé à une diminution de la susceptibilité à l'arthrite rhumatoïde (Huang et al. 2004), au prolapsus de la valve mitrale (Chou et al. 2004), aux lithiases urinaires (Tsai et al. 2002) et, également, à la maladie d'Alzheimer (Ozturk et al. 2007).

Dans le cadre du présent projet de maîtrise, nous posons l'hypothèse que le gène PLAU agirait comme un modulateur de la susceptibilité à l'asthme et vérifions cette hypothèse par l'identification de variants génétiques du gène dans un échantillon de familles asthmatiques du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) suivi d'une étude d'association entre ces variants et l'asthme et les traits reliés à l'asthme (HRB et atopie). Deux échantillons additionnels en provenance de l'Ouest Canadien sont ensuite étudiés dans le but de valider les associations observées.

# Revue de la littérature

## 1. Définition de l'asthme

Le terme asthme est dérivé des termes « αζο » ou « αζειν » signifiant sifflement ou respirer fort (Duffy 1994). Classiquement, l'asthme était défini en termes cliniques, basés sur la dysfonction respiratoire (ATS 1962). La reconnaissance plus récente de l'importance de la réponse inflammatoire dans la pathogenèse de la maladie a donné lieu à une définition plus complète. Ainsi, l'*American Thoracic Society* et l'Organisation mondiale de la santé définissent l'asthme comme étant :

[...] un désordre inflammatoire chronique des bronches dans lequel plusieurs types et éléments cellulaires sont impliqués. L'inflammation chronique cause une augmentation concomitante de l'hyperréactivité bronchique qui entraîne des épisodes récurrents de dyspnée, sibilances, oppression thoracique et toux, particulièrement la nuit ou tôt le matin. Ces symptômes sont généralement associés à une obstruction généralisée, mais variable des voies respiratoires, qui est souvent réversible soit spontanément ou avec traitement (NAEPP 2007).

Cette définition a pour avantage de mettre en avant-plan le phénomène d'inflammation qui, selon notre compréhension actuelle de la maladie, jouerait un rôle central dans la genèse de l'obstruction respiratoire et de l'hyperréactivité bronchique (HRB) (Graham 2006; NAEPP 2007). L'inflammation contribuerait à l'obstruction bronchique en induisant notamment une bronchoconstriction, un œdème de la muqueuse bronchique, la formation chronique de bouchons muqueux et un remodelage de la paroi bronchique incluant entre autres un pseudo-épaississement de la membrane basale (accumulation de collagène) et une hyperplasie du muscle lisse (Bousquet et al. 2000; NAEPP 2007). L'atopie, définie comme la production d'une quantité anormale d'IgE en réponse à un contact avec un allergène environnemental, constitue d'ailleurs un facteur de risque particulièrement important au développement de l'asthme (Girodet et al. 2005).



Sur le plan clinique, la définition fonctionnelle demeure la plus utile puisque le diagnostic d'asthme se fait à toute fin pratique à l'anamnèse, pour être ensuite confirmé par les tests fonctionnels. Une histoire d'épisodes de dyspnée, sibilances et serrement à la poitrine soulèvera l'hypothèse d'asthme qui sera renforcée par la variabilité quotidienne ou saisonnière des symptômes ou par une histoire familiale positive d'asthme ou d'atopie (NAEPP 2007). La suspicion clinique sera confirmée par des mesures spirométriques indiquant la réversibilité de l'obstruction par l'une ou l'autre des mesures suivantes : 1) une amélioration  $\geq 12\%$  et d'au moins 180 ml du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) 15 minutes après l'administration de  $\beta_2$ -agoniste à courte durée d'action; 2) une amélioration de 20% et de 250 ml du VEMS après 10-14 jours de corticothérapie orale; 3) une variation spontanée du VEMS de 20% entre l'une ou l'autre de ces 2 mesures; 4) des mesures bi-quotidiennes des débits expiratoires de pointe (DEP) sur une période de deux semaines indiquant une variabilité de plus de 12% des DEP; enfin, devant l'échec des autres tests, 5) une provocation bronchique à la métacholine peut parfois se révéler utile pour confirmer le diagnostic (Lemière et al. 2004).

## **2. Génétique de l'asthme**

La composante héréditaire de l'asthme est aujourd'hui bien établie, notamment grâce aux études de jumeaux monozygotes (Duffy 1994; Los et al. 2001; van Beijsterveldt et Boomsma 2007). Elle est actuellement estimée entre 40 et 60%, ce qui explique le risque 4 à 5 fois plus élevé, pour les parents du premier degré de sujets atteints, de développer la maladie (Bosse et Hudson 2007).

L'asthme possédant une présentation clinique complexe, les bases génétiques sont souvent étudiées en fonction de différents phénotypes intermédiaires (HRB, atopie, niveaux d'IgE élevés) pouvant être mesurés objectivement, i.e. quantifiables (NAEPP 2007). Toutefois, des études récentes suggèrent que malgré la présence de certains croisements, ces différents phénotypes liés à l'asthme seraient régulés par des loci

différents (Palmer et al. 2000; Green et al. 2007; Kiley et al. 2007). Cette variation dans les critères d'asthme, lorsqu'additionnée aux différences inhérentes aux populations et à l'environnement des cohortes étudiées pourrait contribuer à la faible reproductibilité des résultats d'une étude à l'autre (Malerba et Pignatti 2005). L'ensemble des études conduites laisse néanmoins entrevoir qu'une multitude de gènes serait impliquée dans la pathogenèse de l'asthme, n'exerçant individuellement qu'un effet modeste. La maladie résulterait de la somme des interactions de tous ces variants génétiques, entre eux et avec l'environnement (Ober et Hoffjan 2006).

## 2.1 Les approches

Classiquement, il existe deux approches dans l'identification de gènes associés à un trait complexe, soit l'approche dite gène-candidat et le clonage positionnel. Avec l'avènement de nouvelles technologies de génotypage à grande échelle, la *genome-wide association study* consitue depuis peu une troisième alternative très prometteuse.

Le clonage positionnel est une approche consistant à considérer des marqueurs à la grandeur du génome de façon à identifier les régions en déséquilibre, pour ensuite procéder au génotypage fin de ces régions (*fine-mapping*) (Gao et Huang 2004). Cette approche, efficace pour identifier les gènes associés à un haut risque relatif, est beaucoup moins performante pour identifier les gènes impliqués dans les traits complexes. La fonction des gènes identifiés par cette technique et leur impact dans la pathogenèse de l'affection n'est de plus pas toujours claire (Malerba et Pignatti 2005).

L'approche par gène candidat se base sur les connaissances de la pathogenèse et de la fonction biologique de gènes connus pour sélectionner un candidat à étudier en association avec la maladie (Ober et Moffatt 2000). Cette approche est efficace pour évaluer l'implication spécifique de gènes hautement suspectés dans la pathogenèse (Tabor et al. 2002). Elle est toutefois moins efficace dans l'identification de nouveaux gènes que le clonage positionnel et la *genome-wide association study*, qui utilisent des marqueurs à la grandeur du génome et qui ne dépend pas de l'habileté du chercheur à sélectionner des candidats biologiquement plausibles (Gao et Huang 2004).

La *genome-wide association study* consiste à génotyper plusieurs centaines de milliers de marqueurs répartis à travers le génome à l'aide de nouvelles technologies de génotypage très performantes, tel l'*Illumina*®. Cette approche diffère du clonage positionnel en ce qu'elle analyse directement l'association des polymorphismes génotypés avec le phénotype étudié plutôt que leur liaison avec le locus du trait (voir la section suivante sur les méthodes d'analyses). Ce type d'approche permet la génération d'une quantité impressionnante de donnée, ce qui en fait probablement la méthode la plus sensible pour détecter de nouveaux loci. Par contre, le désavantage d'une telle méthode est que le nombre d'analyses réalisées est si élevé que les critères de significativité statistique deviennent extrêmement difficiles à atteindre (Laitinen 2007).

Fréquemment, ces différentes méthodes sont combinées en une approche consistant à sélectionner des gènes candidats à partir des gènes contenus dans les régions identifiées par clonage positionnel ou des SNPs associés par *genome-wide scan* (Madore et al. 2007). Cette approche baptisée clonage des candidats positionnels (*positional candidate cloning*) aurait été très fructueuse dans l'identification de gènes associés à l'asthme et aux phénotypes d'asthme au cours des dernières années (Ober et Moffatt 2000).

Par exemple, parmi les régions identifiées par les études de liaison génomique, les régions 5q23-31, 6p21-24, 11q13-21, 12q21-24, 13q12-14, 20q13 ont méritées une attention particulière à cause de la grande quantité de gènes candidats qu'elles contiennent, incluant notamment ceux codant pour le cluster de IL-4, IL-9, les récepteurs de IL-12 et UGRP1 sur le chromosome 5; CC10 et CRTH2 sur le chromosome 11; et STAT6 sur le chromosome 12 (Wjst et al. 1999; Dizier et al. 2000; Laitinen et al. 2001; Xu et al. 2001; Haagerup et al. 2002; Hakonarson et Halapi 2002; Gao et Huang 2004). Une forte association au locus 17q21, mise en évidence par *genome-wide association study* et tout récemment répliquée dans un échantillon familial canadien français constitue une nouvelle région d'intérêt jusqu'à maintenant peut être étudiée (Madore et al. 2007). Ces régions sont extensives avec des

résolutions d'au mieux 5-10cM, intervalle dans lequel peut se trouver des centaines de gènes (Gao et Huang 2004). Un des objectifs actuels des recherches portant sur la génétique de l'asthme est donc d'identifier les gènes et mutations associés à l'asthme dans ces régions, en plus d'identifier de nouvelles régions en déséquilibre.

La technologie des micropuces à ADN présente une autre alternative pour la sélection de gènes candidats (Rolph et al. 2006). Cette technologie permet d'identifier les gènes différemment exprimés dans les tissus ou les cellules, mettant ainsi en évidence les gènes impliqués dans la pathologie et qui pourraient, potentiellement, avoir un niveau d'expression modifié en raison de la présence de variants génétiques, particulièrement dans des régions qui modulent la transcription (ex. le promoteur) (Tremblay et al. 2006).

## **2.2 Les méthodes d'analyse**

L'analyse de liaison consiste à rechercher une co-ségrégation entre des allèles marqueurs et des allèles non observés (de maladie) soit directement, en estimant les taux de recombinaison par des méthodes paramétriques, soit indirectement, en recherchant un partage d'allèles excessif parmi les sujets affectés apparentés (Hsu et al. 2003). Un aspect important de l'analyse de liaison est que l'étude simultanée de plusieurs marqueurs permet de procurer davantage d'information sur la co-ségrégation méiotique (Gao et Huang 2004). La première étude de liaison pour l'asthme allergique date probablement de 1936, alors que Zieve et ses collaborateurs ont présenté une analyse de liaison non concluante entre les gènes de l'atopie et les gènes déterminant le groupe sanguin (Zieve et al. 1936). Depuis, plusieurs régions chromosomiques liées à l'asthme et l'atopie ont été identifiées. Les régions 5q31-33, 6p21 et 12q13-q24 dont les liaisons ont été maintes fois répliquées en constitue probablement le meilleur exemple (Ober et Hoffjan 2006).

L'analyse d'association, pour sa part, est une approche visant à identifier les bases génétiques d'un trait complexe et est classiquement associée à l'approche par gènes candidats (Lander et Schork 1994). Cette approche a été par la suite appliquée au

génotypage fin (*fine-mapping*) suivant les études de liaison ainsi qu'au *genome-wide association study* (Binder 2006). L'étude d'association évalue la fréquence relative d'un allèle donné chez un groupe d'individus affectés non apparentés entre eux comparativement à un groupe de témoins non affectés. Les 2 types d'études d'association, soit familial et populationnel, diffèrent sur la façon dont les sujets témoins sont sélectionnés. L'étude d'association populationnelle (population-based) est souvent plus puissante car elle permet le recrutement d'un échantillon randomisé très grand à partir d'une population à risque, ce qui est extrêmement important dans le contexte d'allèle à basse fréquence (Gao et Huang 2004). Par contre, lorsque la cohorte populationnelle contient plusieurs groupes ethnique, les différences génétiques qui en découlent peuvent entraîner des associations statistiques superflues devant être corrigées par stratification (Cardon et Palmer 2003; Binder 2006). L'approche familiale (family-based) évite ce genre de problème en utilisant des membres non affectés de la parenté comme témoins. Qui plus est, le test de déséquilibre de transmission (TDT), utilisant l'analyse de trio comprenant 2 parents et un enfants a été démontrée nettement plus puissant que l'approche familiale conventionnelle comparant la fratrie, surtout lorsque l'effet du gène de susceptibilité est modeste, comme ce peut être le cas dans un trait complexe comme l'asthme (Spielman et Ewens 1996; Gauderman 2003). Le TDT consiste à mesurer, chez les parents hétérozygotes d'enfants atteints, le taux de transmission d'un allèle. Lorsque la transmission de l'allèle étudié dépasse de façon significative les 50% attendus sous l'hypothèse nulle, on conclut à une association entre l'allèle en question et une susceptibilité à développer le trait.

### **2.3 Études d'expression génique**

La technologie des puces à ADN est efficace pour étudier l'expression génique d'un grand nombre de loci à la fois. Cette technique permet également la comparaison d'échantillons différents, que ce soit pour un intervalle de temps au moment duquel l'expression est mesurée (pré et post exposition à un stress), l'exposition au traitement, le type cellulaire étudié ou pour d'autres variables (Malerba et Pignatti 2005).

Temple et ses collaborateurs ont étudié l'expression génique des éosinophiles et ont rapporté des changements dans le profil d'expression de 80 gènes suite à un traitement avec IL-5 (Temple et al. 2001). La majorité de ces gènes étaient régulés à la hausse par IL-5 et sont impliqués dans l'adhésion (ICAM-1, CD24), la migration, l'activation (IL-8, CCR-1) ou la survie des éosinophiles et autres cellules hématopoïétiques (PIM-1, CD24) (Malerba et Pignatti 2005).

Zimmermann et ses collaborateurs ont réalisé une étude d'expression génique à l'aide de modèle murin utilisant des puces comprenant des sondes d'hybridation pour 12 422 gènes et ont identifié 291 gènes impliqués dans la pathogenèse après exposition à certains allergènes (Zimmermann et al. 2003). Ils ont conclu que 6,5% du transcriptome serait altéré dans les poumons asthmatiques. Ils ont également identifié une surexpression des gènes codant pour les molécules impliquées dans le métabolisme de l'arginase. L'arginine 1 serait impliquée dans la production de polyamines et de proline, qui contrôlent la prolifération cellulaire et la production de collagène et pourrait influencer la production de NO en faisant compétition à l'oxyde nitrique synthase (Zimmermann et al. 2003).

Brutsche et ses collaborateurs ont évalué l'expression de 609 gènes chez des asthmatiques atopiques, non-atopique et chez des sujets témoins (sans asthme ni atopie) (Brutsche et al. 2002). Ils ont développé à partir de leurs résultats le pointage de CAGE (Composite Atopy Gene Expression) incluant 10 gènes déréglés chez les individus atopiques. Cette méthode de pointage serait plus efficace que le taux d'IgE pour différencier les individus atopiques des non-atopiques.

Une étude de micropuces à ADN réalisée par Laprise et ses collaborateurs a permis de détecter les gènes différemment exprimés dans les bronches de patients après l'administration de corticostéroïdes inhalés (Laprise et al. 2004). L'étude comparait également le profil d'expression génique entre sujets sains et asthmatiques. Soixante-dix-neuf (79) gènes ont été rapportés différemment exprimés chez les

asthmatiques comparativement aux témoins. La comparaison des asthmatiques avant et après traitement a également permis de démontrer une différence d'expression pour 128 gènes. Ces résultats suggèrent que les corticostéroïdes interviennent sur des voies biologiques non initialement impliquées dans la physiopathologie de la maladie. Par ailleurs, les corticostéroïdes ont corrigé l'expression de 26 des 79 gènes. Il est probable que les gènes non corrigés par l'administration de la corticothérapie soient des marqueurs de la chronicité de l'affection. Il est intéressant de noter que ce groupe de gènes inclut l'ensemble des enzymes protéolytiques initialement identifiées.

Au cours des dernières années, certains groupes ont combiné les études d'expression génétique aux études de liaisons, créant une synergie nouvelle entre les deux approches (Brutsche et al. 2002; Morley et al. 2004; Li et Burmeister 2005; Vawter et al. 2006). Dans cette stratégie, les niveaux d'expressions sont traités comme des phénotypes quantifiables ou *quantitative trait locus* (QTL) et les variants influençant l'expression génique sont recherchés. Plusieurs études ont démontré que les niveaux de mRNA de plusieurs gènes étaient héréditaires et ainsi candidats aux analyses génétiques (Li et Burmeister 2005). Ces travaux ont menés à la classification de la régulation génétique en *cis*, par des régions régulatrices à l'intérieur même du gène, ou en *trans* i.e. par de loci ailleurs sur le génome, la plupart des gènes régulateurs agissant en *trans* (Morley et al. 2004). Alors que certains loci dits *master regulators* pourraient affecter l'expression de centaines de gènes, certains phénotypes d'expression génique seraient pour leur part influencés par une multitude de déterminants génétiques (Li et Burmeister 2005). Morley et ses collaborateurs ont découvert des points chauds de régulation transcriptionnelle où coïncide une liaison pour plusieurs phénotypes d'expression (jusqu'à 31) et ont démontré une corrélation significative entre les niveaux d'expression de plusieurs gènes partageant les mêmes régions régulatrices (Morley et al. 2004). Une telle approche combinant les micropuces à ADN au *genome scan* a notamment permis l'identification de loci de régulation déterminant pour d'autres maladies à trait complexe (Vawter et al. 2006).

## 2.5 Études d'association et de liaison génétique

Une liste exhaustive des multiples gènes précédemment associés avec l'asthme dépasse le cadre de ce mémoire, ces associations ayant été préalablement rapportées dans différentes revues de la littérature (Wiesch et al. 1999; Ober et Moffatt 2000; Hakonarson et Halapi 2002; Illig et Wjst 2002; Hoffjan et al. 2003; Gao et Huang 2004; Ober et Hoffjan 2006; Holloway et Koppelman 2007). Ober et Hoffjan ont présenté en 2006 une revue de près de 500 études d'associations. Des 118 gènes répertoriés dans l'article, 54 gènes avaient été associés dans 2 à 5 populations différentes, 15 entre 6 et 10 populations, et 10 dans plus de 10 populations. Il devient ainsi de plus en plus clair que le nombre de gènes contribuant à une susceptibilité à l'asthme pourrait bien dépasser la centaine. Au fur et à mesure que seront dévoilés d'autres allèles de risque pour l'asthme, un défi majeur sera d'identifier les combinaisons de gènes entrant en interaction pour déterminer le risque spécifique à chaque patient.

## 2.6 Interactions gène-gène

Dans les maladies à trait complexe comme l'asthme, l'interrelation entre les gènes impliqués prend une importance toute particulière, à travers, d'une part, la sélection de gènes reliés dans une voie biologique (voir section 4.8) et, d'autre part, l'évaluation de la synergie entre les gènes impliqués. Les études d'interaction gène-gène (g x g) peuvent être réalisées dans de très grandes cohortes en partitionnant les familles selon des régions spécifiques en déséquilibre de liaison et en observant les changements dans la liaisons des autres régions du génome (Gauderman 2002; Gao et Huang 2004).

Par exemple, un tel criblage génomique a été réalisé dans le cadre de la *Collaborative Study on the Genetics of Asthma* (CSGA), pour 2 régions du génomes fortement liées à l'asthme, soit 11q et 20p (Blumenthal et al. 2004). Lorsque partitionné pour le chromosome 11, le déséquilibre de liaison dans 4 autres régions génomiques augmentait de façon marquée, soit en 5q, 8p, 12p et 14q, signant une interaction des gènes compris en 11q avec ces régions. Par opposition, l'analyse de liaison



partionnant les familles selon la liaison avec la région 20p n'a pas mis en évidence l'effet d'une interaction entre cette région et d'autre région génomiques (Blumenthal et al. 2004).

Un bon exemple d'interaction gène-gène est le cas d'IL-13 et d'IL-4RA, deux molécules clés de la signalisation Th2 (Howard et al. 2002). Des variants d'IL-13 ont été associés à l'asthme et à l'HRB et les variants d'IL-4 ne présentent qu'une association limite avec ces phénotypes. Toutefois, lorsque les variants à risque des 2 gènes sont combinés le risque de développer l'asthme devient 5 fois plus élevé comparativement aux autres génotypes (Howard et al. 2002). Cet exemple démontre bien l'importance que peut avoir l'interaction gène-gène dans le cadre d'une maladie à trait complexe (Gao et Huang 2004).

## **2.7 Interactions gène-environnement**

Selon notre compréhension actuelle, l'interaction entre les gènes et l'environnement jouerait un rôle central dans la pathogenèse de la maladie. L'influence relative des gènes et de l'environnement n'est pas linéaire et varie d'un sujet asthmatique à l'autre. L'hypothèse actuelle voudrait que les individus présentent des sensibilités différentes, génétiquement programmées, aux expositions environnementales. Les interactions gènes-environnement (g x e) peuvent être mesurées à l'aide d'études cas-témoins et de cohorte familiale (Gao et Huang 2004).

Un exemple d'interaction gène-environnement serait le cas de CD14 tel que rapporté par Vervelli (Vercelli 2004). CD14 est un récepteur à haute affinité pour les endotoxines exprimé par les monocytes et macrophages. Il jouerait un rôle dans le développement de la réponse immunitaire aux pathogènes (Gao et Huang 2004). Un variant fonctionnel C159T de ce gène a été associé à l'asthme dans certaines populations alors que l'association n'aurait pas tenue dans d'autres populations (Baldini et al. 1999; Gao et al. 1999; Koppelman et al. 2001). Cette différence s'expliquerait par l'exposition chronique et hâtive aux endotoxines dans certaines populations, ce qui modifierait la réponse

immune suscitée par CD14, résultant en une augmentation du risque allergique chez les individus à la fois porteurs de l'allèle rare et exposés aux endotoxines (Vercelli 2004).

L'évidence grandissante d'interaction g x e dans l'asthme réitère l'importance de mesurer les facteurs environnementaux dans les études génétiques sur l'asthme. Une connaissance accrue des interactions g x e contribuerait à faciliter l'évaluation du risque et du pronostic individuel, à améliorer les stratégies de préventions et à développer des traitements mieux ciblés (Yang et al. 2007).

## **2.8 Voies biologiques communes**

Face à l'immensité de l'information à laquelle on se trouve confronté, il devient nécessaire de se doter d'une structure favorisant l'intégration de cette information. C'est pour cette raison que les gènes de susceptibilité et de protection à l'asthme sont souvent étudiés en fonction de voies biologiques communes (Laprise et al. 2004). Le regroupement des gènes par voies biologiques favorise l'élaboration de modèles fonctionnels, l'identification de nouveaux gènes candidats, la génération d'hypothèses portant sur les interactions g x g ou g x e et, ultimement, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Un bon exemple serait celui de la voie biosynthétique de la 5-lipoxygénase, dans laquelle les variants d'une dizaine de gènes ont été associés à une susceptibilité à l'asthme, notamment pour le gène LTC<sub>4</sub> synthase, impliqué dans la synthèse des cystéinyl-leukotriènes, et les gènes des récepteurs CYSLTR1 et CYSLTR2 (Capra et al. 2006; Klotsman et al. 2007). Certains de ces variants, notamment dans les gènes CYSLTR2 et ALOX5, ont de plus été associés à une variation de la sensibilité au *montelukast*, un antagoniste des récepteurs à leukotriène, fournissant une explication pharmacogénétique à la grande variabilité interindividuelle dans la réponse au médicament (Klotsman et al. 2007).

### **3. Système d'activation du plasminogène**

Le système d'activation du plasminogène (PAS) est constitué d'un ensemble de protéases et d'inhibiteurs de protéases dont le rôle est de réguler l'activation du plasminogène en plasmine, un enzyme protéolytique puissant régissant plusieurs processus biologiques. Il s'agit d'un système d'enzyme très bien intégré et aux interactions multiples et c'est pour cette raison que l'on se doit de traiter de l'ensemble de ses principaux constituants ainsi que de ses principales interactions.

#### **3.1 Les enzymes protéolytiques dans l'asthme**

Aujourd'hui, il est reconnu que tout processus de réparation tissulaire dépend de l'activité de protéases (Kucharewicz et al. 2003). Un large spectre d'enzymes protéolytiques a été associé avec le processus de guérison ainsi qu'avec les phases aiguë et chronique de la réponse inflammatoire. Le rôle crucial de protéases a été démontré notamment dans l'arthrite rhumatoïde (Burrage et al. 2006), l'emphysème pulmonaire (Tuder et al. 2006), la sclérose en plaque (Vos et al. 2003), les colites (Medina et Radomski 2006) et l'athérosclérose (Cawston et Wilson 2006).

D'ailleurs, le spectre d'action des protéases ne se limite pas simplement au remodelage de la matrice extracellulaire. Des rôles de régulation de l'activité de facteurs de croissance et de médiateurs chimiques, et de modulation de la fonction cellulaire via des récepteurs membranaires ont également été décrits (Reed et Kita 2004; Demedts et al. 2005; Barry et al. 2006; Lamkanfi et al. 2007).

##### **3.1.1 Les métalloprotéinases matricielles**

Les matrix metalloproteases (MMPs) forment une superfamille de métalloendopeptidases habituellement constituées d'un pro-domaine et d'un domaine catalytique contenant un ion de zinc (Demedts et al. 2005). Jusqu'à date 24 MMPs ont été identifiés chez les mammifères, et ces dernières sont principalement exprimées par les cellules épithéliales et inflammatoires telles les lymphocytes (Demedts et al. 2005). Certaines MMPs sont ancrées à la membrane cellulaire alors que d'autres sont sécrétées

sous forment de pro-enzymes dans l'espace extracellulaire et sont activés par clivage de leur domaine N-terminal (Demedts et al. 2005). La plupart des MMPs sont exprimées de façon constitutive une fois la traduction amorcée (Demedts et al. 2005). Certaines MMPs, comme MMP-8 et MMP-9 sont entreposées dans les granules avant d'être relâchées au moment de la dégranulation des neutrophiles en réponses à l'inflammation (Sternlicht et Werb 2001).

Il existe un chevauchement considérable entre les protéines du tissu conjonctif ciblées par les différentes MMPs. Les différences résident surtout au niveau du site d'expression et du niveau d'affinité de l'enzyme pour ces différents substrats (Parks et al. 2004). Les MMPs contribuent à la dégradation de l'ECM et libèrent du coup des facteurs chimiotactiques, attirant les cellules inflammatoires au site endommagé (Demedts et al. 2005). Plusieurs MMPs ont également la propriété d'activer des cytokines proinflammatoires. Notamment, MMP-9 augmente l'activité de IL-8 alors que MMP-7 et MMP-12 activent le TNF- $\alpha$  latent à la surface des macrophages (Parks et al. 2004).

Les patients asthmatiques présentent une activité gélatinolytique (associée à MMP-2 et -9) augmentée et des niveaux élevés de MMP-2, MMP-9 et TIMP-1 (tissu inhibitor of metalloproteinase-1) dans leurs expectorations (Cataldo et al. 2000; Lee et al. 2001; Mattos et al. 2002; Gueders et al. 2006). De plus, il a été démontré que les niveaux bronchiques d'MMP-9 augmentent suite à une stimulation par un allergène (Lee et al. 2001; Cataldo et al. 2002; Park et al. 2003; Gueders et al. 2006).

### 3.1.2 L'élastase neutrophilique

De la même façon qu'une activité augmentée de MMP-9 dans le tissu bronchique a été associée à l'asthme allergique, une augmentation de l'activité de l'élastase neutrophilique (NE) a pu être associée à l'asthme non allergique (Simpson et al. 2005). La NE est augmentée dans l'asthme intrinsèque, avec des niveaux bronchiques inversement corrélés au VEMS (Simpson et al. 2005). La NE est une serine protéase ciblant plusieurs protéines dont l'élastine bronchique. Son principal inhibiteur est l' $\alpha_1$ -

antitrypsine et lorsque l'inhibition est déficiente ou que le NE dépasse les capacités d'inhibition, une dégradation protéolytique s'ensuit (Stockley 2002).

### 3.1.3 Protéases mastocytaires

Les tryptases et les chymases sont des sérine protéases neutres et constituent les principales protéines exprimées par les mastocytes (Fiorucci et Ascoli 2004; Saito 2005). Le pH acide des granules mastocytaires limite l'activité de la trypase et de la chymase jusqu'à leur libération au moment de la dégranulation du mastocyte (Fiorucci et Ascoli 2004). Cette dégranulation, déclenchée par la stimulation des IgE préfixés au récepteur à haute affinité pour les IgE (FcεRIβ), constitue l'un des points majeurs de la réaction asthmatique (Theoharides et Kalogeromitros 2006).

Par ailleurs, la tryptase pourrait jouer un rôle majeur dans le développement de la réponse asthmatique (Bradding 2003). Il a notamment été démontré que l'administration exogène de tryptase induit une bronchoconstriction et une HRB à l'histamine chez les chiens et les moutons (Molinari et al. 1996). Les études *in vitro* ont de plus démontré que la tryptase potentialiserait la réponse contractile et constituerait un mitogène pour les cellules musculaires lisses (Berger et al. 2001; Saito 2005). La tryptase aurait également pour effet de favoriser la production d'IL-13 (Wong et al. 2002). Aussi, les niveaux d'expression étant plus élevés dans le tissu bronchique de sujets asthmatiques comparativement aux témoins suggère un rôle possible pour ces biomarqueurs dans la physiopathologie relative à l'asthme (Laprise et al. 2004).

La chymase a pour sa part été moins étudiée que la tryptase mais son expression semble particulièrement localisée au niveau des mastocytes du tissu musculaire lisse (Brightling et al. 2002). La chymase participe à la dégradation de la matrice péricellulaire dans ce tissu et inhibe l'adhésion des lymphocytes, ce qui pourrait expliquer la pauvreté du tissu musculaire lisse en lymphocytes T dans l'asthme (Lazaar et al. 2002; Saito 2005). Contrairement à la tryptase, la chymase inhibe la prolifération musculaire lisse (Bradding 2003). L'effet combiné de ces protéases avec les autres médiateurs des mastocytes *in vivo* reste donc à déterminer (Bradding 2003).

Le mécanisme d'action des protéases mastocytaires dans l'inflammation et dans l'asthme était mal compris jusqu'à l'identification récente de la famille des récepteurs à protéases (PARs).

#### 3.1.4 Les récepteurs à protéases (PARs)

Les récepteurs à protéases (PARs) sont des récepteurs membranaires de type protéine G, activés par les sérine protéases et constitueraient le principal mécanisme d'action de ces dernières dans le processus inflammatoire (Landis 2007). Quatre PARs ont été identifiés jusqu'à maintenant. Ils sont exprimés par pratiquement tous les types cellulaires impliqués dans l'asthme et la rhinite allergique (Reed et Kita 2004). L'activation des PARs par une sérine protéase se fait par clivage d'un site spécifique au niveau du domaine N-terminal extracellulaire du récepteur (Barry et al. 2006). Cette activation protéolytique est irréversible, et une fois clivés, les récepteurs sont dégradés par les lysosomes. Les récepteurs PAR-1, -2 et -4 seraient principalement activés par la thrombine, alors que PAR-2 serait activé par la tryptase (Barry et al. 2006).

L'expression de PAR-2 serait augmentée dans les cellules épithéliales de patients asthmatiques (Knight et al. 2001). Chez des souris knock-out pour PAR-2, l'infiltration éosinophilique est inhibée de 73% et elle est augmentée de 88% chez les souris surexprimant la protéine (Schmidlin, 2002). L'infiltration éosinophilique induite par la chymase éosinophilique serait pour sa part probablement secondaire à l'activation de PAR-1 (Tomimori et al. 2002; Reed et Kita 2004).

Ainsi, la stimulation de PAR-2 par la tryptase stimulerait la synthèse d'ADN, l'expression d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), et la libération d'IL-6 et IL-8 par les cellules épithéliales (Asokanathan et al. 2002; Kawabata et Kawao 2005). De plus, elle stimulerait le chimiotactisme et la production de collagène par les fibroblastes, de même que la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses (Kawabata et Kawao 2005). La littérature rapporte également que la stimulation de PAR-2 par la

tryptase entraînerait une augmentation de GM-CSF et une diminution de l'IL-4 par les monocytes et les cellules dendritiques (Colognato et al. 2003).

L'administration de PAR-2 activé au niveau des bronches augmente l'hyperréactivité bronchique en réponse à un allergène (Ebeling et al. 2005). Il a d'ailleurs été suggéré que les protéases de certains aéroallergènes, notamment celles des acariens et de champignons comme *aspergillus* ou *alternaria*, seraient responsables de la réponse allergique initiée par ces derniers, probablement via l'activation de PARs (Sun et al. 2001; Reed et Kita 2004). Cette affirmation a des impacts cliniques importants été donné que l'effet de ces sérine protéases exogènes pourrait être inhibé par l'administration d'inhibiteurs de protéases (King et al. 1998).

### 3.1.5 Les systèmes de protéases plasmatiques

Plusieurs phénomènes de la réponse inflammatoire sont modulés par quatre systèmes qui agissent et interagissent entre-eux de manière à moduler les facteurs plasmatiques, soit les systèmes du complément, des kinines, de la coagulation et de la fibrinolyse.

#### 3.1.5.1 Le système du complément

Le système du complément consiste en un ensemble de 20 protéines plasmatiques et produits de clivage, retrouvé en grande concentration dans le plasma (Cotran et al. 1999). Ce système participe à la fois aux processus immunitaires cellulaires et humorales pour la défense antimicrobienne, en formant ultimement un complexe d'attaque membranaire (MAC) (Sarma et al. 2006). Dans le processus, une variété de composantes est élaborée, entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire, un chimiotactisme et l'opsonisation (Sarma et al. 2006).

Les composantes du complément, présentes dans le plasma sous formes inactives sont numérotées de C1 à C9. L'étape critique de la cascade du complément est sans doute l'activation de sa 3<sup>e</sup> composante, C3 (Carroll 2004b). Le clivage de C3 peut avoir lieu par la voie classique, déclenchée par la fixation de C1 à un complexe anticorps/antigène;

ou par la voie alternative, déclenchée par les endotoxines, les agrégats d'immunoglobulines, les polysaccharides complexes, ou d'autres facteurs tel le venin de cobra (Carroll 2004b). Peu importe la voie impliquée, la C3 convertase clive C3 en 2 fragments, C3a et C3b. La génération de C3a est d'ailleurs hautement augmentée dans les bronches d'asthmatiques suivant une stimulation allergénique (Ali et Panettieri 2005). Le fragment C3b se lie pour sa part à des fragments préformés pour former la C5 convertase qui interagit avec C5 pour libérer C5a et initier la formation du MAC (C5 à C9) (Cotran et al. 1999). Les fonctions biologiques du complément sont de deux ordres : la lyse cellulaire via le MAC, tel que mentionné plus tôt, et les effets biologiques des fragments protéolytiques du complément (Cotran et al. 1999). Ces facteurs sont impliqués dans différents phénomènes de l'inflammation aigue.

C3a, C5a et jusqu'à un certain niveau C4a, appelés les anaphylatoxines, augmentent la perméabilité vasculaire et induisent la vasodilatation, notamment en provoquant la relâche d'histamine par les mastocytes (Carroll 2004b; Ali et Panettieri 2005; Guo et Ward 2005). Certaines études suggèrent également un rôle pour ces molécules dans la régulation de l'activité de lymphocytes B (Carroll 2004a). C5a active de plus active la voie lipoxigénase du métabolisme de l'acide arachidonique chez les neutrophiles et monocytes, en plus de constituer un agent chimiotactique puissant pour les neutrophiles, monocytes, éosinophiles et basophiles (Guo et Ward 2005). C3 et C5, les médiateurs inflammatoires les plus importants du système, peuvent également être activé par plusieurs enzymes protéolytiques présents dans l'exsudat inflammatoire, dont les enzymes lysosomales, la plasmine, la kallikréine et certaines sérine protéases retrouvées dans les tissus (Carroll 2004b).

### 3.1.5.2 Système des kinines

Le système des kinines génère des peptides vasoactifs à partir de protéines plasmatiques nommées kininogènes par l'entremise de protéases spécifiques nommées kallikréines (Cotran et al. 1999). L'activation du système des kinines résulte ultimement en la libération du nonapeptide vasoactif bradykinine, un agent puissant augmentant la perméabilité vasculaire (Joseph et Kaplan 2005). La bradykinine cause également la



contraction du muscle lisse, la vasodilatation, la synthèse de *tissue plasminogen activator* (tPA) et des métabolites de l'acide arachidonique (Moreau et al. 2005). La cascade est déclenchée par l'activation du facteur XII de la cascade de la coagulation (facteur de Hageman) par contact avec des surfaces chargées négativement, tel le collagène ou les membranes basales (Joseph et Kaplan 2005). Le facteur XIIa (ou *prekallikrein activator*) est produit et convertit la prékallikréine en sa forme protéolytique active, la kallikréine (Joseph et Kaplan 2005). Cette dernière clive une glycoprotéine plasmatique pour produire la bradykinine (Joseph et Kaplan 2005). La durée d'action des effets de la bradykinine est courte car cette dernière est rapidement inactivée par une enzyme nommée kininase (Moreau et al. 2005). Toute kinine demeurant en circulation sera inactivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine au niveau pulmonaire (Moreau et al. 2005). Il est important de noter que la kallikréine constitue elle-même un activateur puissant du facteur XII, permettant une amplification autocatalytique du stimulus initial (Moreau et al. 2005).

### 3.1.5.3 Le système de la coagulation

La cascade de la coagulation et l'inflammation sont des processus intimement liés (Franchini et al. 2007). Le système de la coagulation est divisé en deux voies qui convergent pour résulter en l'activation de la thrombine et la formation de la fibrine (Cotran et al. 1999). La voie intrinsèque consiste en une série de protéines plasmatiques pouvant être activée par le facteur XII (de Hageman). Le facteur XII est synthétisé par le foie et circule sous forme inactive jusqu'à ce que le contact avec le collagène, la membrane basale ou des plaquettes activés l'active induise un changement de conformation exposant son centre actif comprenant un groupement sérine pouvant ensuite cliver les substrats protéiques et activer les autres systèmes de protéases plasmatiques (Franchini et al. 2007).

L'activation de la cascade résulte en l'activation de la thrombine (facteur IIa) à partir de la prothrombine, qui à son tour clive le fibrinogène soluble pour générer le caillot de fibrine insoluble. Lors de cette conversion, des fibrinopeptides sont formés, qui induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'activité chimiotactique

des leucocytes (Cotran et al. 1999). La thrombine possède elle-même des propriétés pro-inflammatoires via son interaction avec les PARs, tel l'augmentation de l'adhésion leucocytaire et la prolifération des fibroblastes (Reed et Kita 2004). Comme la thrombine, le facteur Xa est une protéase capable d'activer PAR-1 et induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'exsudation des leucocytes (Reed et Kita 2004). Il a été démontré que ce dernier agirait comme un modulateur du remodelage bronchique dans un modèle murin d'asthme (Shinagawa et al. 2007).

#### 3.1.5.4 Le système fibrinolytique

La plasmine constitue l'enzyme protéolytique principale du processus fibrinolytique vu sa capacité à dégrader la fibrine et, ainsi, les caillots sanguins et thromboses (Cesarman-Maus et Hajjar 2005).

L'activation du plasminogène peut se faire selon les voies intrinsèque ou extrinsèque. En effet, la plasmine peut être formée à partir du plasminogène par des activateurs endogènes tels la kallikréine, le facteur XII (de Hageman) et le kininogène de haut poids moléculaire, ainsi que par des facteurs exogènes tels le tPA et l'*urokinase plasminogen activator* (uPA) (Banach-Wawrzenczyk et al. 2000). Dans des conditions physiologiques, c'est la voie extrinsèque qui joue un rôle décisif, avec le tPA et l'uPA. Une activation du plasminogène n'est toutefois rapide et efficace que lorsque le tPA se trouve associé à une molécule de fibrine, formant un complexe tPA/plasminogène/fibrine, ce qui permet l'activation de la fibrinolyse au site précis du thrombus (Bachmann 1994).

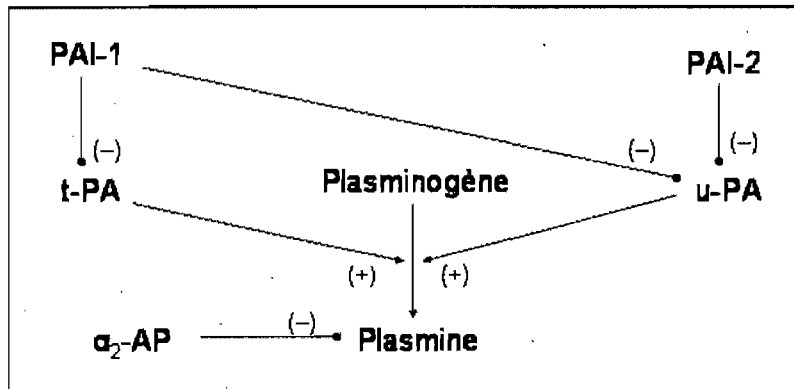
L'hémostase est possible grâce à la présence d'inhibiteurs qui contrebalancent les activateurs ci-haut mentionnés. Les inhibiteurs les plus importants du système fibrinolytique sont les *Plasminogen activator inhibitors type-1* et *type-2* (PAI-1 et PAI-2), l' $\alpha_2$ -antiplasmine ( $\alpha_2$ -AP) et l' $\alpha_2$ -macroglobuline (Bachmann 1994). PAI-1 et PAI-2 opèrent en formant un complexe stable avec le tPA et l'uPA, les inactivant du même coup (Bachmann 1994). Lors de leur activation, les plaquettes sanguines libèrent PAI-1,

inactivant la fibrinolyse dans le thrombus en formation. L' $\alpha_2$ -AP constitue pour sa part un inhibiteur direct de la plasmine. En se liant à la fibrine, cet enzyme protège les caillots de la lyse (Bachmann 1994).

Chez les patients asthmatiques, le temps de lyse est significativement prolongé, signalant une réduction de l'activité fibrinolytique (Banach-Wawrzenczyk et al. 2000). Cette baisse d'activité est associée à une augmentation de la concentration sanguine de tPA, ce qui pourrait sembler paradoxal (Tutluoglu et al. 2005). Il faut en fait préciser que cette concentration mesurée comprend également le tPA inactivé par PAI-1 et ne reflète donc pas l'activité de tPA. La diminution de l'activité fibrinolytique chez les sujets asthmatiques s'associe de plus à une diminution de concentration sanguine d'uPA, ainsi qu'à une hausse de concentration d' $\alpha_2$ -AP et de PAI-2 (Banach-Wawrzenczyk et al. 2000; Laprise et al. 2004). Cette perturbation du système de la fibrinolyse chez les sujets asthmatiques constitue un premier indice de l'implication du système d'activation du plasminogène dans la pathogénèse de l'asthme.

### **3.2 Le système d'activation du plasminogène (PAS) dans l'asthme**

L'association entre l'asthme et le système fibrinolytique n'est pas fortuite. En effet, plusieurs études suggèrent un rôle majeur pour le système d'activation de la plasmine dans le processus inflammatoire et dans le remodelage des voies respiratoires (Irigoyen et al. 1999; Banach-Wawrzenczyk et al. 2000; Kinnby 2002; Kucharewicz et al. 2003; Tutluoglu et al. 2005). Tel que mentionné plus tôt, le système d'activation du plasminogène consiste en un ensemble de protéases et de leurs inhibiteurs (Figure R1).



**Figure R1.** Système d'activation du plasminogène

#### *Plasminogen activator, urokinase*

Le gène *Plasminogen activator, urokinase* (PLAU) codant pour l'uPA mesure 5,7 kb et est situé en 10q24 chez l'humain (Irigoyen et al. 1999). Les éléments de régulation du gène ont été relativement bien caractérisés et semblent bien conservés chez les mammifères suggérant leur importance dans la régulation du gène (Irigoyen et al. 1999). Notamment, plusieurs sites Ets/AP1 activés par les voies de signalisation MAP kinases ont été identifiés dans la région du promoteur (Lengyel et al. 1995; D'Orazio et al. 1997; Watabe et al. 1998). Plusieurs signaux stimulant l'expression d'uPA agissent par cette voie, incluant des facteurs de croissance, des cytokines, des oncogènes, une réorganisation du cytosquelette et des rayons UV (D'Orazio et al. 1997) (Lengyel et al. 1995; Watabe et al. 1998; Irigoyen et al. 1999). Ainsi, l'expression d'uPA peut être stimulée par des facteurs pro-inflammatoires tels TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2 et le FGF et même par d'autres enzymes protéolytiques telle la tryptase (Gyetko et al. 1992; Gyetko et al. 1993; Stack et Johnson 1994; Lengyel et al. 1995; D'Orazio et al. 1997). L'uPA est exprimé à un taux de base dans l'ensemble des cellules du corps humain, et à divers degrés dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les mastocytes, les muscles lisses et les leucocytes (Chapman et al. 1982; van Hinsbergh 1988; Sillaber et al. 1999).

Au niveau post-transcriptionnel, l'expression d'uPA serait régulée par le facteur de stabilisation HuR (Tran et al. 2003). Le facteur HuR stabilise et augmente la demi-vie de

l'ARN messager d'uPA en se fixant aux AREs (AU-rich elements) situés au niveau de l'extrémité 3' (Tran et al. 2003). HuR est également responsable de la stabilisation de l'ARNm de plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires et son expression est elle-même induite par des facteurs pro-inflammatoires, dont l'uPA, via l'activation de la voie MAP kinase 2 (Stellato 2005).

Ainsi, PLAU code pour une sérine protéase de 53 kDa synthétisée sous la forme chaîne unique (pro-uPA) (Petersen et al. 1988). Lorsque sécrété, pro-uPA est converti en sa forme active double-chaîne par clivage du lien peptidique K158-I159 par la plasmine (Andreasen et al. 1997). La réaction d'activation peut également être catalysée par d'autres protéines tel la kallikréine plasmatique, le facteur d'Hagemann, et les cathepsines (Andreasen et al. 1997). Le pro-uPA constitue un véritable zymogène, avec une activité beaucoup plus basse que l'uPA (Petersen et al. 1988). La liaison de pro-uPA à son récepteur favorise de plus son activation en uPA actif par la plasmine (Duval-Jobe et Parmely 1994). Les deux chaînes peptidiques constituant l'uPA sont liées par des ponts disulfure et la molécule résultante est constituée de 3 domaines fonctionnels (Irigoyen et al. 1999).

Le domaine sérine protéase, des résidus aminés 144 à 411, se situe dans la portion C-terminal et constitue la chaîne B. Le fragment N-terminal, correspondant à la chaîne A, est formé du domaine Kringle, une structure contenant 3 ponts disulfures et liant les protéines incluant les résidus 47 à 135, ainsi que du domaine *epidermal-growth-factor-like*, des résidus 4 à 43, responsable de l'interaction avec le récepteur uPAR (Irigoyen et al. 1999).

L'activité d'uPA est limitée par la présence des PAI et par l'endocytose des récepteurs liés (Irigoyen et al. 1999). Aussi en plus de convertir le pro-uPA en uPA, la plasmine peut cliver l'uPA de nouveau pour former la forme de bas poids moléculaire (33 kDa) démunie des portions Kringle et EGF-like mais conservant la totalité de son activité catalytique (Stump et al. 1986). En plus, du plasminogène, l'uPA pourrait activer

directement *l'hepatocyte growth factor* et cliver la fibronectine en plus de son propre inhibiteur PAI-1 (Naldini et al. 1992; Irigoyen et al. 1999).

#### *Plasminogen activator, tissue*

Le gène *plasminogen activator, tissue* (PLAT), situé en 8p12 code pour le tPA, une sérine protéase de 70 kDa également sécrété principalement par les cellules endothéliales sous forme de précurseur à chaîne unique (Irigoyen et al. 1999). Tout comme pour uPA, la plasmine active tPA en clivant le lien peptidique Arg-275-Ile276 pour former la forme active constitué de 2 chaînes reliées par un pont disulfure (Nienaber et al. 1992). Toutefois, contrairement à l'uPA, le tPA à chaîne unique possède une activité protéolytique considérable (Nienaber et al. 1992). La molécule de tPA est formée de 4 domaines fonctionnels distincts, soit un domaine *fibronectin-like*, un domaine *EGF-like*, 2 domaine *Kringle*, et une région sérine protéase en C-terminal avec des sites actifs au niveau des résidus His322, Asp371, et Ser478 (Irigoyen et al. 1999). Tel que mentionné plus tôt, tPA possède une affinité importante pour la fibrine et seraient principalement impliqué dans le processus de fibrinolyse (Booth 1999). Son association à des récepteurs endothéliaux aurait pour effet d'augmenter significativement son activité alors que des récepteurs hépatiques seraient responsables de sa clairance plasmatique (Kuiper et al. 1995; Fukao et al. 1997). L'activité de tPA est également limitée par son inhibition par PAI-1 (Booth 1999).

#### *Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1*

Les *Serpin peptidase inhibitor* (SERPIN) possèdent un lien peptidique ressemblant à celui des substrats des protéases (Potempa et al. 1994). Grâce à ce pseudo-substrat, les SERPIN ciblent les protéases et s'associent de façon stable aux protéases, leur conférant une conformation inactive avec un rapport stoichiométrique 1 : 1 (Potempa et al. 1994). Le gène *Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1* (SERPINE1), situé en 7q22, code pour PAI-1, une glycoprotéine de 45 kDa (avant glycosylation) exprimé principalement par les cellules endothéliales mais également par les mégacaryocytes, les muscles lisses périvasculaire et les hépatocytes (Irigoyen et al. 1999). La forme sécrétée prend rapidement une conformation inactive incapable de former des complexes avec les PAs

(Ehrlich et al. 1991). La vitronectine et l'héparine servent de cofacteurs pour stabiliser la forme active de PAI-1 et élargissent le spectre d'action de l'inhibiteur à la thrombine (Ehrlich et al. 1991). Contrairement à la forme sécrétée, la forme stabilisée peut demeurer active dans la matrice pendant une période prolongée. PAI-1 peut également inhiber l'uPA lié à son récepteur (Booth 1999). Chez les humains, le locus 7(q21.3-q22) a été associé à des niveaux élevés d'IgE, évoquant la possibilité d'une association entre le gène et l'atopie (Xu et al. 2000). L'allèle 4G d'un polymorphisme 4G/5G, par délétion/insertion d'une paire de base dans la région du promoteur de SERPINE1, a été associé à des niveaux de concentration de base et inductible de PAI-1 plus élevés (Dawson et al. 1993; Margaglione et al. 1998; Swiatkowska et al. 2005). Dans une population Tchèque, cet allèle a pu être associé à l'asthme allergique (Buckova et al. 2002). Au Royaume-Uni, un déséquilibre de transmission de ce même allèle a été détecté chez des enfants asthmatiques (Cho et al. 2001), des résultats répétés dans une cohorte polonaise (Kucharewicz et al. 2003).

*Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 2*

Le gène *serpin peptidase inhibitor, clade B, member 2* (SERPINB2), situé en 18q21.3 code pour PAI-2, une protéine de 450 acides aminés (47 kDa) exprimée principalement par le placenta et les leucocytes (Kruithof et al. 1995; Irigoyen et al. 1999). Son potentiel inhibiteur à l'intention de l'uPA lié est 15 fois moindre que PAI-1 et celui envers tPA est négligeable (Kruithof et al. 1995). Toutefois, la majorité du PAI-2 synthétisé demeure intracellulaire avec seulement une fraction glycosylée et sécrétée (Kruithof et al. 1995). Il a été démontré que l'expression de PAI-2 est stimulée par le TNF- $\alpha$  et les lipopolysaccharides et qu'il inhibe l'apoptose médiée par le TNF- $\alpha$  (Dickinson et al. 1995; Kruithof et al. 1995). Ainsi, le PAI-2 intracellulaire pourrait servir à la protection des macrophages inflammatoires de l'effet cytotoxique de leur propre TNF- $\alpha$ . Le PAI-2 intracellulaire induit également une légère production d'interférons (IFN)  $\alpha$  et  $\beta$ , et diminue l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire type 1 (ICAM-1) (Antalis et al. 1998; Shafren et al. 1999). Dans une étude de puces à ADN à partir de biopsies bronchiques copmparant le profil d'expression de sujets asthmatiques à des sujets sans

asthme ni allergie, il a été démontré que PAI-2 était 11 fois plus exprimé chez les sujets asthmatiques (Laprise et al. 2004).

#### *Plasminogen activator, urokinase receptor*

Le gène *Plasminogen activator, urokinase receptor* (PLAUR), situé en 19q13 code pour l'uPAR, une protéine hautement glycosylée de 270 acides aminés (Irigoyen et al. 1999). Il s'agit d'un récepteur ancré dans la membrane via un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), formé de 3 domaines CD59-like riches en cystéine et liés par de courtes régions connectantes (Plesner et al. 1997; Irigoyen et al. 1999). Des variants solubles peuvent résulter d'un épissage alternatif ou d'un clivage de l'ancre GPI par la phospholipase C (Montuori et al. 2005; Ragno 2006). Leur fonction demeure mal connue mais ils ont des propriétés chimiotaxiques (Sloand 2005). Le premier domaine (D1) possède une activité liante pour l'uPA alors que les deux autres domaines (D2 et D3) lient la vitronectine (Irigoyen et al. 1999). uPAR peut également lier les intégrines à des sites distincts de ceux liant l'uPA et la vitronectine (Irigoyen et al. 1999). L'uPAR est exprimé par les mêmes cellules exprimant uPA (Ragno 2006).

### **3.2.1 Le PAS dans le processus inflammatoire**

La PAS peut moduler les fonctions cellulaires sans recourir à son activité protéolytique (Banach-Wawrzenczyk et al. 2000). La plasmine peut se lier à une multitude de types cellulaires, incluant les monocytes, au niveau de sites de liaison de faible affinité et induire l'aggrégation des neutrophiles, la dégranulation plaquettaire, la libération des dérivés de l'acide arachidonique par les cellules endothéliales (Ryan et al. 1992; Chang et al. 1993; Syrovets et Simmet 2004). Elle stimule également chez les monocytes la libération de médiateurs lipidiques comme les cysteinyl leukotriènes et les leukotriènes B<sub>4</sub>, de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) et de facteurs d'expression tissulaire en plus d'induire d'autres gènes pro-inflammatoires, indiquant que la plasmine agirait elle-même comme facteur pro-inflammatoire (Syrovets et al. 2001; Syrovets et Simmet 2004; Li et al. 2007). La figure R2 résume sous forme schématique le rôle central de la plasmine dans les processus d'inflammation et de remodelage bronchique.



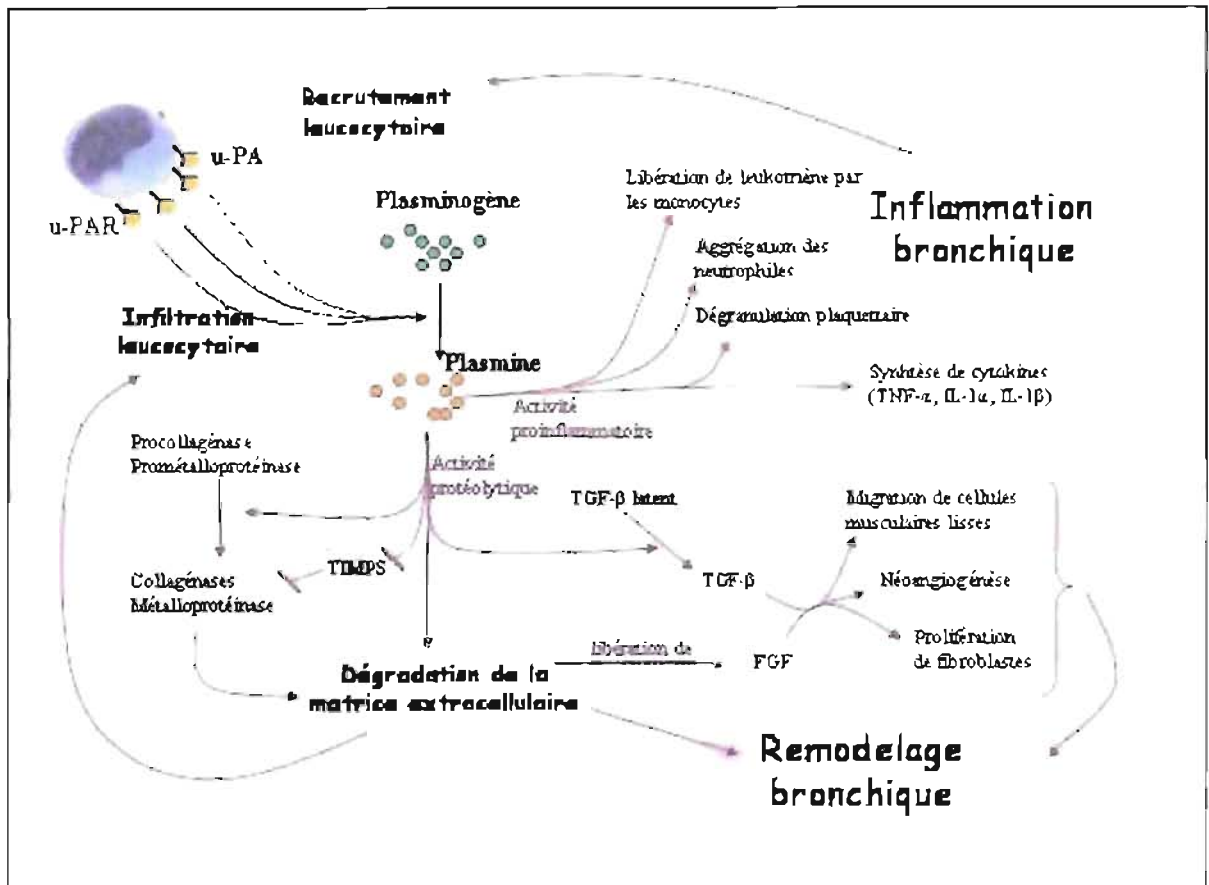


Figure R2. Rôle central de la plasmine dans l'asthme

### 3.2.1.1 Migration cellulaire

Par ailleurs, il a été démontré que le complexe uPA/uPAR joue un rôle fondamental dans la migration cellulaire et l'invasion leucocytaire (Andreasen et al. 1997; Ragno 2006). En effet, les leucocytes sécrètent uPA qui se fixe aux récepteurs uPAR exprimés au niveau de leur membrane cytoplasmique (Gyetko et al. 1994). Lors de la migration cellulaire, les récepteurs uPAR se massent au pôle migratoire du leucocyte, orientant l'activité protéolytique des molécules d'uPA dans la direction de la migration (Gyetko et al. 1994). Ceci permet l'activation de la plasmine dans cette même direction, activant d'une part la dégradation de l'ECM et permettant la progression de la cellule en migration, et libérant d'autre part les facteurs chimiotactiques liés à l'ECM qui vont également favoriser la progression de la cellule dans le tissu. Certains facteurs

de croissances pourraient également être activé directement par l'uPA (Naldini et al. 1992). L'activation du plasminogène péricellulaire est également favorisée par la liaison de ce dernier à des récepteurs cellulaires dont l' $\alpha$ -énolase et l'annexine II (Miles et al. 1991; Duval-Jobe et Parmely 1994; Hajjar et al. 1994). La plasmine s'éloignant de la région péri-membranaire par diffusion est rapidement désactivée par des inhibiteurs (Irigoyen et al. 1999). Le rôle central du complexe uPA/uPAR dans la migration cellulaire a été confirmé dans plusieurs études démontrant que la capacité d'envahissement ou de métastase de modèles cellulaires est diminuée par les inhibiteurs d'uPA, les anticorps anti-uPA et anti-uPAR, par une expression antisense d'uPAR, par des antagonistes d'uPAR et est augmenté par une surexpression d'uPA (Ossowski et al. 1991; Gyetko et al. 1994; Andreasen et al. 1997; Laufs et al. 2006; Nozaki et al. 2006). De hautes concentrations d'uPA et de uPAR ont également été associées à des processus de remodelage tissulaire non tumoraux, tels l'embryogenèse et le processus de guérison (Montuori et al. 2005).

Une étude récente tend à démontrer que le montelukast préviendrait la migration cellulaire en inhibant l'activité du PAS selon un mécanisme indépendant de son action antagoniste sur le récepteur des leukotriènes CysLT 1 (Langlois et al. 2006). L'étude montre que le traitement au montelukast entraîne chez les éosinophiles une diminution à la fois de l'expression de uPAR, de la production de MMP-9 et de l'activation péricellulaire de la plasmine et, parallèlement, une augmentation de l'activité intracellulaire d'uPA et de PAI-2 (Langlois et al. 2006). Une inhibition accrue d'uPA par PAI-2, entraînant une intériorisation des complexes uPA/uPAR/PAI-2 avec recyclage membranaire du récepteur uPAR pourrait expliquer l'augmentation intracellulaire des deux enzymes, la diminution de la protéolyse péricellulaire et l'inhibition de la migration éosinophilique attribuable au montelukast (Langlois et al. 2006).

### 3.2.1.2 Adhésion cellulaire

Le PAS jouerait selon toute évidence un rôle dans l'adhésion cellulaire accompagnant le processus de migration (Reuning et al. 2003). La vitronectine est une protéine sérique

qui stimule l'adhésion et la mobilité des cellules en culture (Preissner 1991). Une étude a démontré que le mouvement de cellules musculaires lisses sur la vitronectine était dépendant de son interaction avec les intégrines exprimées au niveau de la membrane cytoplasmique et qu'il était grandement réduit par l'administration de PAI-1 qui lie la vitronectine spécifiquement au même site que les intégrines (Stefansson et Lawrence 1996). La liaison d'uPA à PAI-1 supprime cet effet en masquant le site de liaison de PAI-1 pour la vitronectine (Stefansson et Lawrence 1996). En fait, uPAR lui-même pourrait lier la vitronectine et agir à titre d'intégrine et cette liaison serait favorisée par la présence d'uPA au niveau du récepteur, qui induirait un changement de conformation exposant de la sorte le site de liaison à la vitronectine d'uPAR (Higazi et al. 1996). Tel que mentionné plus tôt, le complexe uPA/uPAR est inactivé par PAI-1. Par la suite, le complexe uPA/uPAR/PAI-1 serait internalisé par endocytose et seul le récepteur uPAR serait recyclé à la surface favorisant ainsi la clairance du PAI-1 extra-cellulaire (Cubellis et al. 1990). Ainsi, sans faire appel à leurs propriétés protéolytiques, le complexe uPA/uPAR augmenterait l'adhésion cellulaire à la vitronectine et PAI-1 la diminuerait. Les deux systèmes s'opposeraient l'un à l'autre par ces différents mécanismes.

L'adhésion et la motilité cellulaire requièrent une activation du cytosquelette (Irigoyen et al. 1999). L'uPAR étant ancré à la membrane via un groupement GPI, il ne possède pas de domaine cytoplasmique (Irigoyen et al. 1999). En fait, il a été démontré que la fonction adhésive d'uPAR serait dépendante de son interaction avec CR3, une intégrine membranaire (Sitrin et al. 1996). Les résultats d'une autre étude portant sur la transmigration des éosinophiles à travers la membrane basale vont également dans ce sens (Guilbert et al. 1999).

Plus spécifiquement à l'asthme, Brooks et ses collègues ont récemment comparé des éosinophiles bronchiques et des éosinophiles de la circulation périphérique prélevés 48h après un bronchoprovocation allergénique (Brooks et al. 2006). Ils ont noté que les éosinophiles bronchiques exprimaient significativement plus d'uPA et d'uPAR que les éosinophiles de la circulation périphérique. Le fait d'ajouter de retirer l'uPA du complexe membranaire ou d'ajouter de l'uPA exogène n'avait aucun effet sur l'adhésion

des éosinophiles sanguins aux ICAM-1 ou VCAM-1. Au contraire, l'ajout d'uPA exogène augmentait l'adhésion cellulaire des éosinophiles bronchiques aux ICAM-1 et VCAM-1 alors que le fait de le retirer ramenait la capacité d'adhésion à des seuils comparable aux éosinophiles sanguins (Brooks et al. 2006).

#### 3.2.1.3 Chimiotactisme

En plus des fonctions déjà exposées, uPAR pourrait constituer une molécule chimiotactique (Sloand 2005). Suite à un clivage protéolytique ou à un changement de conformation secondaire à la liaison de l'uPA au récepteur, un épitope chimiotactique localisée dans la région connectrice d'uPAR entre D1 et D2 est exposée (Resnati et al. 1996). L'uPAR soluble, lorsque clivé par la chymotrypsine, subit un changement de conformation similaire à celui induit par la liaison à l'uPA, générant une molécule chimiotactique soluble (Fazioli et al. 1997). L'élément de surface interagissant avec cet épitope et responsable de l'activité chimiotactique n'a pas encore été identifié (Fazioli et al. 1997).

#### 3.2.1.4 Immunité

Le complexe uPA/uPAR pourrait également être impliqué dans l'activation des lymphocytes T. On sait que uPA et son récepteur uPAR sont coexprimés avec CD25 (récepteur de IL-2) par les lymphocytes T au moment de leur activation (Nykjaer et al. 1994; Bianchi et al. 1996; Gundersen et al. 1997). Des études *in vitro* indiquent d'ailleurs que uPA serait également indispensable à l'activation des lymphocytes T (Gyetko et al. 1999). Des études utilisant des souris knock-out pour uPAR et uPA ont démontré que ces animaux présentent une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires, en plus d'une réduction substantielle des granulocytes et des lymphocytes dans l'infiltrat pulmonaire (Beck et al. 1999; Gyetko et al. 2000; Gyetko et al. 2001).

En fait, uPA semble être nécessaire au développement de toute réponse immunitaire. Il a par exemple été démontré que des lymphocytes T de souris uPA-déficientes présentaient une réponse proliférative diminuée lors de la répétition d'un contact avec *Cryptococcus neoformans*, une levure opportuniste (Gyetko et al. 1996; Gyetko et al. 2002).

Comparativement aux contrôles, les niveaux mesurés d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 étaient diminués chez ces souris alors que ceux d'IL-5 et d'IL-10 étaient augmentés, suggérant que uPA pourrait, dans certaines conditions physiologiques, favoriser une réponse de type Th1 (Gyetko et al. 1999; Gyetko et al. 2002). Toutefois, une étude évaluant la réponse au *schistosomal egg antigen* de souris knock-out pour uPA, suggère que l'uPA pourrait également jouer un rôle dans l'immunité de type 2 (Gyetko et al. 2004).

L'hypothèse qu'uPA aurait un impact sur le phénotype cellulaire est renforcée par la notion que la liaison de la protéine à son récepteur induit des changements transcriptionnels dans la cellule (Dumler et al. 1998; Tang et al. 1998). L'uPA est aussi reconnu pour potentialiser l'activation des neutrophiles, joueurs importants dans la réponse de type Th1 (Abraham et al. 2003). L'uPAR est également exprimé par les mastocytes mais son activation ne provoque pas la dégranulation (Sillaber et al. 1997).

#### 3.2.1.5 Autres maladies à composante inflammatoire

Comme il a été mentionné, le PAS est impliqué dans plusieurs maladies à caractère inflammatoire. Notamment, l'uPA jouerait un rôle important dans l'arthrite rhumatoïde (Jin et al. 2003). Non seulement la concentration d'uPA serait-elle élevée dans le liquide synovial inflammé, mais l'injection même d'uPA dans l'articulation pourrait induire une synovite en stimulant la relâche d'IL-6, d'IL-1- $\beta$  et de TNF- $\alpha$  (Cunnane et al. 2001; Jin et al. 2003). De plus, le polymorphisme rs4065C, situé dans la région 3' UTR du gène PLAU, pourrait modifier l'expression de la protéine et a été associé à une protection contre l'arthrite rhumatoïde (Huang et al. 2004). Il a également été associé à une protection contre le prolapsus de la valve mitrale (Chou et al. 2004), les lithiases urinaires (Tsai et al. 2002) et la maladie d'Alzheimer (Ozturk et al. 2007).

Le PAS a également été impliqué dans la périodontite et la gingivite (Lindberg et al. 2001; Xiao et al. 2001; Kinnby 2002; Olofsson et al. 2003) ainsi que dans la maladie d'Alzheimer, notamment en ce qui a trait à la dégradation des plaques d'amyloïde (Finckh et al. 2003). Le variant P141 situé sur le 6<sup>e</sup> exon de PLAU pourrait modifier

l'affinité pour l'amyloïde et aurait également été associé à la maladie d'Alzheimer (Finckh et al. 2003; Riemenschneider et al. 2006). Puisque les cellules cancéreuses doivent activer des gènes leucocytaires pour dégrader la matrice pérécellulaire et migrer dans les tissus, il n'est pas étonnant que le variant P141 ait été également associé à une invasion tissulaire accrue dans les cas de cancer colorectal (Przybylowska et al. 2002).

### **3.2.3 Le PAS dans le remodelage bronchique**

Tel que mentionné plus tôt, l'asthme donne lieu à des changements structuraux au niveau des voies respiratoires (Bousquet et al. 2000; Munakata 2006; Fixman et al. 2007). L'étude de biopsies bronchiques de patients asthmatiques a pu démontrer, outre les dommages épithéliaux et l'infiltration des cellules inflammatoires (lymphocytes T, éosinophiles, monocytes), la présence d'anormalités irréversibles (Fixman et al. 2007). Ces anomalies consistent en une déposition accrue de protéines de la matrice extracellulaire dans les parois bronchiques, en une hyperplasie et une hypertrophie des cellules musculaires lisses, en une métaplasie des cellules à mucus et d'une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins (Busse et Lemanske 2001). Même chez les patients nouvellement diagnostiqués, il est possible d'observer un certain remodelage bronchique (Laitinen et al. 1999), de même que chez les sujets avec une hyperréactivité bronchique sans la symptomatologie relative à l'asthme (Laprise et al. 1999). Le degré de HRB est d'ailleurs souvent corrélé à la progression de ces changements structuraux (Chetta et al. 1997). Ce remodelage bronchique serait responsable du développement d'une irréversibilité de l'obstruction bronchique chez les asthmatiques chroniques, associé à une sévérité accrue de la maladie et à une réponse diminuée aux traitements (Pare et al. 1997; Kiley et al. 2007).

#### **3.2.3.1 La plasmine dans le remodelage bronchique**

La plasmine peut dégrader la plupart des protéines composant la matrice extracellulaire, soit par action directe sur les glycoprotéines, ou par l'activation de *matrix metalloproteinases* (MMPs). Non seulement la plasmine active-t-elle les MMPs, qui sont responsables de la protéolyse de la matrice extracellulaire, mais elle prévient

également leur neutralisation par les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP) (Cho et al. 2000). L'action des MMPs est également inhibée par des inhibiteurs de sérine protéases, comme PAI-1 (Cho et al. 2000). La plasmine catalyse de plus l'activation du facteur de transformation tumorale (TGF- $\beta$ ) et la relâche de facteur de croissance des fibroblastes (FGF), des médiateurs importants du remodelage tissulaire (Andreasen et al. 2000).

Comme il en a déjà été question, la plasmine stimule la synthèse de leukotriènes cystéines et de leukotriène B<sub>4</sub> (Weide et al. 1994). Des niveaux élevés de ces deux produits ont d'ailleurs été identifiés dans le fluide de lavage bronchoalvéolaire de patients souffrant de fibrose pulmonaire (Wilborn et al. 1996) et d'asthme (Henderson et al. 1996). Les leukotriènes, par leur action sur des récepteurs spécifiques, provoquent des effets bronchoconstricteurs et pro-inflammatoires (Ogawa et Calhoun 2006). Il a été démontré que des antagonistes des récepteurs aux leukotriènes cystéines réduisent de façon significative l'infiltration éosinophile des voies respiratoires, les bouchons de mucus, l'hyperplasie des cellules musculaires lisses et la fibrose sous-épithéliale, sans toutefois avoir d'impact sur l'hyperréactivité bronchique (Henderson et al. 2002; Ogawa et Calhoun 2006; Izumo et al. 2007).

#### 3.2.3.2 PAI-1 dans le remodelage bronchique

De par son action inhibitrice simultanée sur les activateurs du plasminogène et directement sur les MMPs, PAI-1 pourrait jouer un rôle dans la prévention de la dégradation de la matrice extracellulaire. Il a été démontré que des souris asthmatiques déficientes en PAI-1 présentent moins de dépôt de collagène et de fibrine, ainsi qu'une activité plus élevée de MMP-9 (principale MMP relâchée dans les bronches d'asthmatique (Mautino et al. 1997; Vignola et al. 1998)) comparativement aux contrôles (Oh et al. 2002). Ces mêmes souris sont d'ailleurs résistantes à la fibrose pulmonaire et présentent de façon générale moins d'inflammation pulmonaire que les contrôles (Eitzman et al. 1996).

L'activation du plasminogène pourrait dépendre en partie de l'activation des mastocytes, qui sont reconnus pour jouer un rôle central dans la pathophysiologie de l'asthme. En effet, en plus de sécréter les différents produits de dégranulation (Wojta et al. 2002), les mastocytes expriment tPA de façon constitutive à l'état de repos (Sillaber et al. 1999). Il a été démontré que des animaux déficients en tPA présentent une fibrose pulmonaire plus prononcée (Swaisgood et al. 2000), ce qui suggère que de façon physiologique les mastocytes exhiberaient un phénotype pro-fibrinolytique. Toutefois, ce phénotype serait appelé à changer lors de l'activation des mastocytes dans la réponse inflammatoire. En effet, au moment de l'activation, les mastocytes vont produire PAI-1 de façon massive (Sillaber et al. 1999). Une étude utilisant l'immunofluorescence a d'autre parts permis d'observer une expression importante de PAI-1 par ces cellules suite à des décès par *status asthmaticus* (Cho et al. 2000). Ceci pourrait être en partie à l'action du C5a, qui stimule la production de PAI-1 dans les mastocytes et les basophiles (Wojta et al. 2002). Comme le C5a est dégradé par la plasmine, son action sur PAI-1 le protège de sa propre inhibition, renforçant du coup l'expression de PAI-1 (Wojta et al. 2002). Cette forte expression de PAI-1 pourrait conduire à une inhibition significative de la fibrinolyse et, par conséquent, accélérer la fibrose tissulaire (Kucharewicz et al. 2003).

### 3.2.3.3 Le complexe uPA/uPAR et PAI-2 dans le remodelage bronchique

Tel que mentionné plus tôt, le complexe uPA/uPAR serait un médiateur important de l'infiltration des éosinophiles (Brooks et al. 2006). Les modèles animaux ont démontré que l'infiltration des éosinophiles constitue un facteur important dans le remodelage bronchique (Tanaka et al. 2001). Plusieurs médiateurs relâchés par les éosinophiles présentent notamment des propriétés fibrogéniques (TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , *eosinophil cationic protein* [ECP] et la *major basic protein* [MBP]) et des propriétés antifibrotiques (IL-2, INF-gamma, collagénase) (Levi-Schaffer et al. 1999). De plus, TGF- $\beta$  (produit par les éosinophiles, les macrophages et les cellules épithéliales) stimule la prolifération des fibroblastes et, de surcroît, la synthèse de collagène, ainsi que l'expression de PAI-1 (Minshall et al. 1997; Hara et al. 2001).



Le complexe uPA/uPAR contribue également à la migration des cellules musculaires lisses (Dumler et al. 1998). Une étude récente réalisée par Chu et collaborateurs a démontré une surexpression d'uPA et de son récepteur dans un modèle de culture cellulaire recréant le stress du bronchospasme, ce qui laisse sous-entendre d'une part que l'hyperréactivité bronchique pourrait être une cause plutôt qu'un résultat du remodelage tissulaire et d'autre part que le complexe uPA/uPAR serait impliqué dans ce processus (Chu et al. 2006). Cette augmentation dans l'expression d'uPA était d'ailleurs corrélée à une augmentation de l'activation de MMP-9 et MMP-2 (Chu et al. 2006). Ces observations *in vitro* ont d'ailleurs été appuyées par des analyses de tissu bronchique post-mortem par immunofluorescence ayant démontré que, tout comme PAI-1, l'uPA et l'uPAR se trouvent surexprimés dans les bronches de patients décédés par *status asthmaticus* (Chu et al. 2006).

#### 3.2.3.4 PAI-2 dans le remodelage bronchique

Le rôle de PAI-2 dans le remodelage bronchique est mal défini (Booth 1999). On sait d'une part que PAI-2 sert de régulateur dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation des monocytes, probablement par son action inhibitrice sur l'uPA (Yu et al. 2002). En diminuant la protéolyse et l'infiltration cellulaire au niveau des bronches, PAI-2 pourrait avoir tendance à réduire (contrairement à PAI-1) le remodelage tissulaire. Cette hypothèse est renforcée par l'observation d'une inhibition de l'activité fibrinolytique des monocytes suite à une induction de l'acide rétinoïque, un composé anti-inflammatoire induisant la synthèse de PAI-2 (Montemurro et al. 1999). PAI-2 inhibe en outre l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire type 1 (ICAM-1) par les cellules endothéliales (Shafren et al. 1999). ICAM-1 est nécessaire à la margination et à l'extravasation des éosinophiles dans l'asthme (Tessier et al. 1998).

#### 3.2.4 Le PAS dans l'hyperréactivité bronchique

Plusieurs études indiquent que l'inhalation de surfactant diminue l'HRB et qu'une réduction de la fonction du surfactant a été observée chez les patients asthmatiques (Jarjour et Enhorning 1999; Babu et al. 2003; Baritussio 2004). Il a été suggéré que l'HRB observée chez les patients asthmatiques pourrait en partie être causée par une

inhibition du surfactant par la fibrine extravasculaire, qui constitue un puissant inactivateur du surfactant (Seeger et al. 1985; Wagers et al. 2004; Cederqvist et al. 2006). L'inflammation des voies respiratoires entraîne effectivement une fuite des protéines plasmiques vers la surface des bronches (Yager et al. 1995) et de la fibrine, de la thrombine et du fibrinogène extravasculaires ont été détectés dans les expectorations de sujets asthmatique (Pizzichini et al. 1996; Gabazza et al. 1999). Selon cette hypothèse, l'uPA et le tPA, en favorisant la dégradation de la fibrine, pourraient contribuer à réduire l'HRB. Cette théorie à l'avantage d'expliquer pourquoi une hausse de concentration des activateurs du plasminogène est associée avec l'asthme. Elle est d'ailleurs appuyée par le fait que l'inhalation du tPA en aérosol entraîne une diminution de l'HRB (Wagers et al. 2004). Toutefois, elle ne pourrait expliquer à elle seule le phénomène puisque la fibrine présente dans les voies aériennes distales ne serait pas suffisante pour inhiber le surfactant au point d'entraîner l'HRB (Matthay et Clements 2004).

Le remodelage et l'inflammation bronchique représentent des enjeux importants dans l'asthme et sont reliés à la sévérité de la maladie (Busse et Lemanske 2001). Il est intéressant de remarquer que les traitements présentement disponibles, principalement les corticostéroïdes, sont très efficaces pour réduire l'inflammation, mais semblent moins efficaces pour prévenir l'apparition du remodelage tissulaire (Burgel et Chanez 2005). L'identification de nouveaux facteurs modulant l'inflammation et le remodelage bronchique ainsi qu'une meilleure compréhension de la physiopathologie qui sous-tend ces processus constituent une étape importante dans le développement de stratégies de traitements mieux ciblées, qui pourraient notamment prévenir l'apparition de changements irréversibles dans les voies respiratoires. C'est dans cette optique que s'inscrit l'étude présentée dans le cadre de ce mémoire visant à identifier une association entre l'asthme et les variants du gène PLAU.

## Article

L'article suivant, intitulé « Association of Urokinase-type Plasminogen Activator with Asthma and Atopy, » a été publié en ligne le 15 mars 2007 dans l'*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*.

La contribution particulière de l'auteur du présent mémoire de maîtrise à cet article scientifique inclut la sélection du gène et des variants étudiés, une participation à l'interprétation des résultats de séquençage, la mise au point et la réalisation du génotypage pour la majorité des variants dans l'échantillon familial du SLSJ, l'analyse statistique et haplotypique des résultats du SLSJ, la discussion de l'ensemble des résultats ainsi que la rédaction de l'article lui-même.

K. Tremblay a pour sa part supervisé l'ensemble des travaux de laboratoire relatifs au génotypage de l'échantillon familial du SLSJ et procéder à la révision de l'article. D. Daley et M. Lemire ont procédé à l'analyse des résultats du génotypage Allergen (cohortes SAGE et CAPPS). D. Daley a de plus réalisé les analyses de stratifications ethniques dans ces cohortes et rédigé la section des résultats concernant les analyses génétiques des cohortes SAGE et CAPPS. S. Claveau et C. Salessse ont réalisé le séquençage de PLAU. Sous la supervision de S.Claveau et K. Tremblay, S. Kacel a complété les génotypes manquants dans l'échantillon familial du SLSJ. A. Montpetit était responsable du génotypage (Illumina) des cohortes SAGE et CAPPS. A. Becker A.L. Kozyrskyj étaient responsables du recrutement et du phénotypage de la cohorte SAGE. A. Becker et M. Chan-Yeung étaient responsables du recrutement et phénotypage de la cohorte CAPPS. T.J. Hudson et C. Laprise étaient responsables du recrutement et du phénotypage de l'échantillon familial du SLSJ. Enfin, C. Laprise a supervisé l'ensemble des étapes de ce projet de recherche allant du design de l'étude aux travaux de laboratoire et à la rédaction de l'article.

L'accord de l'éditeur ainsi que de l'ensemble des coauteurs à l'inclusion de l'article dans ce mémoire paraît en annexe.

**TITLE:** Association of Urokinase-type Plasminogen Activator with Asthma and Atopy  
**AUTHORS:** Philippe Bégin<sup>1,2</sup>, Karine Tremblay<sup>1,3</sup>, Denise Daley<sup>4</sup>, Mathieu Lemire<sup>5</sup>, Sébastien Claveau<sup>1,6</sup>, Charleen Salesse<sup>1,6</sup>, Sabine Kacel<sup>1,6</sup>, Alexandre Montpetit<sup>5</sup>, Allan Becker<sup>7</sup>, Moira Chan-Yeung<sup>7</sup>, Anita L Kozyrskyj<sup>7,8</sup>, Thomas J. Hudson<sup>9</sup> and Catherine Laprise<sup>1,6</sup>

**AFFILIATIONS :** <sup>1</sup> University of Montreal Community Genomic Medicine Centre, Chicoutimi University Hospital, Saguenay (Qc), Canada; <sup>2</sup> Department of Medicine, University of Montreal, Montreal (Qc), Canada; <sup>3</sup> Department of Medicine, Université Laval, Québec (Qc), Canada; <sup>4</sup> James Hogg iCapture Centre, University of British Columbia, Vancouver (BC), Canada; <sup>5</sup> McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montréal (Qc), Canada; <sup>6</sup> Department of fundamental sciences, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay (Qc), Canada; <sup>7</sup> Department of Pediatrics and Child Health, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg (Man), Canada; <sup>8</sup> Faculty of Pharmacy and department of Community Health Sciences, Manitoba Centre for Health Policy, Winnipeg (Man) Canada; <sup>9</sup> Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, (ON), Canada

**CORRESPONDING AUTHOR:**

Catherine Laprise, Ph.D.

Université du Québec à Chicoutimi

555, boulevard de l'Université,

Chicoutimi PQ, Canada, G7H 2B1

Email : [information retirée / information withdrawn]

**FUNDING SOURCES:** This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Respiratory Health Network of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). AllerGen NCE Inc paid for the genotyping.

**RUNNING TITLE:** Association between PLAU and asthma

**DESCRIPTOR NUMBER:** 58 (asthma : genetics)

**NUMBER OF WORDS:** 3515

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's online table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

BÉGIN P, TREMBLAY K, DALEY D, LEMIRE M, CLAVEAU S, SALESSE C, KACEL S,  
MONTPETIT A, BECKER A, CHANG-YEUNG M, KOZYRSKYJ AL, HUDSON TJ, LAPRISE C.  
(2007) "ASSOCIATION OF UROKINASE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR WITH ASTHMA  
AND ATOPY"

AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE

VOLUME 175 PAGES 1109-1116.

OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY

© AMERICAN THORACIC SOCIETY

**ABSTRACT**

*Rationale:* Urokinase plasminogen activator (uPA) interacts with its receptor on inflammatory and migrating cells to regulate extracellular matrix degradation, cell adhesion, and inflammatory cell activation. It is necessary for the development of an appropriate immune response and is involved in tissue remodeling. The *PLAU* gene codes for this enzyme, and is located on 10q24. This region has demonstrated evidence for linkage in a genome scan for asthma in a sample from northeastern Quebec. Here, we hypothesized that uPA may function as a regulator of asthma susceptibility.

*Methods:* We sequenced *PLAU* and tested for genetic association between identified variants and asthma-related traits in a French- Canadian familial collection (231 families, 1,139 subjects). Additional association studies were performed in two other family-based Canadian cohorts (Canadian Asthma Primary Prevention Study (CAPPS), 238 trios; and Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE), 237 trios).

*Measurements and Main Results:* In the original sample, under the dominant model, the common alleles, rs2227564C (P141) and rs2227566T, were associated with asthma ( $p = 0.011$  and  $0.045$ , respectively) and with airway hyperresponsiveness (AHR) ( $p = 0.026$  and  $0.038$ , respectively). Analysis of the linkage disequilibrium pattern also revealed association of the common haplotype for asthma, atopy, and AHR ( $p = 0.031$ ,  $0.043$ , and  $0.006$ , respectively). Whereas no significant association was detected for *PLAU* single-nucleotide polymorphisms in the CAPPS cohort, association was observed in the SAGE cohort between the rs4065C allele and atopy under additive ( $p = 0.005$ ) and dominant ( $p = 0.0001$ ) genetic models.

*Conclusions:* This suggests a role for the uPA pathway in the pathogenesis of the disease.

**WORD COUNT:** 260

**KEY WORDS:** Asthma, Airway Hyperresponsiveness, Atopy, Association study, Haplotypes, Urokinase-type Plasminogen Activator (*PLAU* gene)

## INTRODUCTION

Asthma is recognized as a complex trait and the genetic risk factors for its development, its progression and its subphenotypes remain largely unknown despite several genetic studies performed in the past decade. In a genome scan conducted in 2004 to identify susceptibility loci for asthma and related phenotypes in a French-Canadian population, eight chromosomal regions with suggestive evidence for linkage were identified (1). Two regions were suggestive for asthma (6q26 and 16p12.1, asthma) and two for atopy (10q24 and 11q13, atopy) phenotypes, whereas the remaining four were associated with elevated IgE levels (5q23.3, 6q27, 7q22.2 and 9q21.32). This was the first time that the 10q24 region was identified in a linkage study for asthma (logarithm of the odds = 2.32;  $p = 0.00016$ ). In addition, this novel region was found to be associated with severe asthma in a more recent genome scan conducted in a Puerto-Rican population ( $p < 10^{-4}$ ) (2).

The 10q24 region harbors the urokinase-type plasminogen activator (*PLAU*) gene, which is expressed in most cell types and encodes for the urokinase plasminogen activator (uPA), a secreted proteolytic enzyme involved in many biological processes, including inflammation and tissue remodeling (3). This enzyme is recruited to the cell membrane by the uPA receptor, where it interacts with both extracellular and membrane components (4) to activate pericellular plasmin-mediated proteolysis (3) and to activate several intracellular signaling pathways. It has notably been implicated in the activation and infiltration of lung tissue by T cells and eosinophils (5, 6). *PLAU* and its receptor have been shown to be upregulated in a human cell culture model of asthma after application of compressive stress mimicking bronchospasm as well as in post-mortem lung tissue from patients that died from status asthmaticus (7). Its two main inhibitors, *SERPINE1* and *SERPINB2*, have also been shown to be overexpressed in asthmatic bronchial tissue (8) and a variant of *SERPINE1* has been associated with an increased risk for asthma (9).

To the best of our knowledge, the *PLAU* gene itself has never been studied for association with asthma. It has however been found to be associated with other diseases involving inflammation or extracellular proteolysis. The common *PLAU* gene variant P141 (rs2227564C) has been associated with increased susceptibility for late-onset Alzheimer's (10, 11) and colorectal cancer invasion (12) while common 3' UTR variant rs4065C has been associated with a decreased risk for rheumatoid arthritis (13), mitral valve prolapse (14), urolithiasis (15) and Alzheimer's (16).

Combining positional cloning and candidate gene approaches, and based on reported genetic associations with other diseases, we hypothesized that *PLAU* may act as an asthma susceptibility gene. To verify this, we sequenced *PLAU* gene and conducted an association study in a French-Canadian family-based sample. We then investigated two additional Canadian trio-based cohorts for replication purpose. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (*Proc Am Thorac Soc*, 2005; 2:A620) (17).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Samples**

The original study sample comprises 231 asthmatic families from Saguenay-Lac-St-Jean (SLSJ) (1139 subjects), a region of Northeastern Quebec (Canada) recognised as a young founder population (18-22). This sample was described in a recent report (23) and all information concerning recruitment and clinical evaluation of subjects is available in the online supplement. Clinical characteristics are presented in Table 1. Briefly, asthma phenotype was characterized by the investigators for all participants using a respiratory health questionnaire and function tests following ATS standards (22). Airway hyperresponsiveness (AHR) was defined as a positive challenge to methacholine ( $PC_{20} < 8$  mg/ml) at time of recruitment. If  $PC_{20}$  was not measurable, a 12% augmentation in forced expiratory volume in one second ( $FEV_1$ ) after inhalation of a bronchodilator or a variation in peak expiratory flow (PEF) of at least 15% within a two-week period were also considered diagnostic of AHR (22). Participants were defined as asthmatic if 1)



they had a reported history of asthma (validated with physician), or if 2) they showed asthma related symptoms and a positive methacholine provocation test ( $PC_{20}$ ) at the time of recruitment. Subjects were deemed atopic if they had at least one positive response (wheal diameter  $\geq 3$  mm at 10 minutes) on skin prick test (24). Subject with  $PC_{20} > 8$ mg/ml; without history of physician diagnosed asthma and without both symptoms of asthma and  $PC_{20} > 8$ mg/ml; and with no positive response on skin prick test were considered unaffected for AHR, asthma and atopy respectively.

The Canadian Asthma Primary Prevention Study cohort (CAPPS cohort) (25-27) and the Study of Asthma Genes and the Environment birth cohort (SAGE cohort) were used as replication cohorts. These two cohorts are fully described in the online supplement and clinical characteristics are presented in Table 2. Briefly, children affected with asthma or related phenotypes were selected along with their parents from these two population asthma cohorts to form study trios for replication analysis. Phenotypes were characterized for all children in each recruiting center, either at time of recruitment (for the SAGE cohort) or at 7 years of age (for the CAPPS cohort), and asthma was diagnosed by a pediatric allergist based on clinical evaluation. Challenge to methacholine was performed for all children in both cohorts. AHR was defined as  $PC_{20} < 6.6$  mg/ml (28, 29). Atopy was defined as at least one positive response on skin prick test (24).

### ***PLAU* Sequencing**

In order to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) for genetic analyses, fifty unrelated asthmatic probands (25 males and 25 females) were selected from the SLSJ sample (validated using BALSAC population register (19)). *PLAU* sequence information was obtained from Ensembl v33 (<http://www.ensembl.org/index.html>). The sequenced region spanned 7.6 kb starting from 850bp upstream of the mRNA transcription start site (30) to 430bp downstream of the 3'UTR. The gene was divided in ten regions; the amplification primers, conditions and material are presented in online supplement. SNPs described in this report are cited using their reference sequence

number (rs#) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database if documented.

### **Genotyping**

Blood samples were drawn from all participants and DNA was extracted from whole blood leukocytes using Genomic-tip 100/G kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to manufacturer's instructions. Genotyping was performed for eight SNPs (Table 3) in the SLSJ sample using either Fluorescence Polarization with Analyst™ HT (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) (31), TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), or Illumina Beadlab (Illumina, Inc., San Diego, CA) technologies, according to the lab's availability. Four of these SNPs (rs2688607, rs2227562, rs2227564, rs4065) were genotyped in the two additional samples using Illumina technology. Consult this journal's online supplement for protocols, primers and PCR conditions.

### **Statistical analysis**

Allele distribution patterns and Mendelian errors in the original sample were assessed by FBAT software (1.7 version; Harvard University, Boston, MA) (32-34) under additive and dominant genetic models using the empirical variance estimator “-e” for each PLAU SNP and tested phenotypes (32). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for each SNP and strength of linkage disequilibrium between pairs of SNPs, measured as D prime (D') (35), were done using Haploview software (3.31 version) (36). Regions of strongly associated markers were inferred using the definition proposed by Gabriel et al. (37) implemented in Haploview. Based on the linkage disequilibrium block of variants, haplotypes were inferred and assessed for nonrandom transmission using the “hbat” command of the FBAT software (38) under additive and dominant models using the empirical variance estimator “-e” (32).

A similar approach was taken for the replication analyses in the CAPPS and SAGE cohorts. Indeed, the theoretical expression of the variance of the FBAT statistic was used (default parameters), under additive and dominant models. Haplotypes were

inferred and assessed for both cohorts using the “hbat” command of the FBAT software, under additive and dominant models.

## RESULTS

### *PLAU* sequencing

All exonic regions were sequenced except for short gaps in exon 4 and in the 3'UTR; most of the intronic regions were also sequenced (Figure 1). As no documented SNPs are known in these gaps and as we judged we had a sufficient SNP coverage, we did not complete the sequence of these gaps. Sequence analysis allowed the identification of 13 polymorphisms. The SNP selection criteria for the association study were based on the allele frequency that had to be greater than 5% as determined by sequencing and on the location within the *PLAU* gene with priority put on coding regions, regulatory regions (i.e. 5' and 3'UTR) and intron / exon junctions.

Seven SNPs were initially selected for *PLAU* characterization and association testing (presented in Figure 1 in the 5' → 3' order): rs1916341, rs2227562, rs2227564, rs2227566, rs2227568, rs2227571 and rs4065. Among the SNPs identified, an A/T substitution located upstream of the *PLAU* gene was not documented in the NCBI SNP database, this SNP had an allele frequency less than 5% and therefore was not selected for the association study. Of the remaining five discarded SNPs, four were uninformative, with minor allele frequencies <0.025, and one SNP, rs2227560, had a failed genotyping assay. Among the seven selected SNPs were the two previously studied variants rs2227564 (P141L) (10, 12) and rs4065 (13-15). In addition to this initial selection, SNP rs2688607 was genotyped in all three studies through the AllerGen NCE ([www.allergen-nce.ca](http://www.allergen-nce.ca)) gene panel (refer to the online supplement for details on its selection). It is located 7kb upstream of exon 1 (SNP characteristics presented in Table 3).

### Genotyping

In the SLSJ sample, genotyping completion rate was >98% for the eight selected SNPs. Mendelian error was present in only two families for three and four SNPs each, suggesting non-paternity or sample error. These families were excluded from further analyses. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested for each SNP with a chi-square test using one degree of freedom. Of the eight SNPs, only rs2227564 gave a significant deviation from HWE ( $p = 0.036$ ); given the number of SNPs tested, this deviation could have occurred by chance alone or as a result of association.

In both replication cohorts, genotyping completion rate was >95% for the four SNPs and there were no Mendelian errors in either the CAPPs or SAGE cohorts. We examined the evidence for departure from HWE separately for the parents and offspring. Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium is observed in the parental generation of the SAGE cohort for rs4065 ( $p = 0.0031$ ), and in the parental generation of the CAPPs cohort for rs2688607 ( $p = 0.006$ ), and rs2227564 ( $p = 0.027$ ). There is no evidence for departure from HWE in the offspring generation of either cohort. We note that one potential explanation for this finding may be admixture in the parental generation, as both the CAPPs and SAGE cohorts include minority populations. To examine this hypothesis we stratified the cohorts by ethnicity and examined allele frequencies and HWE. We found that for SNPs rs2688607 and rs4065 the major and minor allele depends upon population ethnicity as the most frequent allele in white population is the minor allele in the Asian population of these samples (see Table E3 in online supplement). When stratified by ethnicity the parental generation of the CAPPs cohort is in HWE for the Asian population and there is only minor evidence for departure for rs2227564 ( $p = 0.04$ ) in the Caucasian population. For the SAGE cohort when testing for HWE stratified by ethnicity there is no evidence for departure from HWE in any ethnicity. This suggests that the departure from HWE observed in the combined analyses of these cohorts is due to population stratification. One of the benefits of the trio design is protection against type 1 error due to population stratification. However, our data indicates that caution should be exercised when examining this locus in case control designs.

### **Family-based association analyses of *PLAU* SNPs in the SLSJ Familial sample**

The eight *PLAU* SNPs were tested individually for association with asthma, atopy and AHR under additive and dominant genetic models (Tables 4 and 5). The FBAT software calculates the number of times a given allele is transmitted to affected offspring (Statistic S) and compares it to the number of times it should be transmitted under the null hypothesis of transmission equilibrium (Expected Statistic E(S)). The Z-score is the measure of the deviation of S from E(S) and thus a measure of transmission disequilibrium (32). Under the additive model, statistical analysis results (Table 4) show one suggestive association for rs2227566T with atopy ( $p = 0.041$ ). Under the dominant model (Table 5), the common alleles rs2688607C, rs2227564C (P141) and rs2227566T are overtransmitted to asthmatic probands ( $p = 0.035$ ,  $0.011$  and  $0.045$ , respectively) and to probands presenting AHR ( $p = 0.062$ ,  $0.026$  and  $0.038$ , respectively), but not significantly to atopic probands.

### ***PLAU* linkage disequilibrium and haplotype specific association analyses**

Figure 2 shows Haploview linkage disequilibrium plot forming a unique block indicating that SNPs are likely to be transmitted together. Within this region of high linkage disequilibrium, three haplotypes (H8 (1), H8 (2) and H8 (3)) with frequencies higher than 5% were observed (Table 6) and assessed for nonrandom transmission in the SLSJ familial sample (Table 7). Frequent haplotype H8 (1) was shown to be overtransmitted to probands with asthma, atopy and AHR under additive model ( $p = 0.024$ ,  $0.056$  and  $0.015$ , respectively) and with asthma, atopy and AHR in dominant genetic model ( $p = 0.031$ ,  $p = 0.043$  and  $0.006$ , respectively).

### **Family-based association analyses of *PLAU* SNPs in the CAPPS and SAGE cohorts**

Four *PLAU* SNPs were tested individually for association with asthma, atopy and AHR under additive and dominant genetic models. No significant findings were found in the CAPPS cohort under both genetic models (see Tables E4 and E5 in online supplement). Analyses were however suggestive of a negative association between the rs2227562A and rs4065C alleles and AHR ( $p$  values between  $0.06$  and  $0.12$ ). In the SAGE cohort, a significant association between atopy and the rs4065C allele has been found. Under the additive model (Table 8) the C allele was undertransmitted to children with atopy ( $p$

value = 0.005), and a similar pattern has been observed under the dominant genetic model with the rs4065C allele being undertransmitted ( $p$  value = 0.0001) (Table 9). No association with asthma or airway hyperresponsiveness has been observed in the SAGE cohort.

Haplotype analyses were also carried out with the four *PLAU* SNPs (Haploview linkage disequilibrium plot presented in the online supplement Figure E1). In the CAPPs cohort, the common H4 (1) haplotype was overtransmitted to children with AHR ( $p$  = 0.061, additive model) while the minor H4 (3) haplotype was significantly undertransmitted to the same children ( $p$  = 0.051 and 0.045, additive and dominant models, respectively) (Table E6 in online supplement). In the SAGE cohort, the common H4 (1) haplotype was overtransmitted to children with atopy ( $p$  = 0.010, additive) (see Table E7 in online supplement). These findings are consistent with the H8 haplotype analysis from the original SLSJ familial sample (Table 7). When using the same four SNPs for comparison however, common haplotype H4 (1) fails to reach significance in the SLSJ sample (Table E8 in online supplement). This suggests that the additional SNPs are necessary to better delineate the functional variant in the original SLSJ sample.

Given their similar structures, the CAPPs and SAGE samples were combined for further analyses (Tables E9 and E10 in online supplement). The results showed a negative association between allele rs2227562A and asthma ( $p$  = 0.046, additive; and  $p$  = 0.028, dominant), as well as between allele rs4065C and both asthma and AHR ( $p$  = 0.058 and  $p$  = 0.0002, dominant). Haplotype analysis showed common haplotype H4 (1) to be overtransmitted to probands with atopy ( $p$  = 0.006, additive), while minor haplotype H4 (3) was under transmitted to probands with asthma and AHR ( $p$  = 0.049 and  $p$  = 0.050; dominant).

## **DISCUSSION**

Using family-based samples, we observed associations between allelic variants of novel candidate gene *PLAU* and asthma phenotypes in three independent Canadian population

samples. In the original French-Canadian familial sample, the common alleles of three SNPs, rs2688607, rs2227564C (P141) and rs2227566T, were associated with asthma and AHR. Additional studies were carried out in two other Canadian cohorts (CAPPS and SAGE), where common allele rs4065C exhibited a highly significant association with protection from atopy. These single marker association results were further supported by haplotype association analysis which identified significant non-random distribution of marker haplotypes covering 12 kb the *PLAU* gene.

These results are in accord with current literature suggesting a role for the uPA in asthma pathogenesis. At the cellular level, it is believed to increase pericellular proteolysis which in turn releases chemotactic mediators and favors adhesion and migration of eosinophils, fibroblasts and smooth muscle cells through the extracellular matrix in lung tissue (3-5, 39, 40). By activating its membrane receptor, it also triggers several intracellular pathways (39, 41), which induce rearrangement of cytoskeleton and cell movement (40, 41), as well as activation of inflammatory cells (42) and T cell priming (43). Knock-out mice for *PLAU* gene fail to generate appropriate response to *Cryptococcus neoformans* infection and to schistosomal antigen challenge, suggesting that uPA is essential for the development of both type 1 and type 2 immune responses (44, 45).

Previous studies have also shown the rs2227564C (P141) and rs4065C alleles to be respectively associated with susceptibility and protection for other diseases involving inflammation and tissue remodeling (10-15). However, only the rs2227564 (P141L) variant has been studied for its functional impact. This C/T mutation codes for the nonsynonymous change of a proline (P) for a leucine (L) at amino acid position 141, located in the kringle domain of the urokinase protein (46). The kringle structure has the affinity for heparin, plasminogen and extracellular matrix components, such as proteoglycans, and is necessary for binding to the urokinase receptor (12, 47). The L141 allele has been shown to decrease the affinity for fibrin and possibly for other extracellular matrix components, by enhancing the hydrophobicity of the kringle structure (48).

Little documentation is available for the other associated variants. As SNPs rs2688607 and rs2227566 fall in the same haplotype block as rs2227564 (P141L) ( $D' = 0.92$  and  $0.94$ ), it is likely that these SNPs act as markers of P141L rather than as causal mutations. The rs4065 variant is located in the 3'UTR of *PLAU* mRNA, which contains multiple instability-determining regions (49). Although its functional impact has not been studied, it could be hypothesized that the rs4065 variant would modulate *PLAU* expression at a post-transcriptional level, either by directly modifying the stability of the 3'UTR or by altering its affinity for mRNA-stabilizing factors (50). It is also possible that rs4065 would be linked to another functional SNP located in a portion of 3'UTR not covered by gene sequencing. More functional work is needed to delineate the real impact of these SNPs in asthma pathogenesis.

Populations with founder effect, such as the one from Saguenay–Lac-Saint-Jean, are important in multigenic diseases mapping because they exhibit a lower number of risk genes for a given disease and thus allow the identification of susceptibility loci that would have otherwise been concealed by other high risk loci (51). Neale and Sham have suggested that the gene, rather than specific variants or haplotypes, should be considered as the unit of replication (52). In a recent review, Ober and Hoffjan support this definition of replication because there are now many examples of established associations with different functional variants within the same gene in different populations (53). Therefore, although association results were not directly replicated in the SAGE cohort, the association of the rs4065C variant with protection from atopy does support the association of *PLAU* with asthma phenotypes and provides evidence that it is not a unique feature of Saguenay–Lac-Saint-Jean. More work will however be needed to better judge the association's importance amongst, and interaction with, other genetic and environmental factors.

In conclusion, we found that common alleles rs2227564C (P141) and rs2227566C were associated with asthma and AHR in a Northeastern Quebec sample. We also found a common *PLAU* haplotype to be associated with susceptibility to asthma, AHR and



atopy. We showed these findings were consistent with data from two other Canadian cohorts, where allele rs4065C could be associated with protection from atopy. This further supports the potential role of the plasminogen activating pathway in the pathogenesis of asthma.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all families for their enthusiastic participation in this study. The authors would like to thank Diane Gagné, Muriel Grenon and Dr Paul Bégin for their invaluable participation in the ascertainment of the subjects. P. Bégin and K. Tremblay are supported by the Allergy, Genes and Environment Network (AllerGen). T.J. Hudson is recipient of an Investigator Award from the Canadian Institutes of Health Research and a Clinician-scientist Award in Translational Research from the Burroughs Wellcome Fund. C. Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair on genetic determinants in asthma and the director of the Genetics platform of the Respiratory Health Network (RHN) of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), which financially supports the SLSJ sample. D. Daley is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Institutes of Gender and Health, Genetics, Population and Public Health, and the IMPACT fellowship. D. Daley is also supported by the Lung Association of British Columbia. The AllerGen Network financially supported genotyping.

**REFERENCES**

1. Laprise C, Lemire M, Sammak A, Verner A, Hudson TJ. Asthma Genome Scan in a French-Canadian Founder Population [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;169:A628.
2. Choudhry S, Mei R, Tsai HJ, Matsuzaki H, Tang H, Loi H, Matallana H, Dong S, Ung N, Narzario S, Casal J, Marcus G, Walsh S, Shriver M, Jones K, Rodriguez W, Ziv E, Burchard EG. Genome-Wide Association Study of Severe Asthma among Puerto Ricans [abstract]. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:A31.
3. Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999;56(1-2):104-132.
4. Waltz DA, Fujita RM, Yang X, Natkin L, Zhuo S, Gerard CJ, Rosenberg S, Chapman HA. Nonproteolytic role for the urokinase receptor in cellular migration in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22(3):316-322.
5. Brooks AM, Bates ME, Vrtis RF, Jarjour NN, Bertics PJ, Sedgwick JB. Urokinase-type Plasminogen Activator Modulates Airway Eosinophil Adhesion in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;35:503-511.
6. Gyetko MR, Sud S, Sonstein J, Polak T, Sud A, Curtis JL. Antigen-driven lymphocyte recruitment to the lung is diminished in the absence of urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor, but is independent of uPA. *J Immunol* 2001;167(10):5539-5542.
7. Chu EK, Foley JD, Cheng J, Drazen JM, Tschumperlin DJ. Mechanical Regulation of the Urokinase System as a Potential Mediator of Remodeling in a Human Cell Culture of Asthma [abstract]. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:A517.
8. 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):21-30.
9. Buckova D, Izakovicova Holla L, Vacha J. Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. *Allergy* 2002;57(5):446-448.

10. Finckh U, van Hadeln K, Muller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, Nitsch RM, Stoppe G, Reiss J, Gal A. Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of *PLAU*, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. *Neurogenetics* 2003;4(4):213–217.
11. Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, Padovani A, Kolsch H, Laws SM, Klopp N, Bickeboller H, Wagenpfeil S, Mueller JC, Rosenberger A, Diehl-Schmid J, Archetti S, Lautenschlager N, Borroni B, Muller U, Illig T, Heun R, Egensperger R, Schlegel J, Forstl H, Martins RN, Kurz A. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (*PLAU*) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2006;15(16):2446-2456.
12. Przybylowska K, Smolarczyk K, Kulig A, Romanowicz-Makowska H, Dziki A, Ulanska J, Pander B, Blasiak J. Antigen levels of the urokinase-type plasminogen activator and its gene polymorphisms in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2002;181(1):23-30.
13. Huang CM, Chen CL, Tsai JJ, Tsai CH, Tsai FJ. Association between urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism and Chinese patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(2):219-222.
14. Chou HT, Chen YT, Wu JY, Tsai FJ. Association between urokinase-plasminogen activator gene T4065C polymorphism and risk of mitral valve prolapse. *Int J Cardiol* 2004;96(2):165-170.
15. Tsai FJ, Lin CC, Lu HF, Chen HY, Chen WC. Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis. *Urology* 2002;59(3):458-461.
16. Ozturk A, Minster RL, DeKosky ST, Kamboh MI. Association of tagSNPs in the urokinase-plasminogen activator (*PLAU*) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144(1):79-82.
17. Begin P, Provost V, Page N, Hudson TJ, Laviolette M, Laprise C. Association between the *PLAU* Gene and Asthma in a French Canadian Population [abstract]. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:A620.
18. Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J. A susceptibility locus for

asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 2001;28(1):87-91.

19. Heyer E, Tremblay M. Variability of the genetic contribution of Quebec population founders associated to some deleterious genes. *Am J Hum Genet* 1995;56(4):970-978.

20. Labuda M, Labuda D, Korab-Laskowska M, Cole DE, Zietkiewicz E, Weissenbach J, Popowska E, Pronicka E, Root AW, Glorieux FH. Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians. *Am J Hum Genet* 1996;59(3):633-643.

21. Sriver CR. Human genetics: lessons from Quebec populations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001;2:69-101.

22. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 1987;136(1):225-244.

23. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnott D, Schurr E, Hudson TJ. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(9):967-973.

24. Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1989;44 Suppl 10:1-59.

25. 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.

26. 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. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(1):49-55.

27. Becker A, Watson W, Ferguson A, Dimich-Ward H, Chan-Yeung M. The Canadian asthma primary prevention study: outcomes at 2 years of age. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):650-656.

28. Godfrey S. Bronchial hyper-responsiveness in children. *Paediatr Respir Rev* 2000;1(2):148-155.
29. Godfrey S, Springer C, Bar-Yishay E, Avital A. Cut-off points defining normal and asthmatic bronchial reactivity to exercise and inhalation challenges in children and young adults. *Eur Respir J* 1999;14(3):659-668.
30. Riccio A, Grimaldi G, Verde P, Sebastio G, Boast S, Blasi F. The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. *Nucleic Acids Res* 1985;13(8):2759-2771.
31. Kwok PY. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Mutat* 2002;Apr;19(4):315-323.
32. Lake SL, Blacker D, Laird NM. Family-based tests of association in the presence of linkage. *Am J Hum Genet* 2000;67(6):1515-1525.
33. Horvath S, Xu X, Lake SL, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data: application to asthma genetics. *Genet Epidemiol* 2004;26(1):61-69.
34. Laird NM, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* 2000;19 Suppl 1:S36-S42.
35. Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988;120(3):849-852.
36. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263-265.
37. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296(5576):2225-2229.
38. Laird N, Horvath S, Xu X. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genetic Epi* 2000;19(Suppl 1):S36-S42.
39. Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC. The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998;273(1):315-321.

40. Bernstein AM, Greenberg RS, Taliana L, Masur SK. Urokinase Anchors uPAR to the Actin Cytoskeleton. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):2967-2977.
41. Aguirre Ghiso JA, Kovalski K, Ossowski L. Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol* 1999;147(1):89-104.
42. Abraham E, Gyetko MR, Kuhn K, Arcaroli J, Strassheim D, Park JS, Shetty S, Idell S. Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. *J Immunol* 2003;170(11):5644-5651.
43. Gyetko MR, Libre EA, Fuller JA, Chen GH, Toews G. Urokinase is required for T lymphocyte proliferation and activation in vitro. *J Lab Clin Med* 1999;133(3):274-288.
44. Gyetko MR, Sud S, Chen GH, Fuller JA, Chensue SW, Toews GB. Urokinase-type plasminogen activator is required for the generation of a type 1 immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol* 2002;168(2):801-809.
45. Gyetko MR, Sud S, Chensue SW. Urokinase-deficient mice fail to generate a type 2 immune response following schistosomal antigen challenge. *Infect Immun* 2004;72(1):461-467.
46. Hansen AP, Petros AM, Meadows RP, Nettesheim DG, Mazar AP, Olejniczak ET, Xu RX, Pederson TM, Henkin J, Fesik SW. Solution structure of the amino-terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator. *Biochemistry* 1994;33(16):4847-4864.
47. Bdeir K, Kuo A, Sachais BS, Rux AH, Bdeir Y, Mazar A, Higazi AA, Cines DB. The kringle stabilizes urokinase binding to the urokinase receptor. *Blood* 2003;102(10):3600-3608.
48. Yoshimoto M, Ushiyama Y, Sakai M, Tamaki S, Hara H, Takahashi K, Sawasaki Y, Hanada K. Characterization of single chain urokinase-type plasminogen activator with a novel amino-acid substitution in the kringle structure. *Biochim Biophys Acta* 1996;1293(1):83-89.
49. Nanbu R, Menoud PA, Nagamine Y. Multiple instability-regulating sites in the 3' untranslated region of the urokinase-type plasminogen activator mRNA. *Mol Cell Biol* 1994;14(7):4920-4928.

50. Tran H, Maurer F, Nagamine Y. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7177-7188.
51. Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet* 2005;46(1):93-104.
52. Neale BM, Sham PC. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet* 2004;75(3):353-362.
53. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun* 2006;7(2):95-100.



## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1:** *PLAU* gene sequenced region and identified SNPs scaled location

Schematic presentation of the *PLAU* genomic organization and localization of identified SNPs. Exons are depicted as black boxes with the corresponding exon numbers on top. Introns and non-coding regions are depicted as lines between exon boxes. Horizontal bold lines indicate the gaps that were not sequenced. Black diamonds and triangles indicate the genotyping technology used. An “x” indicates that the SNP has not been genotyped (see text). Image source (July 2007): Hapmap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)); modified according to study design.

**Figure 2:** Pairwise linkage disequilibrium pattern of *PLAU* studied single nucleotide polymorphisms (SNPs). The location of each tested SNP along the chromosome is indicated on top. The number in each diamond indicates the magnitude of linkage disequilibrium ( $D'$ ) between respective pairs of SNPs. For example, the pairwise magnitude of linkage disequilibrium for variants rs2227571C and rs4065C is 0.98. Squares without numbers written on them represent perfect linkage disequilibrium ( $D' = 1.0$ ).

**Table 1**

Clinical characteristics of the SLSJ familial sample subjects

	Families		
	Proband (n = 223)	Affected relatives (n = 355)	Unaffected relatives (n = 581)
Male : Female ratio	1 : 1.2	1 : 1.4	1 : 1.2
Mean age (years (range))	18 (3-46)	40 (2-83)	48 (3-96)
Median age (years)	16	41	48
Smoking status (number (%))			
Never	186 (84)	176 (51)	243 (43)
Ex-smoker	12 (5)	105 (30)	199 (35)
Smoker	25 (11)	66 (19)	127 (22)
FEV <sub>1</sub> % of predicted value (SD) *	92.2 (16.3)	88.9 (22.7)	98.9 (17.0)
PC <sub>20</sub> in mg/ml (SD) †	2.66 (3.33)	3.36 (4.53)	26.91 (3.04)
Serum IgE in $\mu$ g/L (SD) †	229.1 (4.6)	157.4 (4.6)	80.9 (3.7)
Number of persons with subphenotypes (%)			
Asthma ‡	223 (100)	347 (100)	0 (0)
Atopy §	182 (82)	237 (68)	218 (38)
AHR **	188/188 (100)	217/264 (82)	64/486 (13)

\* FEV<sub>1</sub> = Forced expiratory volume in one second† PC<sub>20</sub> = concentration of methacholine inducing a 20 % fall in FEV<sub>1</sub>, IgE = Immunoglobulin E; geometric mean

‡ Present asthma or past documented clinical history of asthma

§ Defined as at least one positive response (wheal diameter  $\geq$  3 mm at 10 minutes) on skin prick tests

\*\* AHR = Airway hyperresponsiveness at time of recruitment as defined in method section

**Table 2**

Clinical characteristics of the CAPPS and SAGE cohorts subjects

	CAPPS cohort		SAGE cohort	
	Probands * (n = 238)	All Children † (n = 380)	Probands * (n = 237)	All Children (n = 723)
Male : Female ratio	1.31 : 1	1.05 : 1	1.66 : 1	1.26 : 1
Ethnicity (number (%))				
Caucasian	191 (80)	301 (79)	185 (78)	525 (73)
Noncaucasian	47 (20)	79 (21)	52 (22)	198 (27)
PC <sub>20</sub> in mg/ml ‡	1.899	2.987	1.660	2.718
Number of children with subphenotypes (%)				
Asthma §	55 (23)	71 (19)	126 (53)	247 (34)
Atopy **	130 (55)	147/365 (40)	177 (75)	326/719 (45)
AHR ††	205 (86)	257/348 (74)	144 (61)	401/461 (87)

\* Children Affected with Asthma, Atopy, or AHR tested for *PLAU* genotypes

† Of the 549 children born between 1994 and 1997, median year 1995, 380 were evaluated at 7 yr follow-up

‡ PC<sub>20</sub> = concentration of methacholine inducing a 20 % fall in FEV<sub>1</sub>

§ Doctor diagnosed asthma.

\*\* Defined as at least one positive response (wheal diameter ≥ 3 mm at 10 minutes) on skin prick tests

†† AHR = Airway hyperresponsiveness; Defined as a PC<sub>20</sub> methacholine ≤ 6.6 mg/ml

**Table 3**  
Genotyped SNPs characteristics

SNP	Base change *	MAF †	Chromosomal location ‡	Genomic features
rs2688607	C/T	0.22	75333742	7kb upstream of Exon 1
rs1916341	C/A	0.39	75341168	Intron
rs2227562	G/A	0.18	75342967	Intron
rs2227564	C/T	0.20	75343107	Exon 5 (nonsynonymous P141L)
rs2227566	T/C	0.41	75343737	Intron
rs2227568	C/T	0.18	75343885	Exon 7 (synonymous N274N)
rs2227571	T/C	0.41	75344746	Intron
rs4065	T/C	0.41	75346470	3'UTR

\* Major/minor (with forward orientation)

† MAF = minor allele frequency as observed in the original SLSJ familial sample

‡ According to NCBI public database build 36.1 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

**Table 4**  
Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the SLSJ familial sample

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs2688607	C	234	228	0.797	NS §
		T	88	94		
	rs1916341	C	210	209	0.152	NS
		A	156	157		
	rs227562	G	217	216	0.174	NS
		A	75	76		
	rs2227564 (P141L)	C	231	221	1.45	NS
		T	83	93		
	rs2227566	T	216	201	1.9	0.057
		C	118	132		
rs2227568	C	222	217	0.711	NS	
	T	76	81			
rs2227571	T	208	197	1.44	NS	
	C	132	143			
rs4065	T	222	219	0.362	NS	
	C	158	161			
Atopy	rs2688607	C	234	230	0.438	NS
		T	92	96		
	rs1916341	C	210	208	0.194	NS
		A	160	161		
	rs227562	G	179	175	0.566	NS
		A	63	66		
	rs2227564 (P141L)	C	220	214	0.704	NS
		T	84	90		
	rs2227566	T	214	198	2.043	0.041
		C	118	134		
rs2227568	C	188	180	1.134	NS	
	T	64	71			
rs2227571	T	188	177	1.481	NS	
	C	122	132			
rs4065	T	193	191	0.257	NS	
	C	143	145			
AHR	rs2688607	C	230	225	0.651	NS
		T	92	97		
	rs1916341	C	193	195	0.205	NS
		A	155	153		
	rs227562	G	195	195	0.027	NS
		A	73	73		
	rs2227564 (P141L)	C	223	215	1.102	NS
		T	87	95		
	rs2227566	T	190	178	1.773	0.076
		C	112	124		
rs2227568	C	192	188	0.606	NS	
	T	70	74			
rs2227571	T	195	187	1.185	NS	
	C	131	139			
rs4065	T	199	198	0.114	NS	
	C	151	152			

\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

**Table 5**

Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the SLSJ familial sample

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs2688607	C	55	49	2.105	<b>0.035</b>
	rs1916341	C	100	95	0.924	NS §
	rs227562	A	72	74	-0.411	NS
	rs2227564 (P141L)	C	56	49	2.54	<b>0.011</b>
	rs2227566	T	112	102	2.01	<b>0.045</b>
	rs2227568	C	41	38	1.117	NS
	rs2227571	T	86	82	0.815	NS
	rs4065	C	106	110	-0.330	NS
Atopy	rs2688607	C	50	47	0.871	NS
	rs1916341	C	87	82	0.802	NS
	rs227562	A	67	71	-0.632	NS
	rs2227564 (P141L)	C	45	42	0.856	NS
	rs2227566	T	95	86	1.901	0.057
	rs2227568	C	43	39	1.245	NS
	rs2227571	T	72	69	0.661	NS
	rs4065	C	91	92	-0.208	NS
AHR	rs2688607	C	49	44	1.863	0.062
	rs1916341	C	88	83	1.023	NS
	rs227562	A	68	70	-0.349	NS
	rs2227564 (P141L)	C	49	43	2.592	<b>0.026</b>
	rs2227566	T	99	90	2.068	<b>0.038</b>
	rs2227568	C	42	41	0.483	NS
	rs2227571	T	77	73	1.011	NS
	rs4065	C	98	98	0.076	NS

\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

**Table 6**

Common haplotypes found in the linkage disequilibrium block listed with their frequency

<b>Common 8-SNP Haplotypes and Frequencies for the original SLSJ familial sample</b>									
Haplotype	rs2688607	rs1916341	rs2227562	rs2227564	rs2227566	rs2227568	rs2227571	rs4065	Frequency
H8 (1)	C	C	G	C	T	C	T	T	0.553
H8 (2)	T	A	G	T	C	C	C	C	0.185
H8 (3)	C	A	A	C	C	T	C	C	0.155
<b>Common 4-SNP Haplotypes and Frequencies for all the cohorts</b>									
Haplotype	rs2688607	rs2227562	rs2227564	rs4065	Frequency				
					SLSJ	CAPPS	SAGE		
H4 (1)	C	G	C	T	0.595	0.514	0.541		
H4 (2)	T	G	T	C	0.192	0.227	0.200		
H4 (2)	C	A	C	C	0.173	0.178	0.179		

**Table 7**

Family-based association test results between the *PLAU* haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models for the SLSJ familial sample

Phenotype	Haplotype *	Additive				Dominant			
		S †	E(S) ‡	Z §	P value	S	E(S)	Z	P value
Asthma	H8 (1)	181	167	2.254	<b>0.024</b>	132	124	2.151	<b>0.031</b>
	H8 (2)	56	58	-0.342	NS **	53	54	-0.219	NS
	H8 (3)	56	58	-0.536	NS	53	54	-0.299	NS
Atopy	H8 (1)	160	148	1.907	0.056	115	107	2.022	<b>0.043</b>
	H8 (2)	42	45	-0.628	NS	40	42	-0.472	NS
	H8 (3)	51	53	-0.356	NS	48	48	0.024	NS
AHR	H8 (1)	166	152	2.430	<b>0.015</b>	124	115	2.702	<b>0.006</b>
	H8 (2)	53	55	-0.505	NS	50	51	-0.259	NS
	H8 (3)	49	50	-0.262	NS	46	46	0.014	NS

\* Refer to Table 6 for haplotype description

† S = Association test statistic

‡ E(S) = Expected statistic

§ Z = Z-score

\*\* NS = non significant (p value > 0.05)



**Table 8**

Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the SAGE cohort

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs2688607	C	94	99.5	1.153	NS §
		T	62	56.5		
	rs2227562	G	90	83	1.673	0.094
		A	32	39		
	rs2227564 (P141L)	C	95	100	1.054	NS
		T	59	54		
rs4065	C	78	82.5	0.862	NS	
	T	94	89.5			
Atopy	rs2688607	C	130	123	1.278	NS
		T	64	71		
	rs2227562	G	130	125.5	0.87	NS
		A	56	60.5		
	rs2227564 (P141L)	C	134	127.5	1.172	NS
		T	64	70.5		
rs4065	C	93	110	2.758	<b>0.0058</b>	
	T	147	130			
AHR	rs2688607	C	103	105	0.202	NS
		T	79	82.5		
	rs2227562	G	107	105.5	0.325	NS
		A	45	46.5		
	rs2227564 (P141L)	C	106	109	0.606	NS
		T	58	55		
rs4065	C	79	82.5	0.642	NS	
	T	111	107.5			

\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

**Table 9**

Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the SAGE cohort

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs2688607	C	15	15.25	-0.11	NS §
	rs2227562	A	24	30.75	-1.824	0.068
	rs2227564	C	12	14.25	-1.039	NS
	rs4065	C	29	34.75	-1.591	NS
Atopy	rs2688607	C	25	22.75	0.847	NS
	rs2227562	A	39	46.5	-1.651	0.098
	rs2227564	C	24	22.5	0.577	NS
	rs4065	C	34	51	-3.85	<b>0.00011</b>
AHR	rs2688607	C	19	17.25	0.750	NS
	rs2227562	A	37	38.25	-0.299	NS
	rs2227564	C	16	15	0.471	NS
	rs4065	C	41	42	-0.246	NS

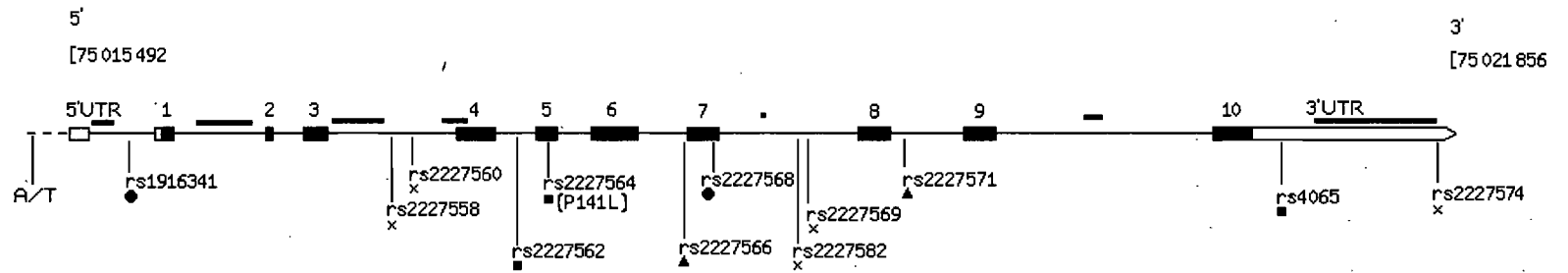
\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

Figure 1



Legend:

- TaqMan genotyping, ▲ FP genotyping, × not genotyped, ■ exon, □ UTR, — intron, — not sequenced, --- 5' upstream region
- Illumina genotyping



**TITLE:** Association of Urokinase-type plasminogen activator with asthma

**AUTHORS:** Philippe Bégin, Karine Tremblay, Denise Dailey, Mathieu Lemire, Sébastien Claveau, Charleen Salesse, Sabine Kacel, Alexandre Montpetit, Allan Becker, Moira Chang-Yeung, Anita L Kozyrskyj, Thomas J. Hudson and Catherine Laprise

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **Studied populations and samples for the association study**

#### **The Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) familial sample**

The Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) region of Northeastern Quebec, Canada, is inhabited by 287,000 individuals who descend predominantly from approximately 2500 founders originating from France that settled in Quebec in the 17<sup>th</sup> century (E1). The population grew at a high rate with little admixture over 12 to 14 generations, and is an example of a young founder population (E2). Recruitment occurred through media advertisement (newspaper and radio) and from the Chicoutimi Hospital's specialized clinics (pediatric and respiratory). In order to be included, probands were required to fulfill at least two of the following criteria: 1) a minimum of three clinic visits for acute asthma within one year; 2) two or more asthma-related hospital admissions within one year; or 3) steroid dependency, as defined by either six months of oral, or one year of inhaled corticosteroid use. Families were included in the study if parents (mother and father) were available for phenotypic assessment, if at least one parent was unaffected, and if all four grandparents were of French-Canadian origin. Family participation rate was about 60%. A total of 223 independent families with family size ranging from 3 to 17 and the number of affected family members ranging from 1 to 10 were analyzed.

#### **Clinical evaluation of the study sample subjects**

The affection status of all study participants was determined by clinical evaluation and by the completion of a standard respiratory questionnaire that was modified to include questions about asthma and atopy severity, family history of asthma and/or atopy, age-

of-onset and the presence of other respiratory diseases (E3). In 41 cases, the age-of-onset described by parents was below two years; because of the uncertainty of this information, we used a default class of two years. Measurements of expiratory flow were done with a Morgan spirometer (Morgan Spiro 232, P.K. Morgan Ltd) according to the American Thoracic Society's recommendations (E4). Bronchodilator response (BD) was measured as the increase in FEV<sub>1</sub> at 15 minutes after a 200 mg dose of salbutamol was inhaled. Peak expiratory flow rates (PEFRs) were measured in the morning and evening over a period of two weeks using a mini-Wright peak-flow meter (Armstrong Medical). The best of three repeated measurements was recorded on a diary card. Skin-prick tests were performed for 24 common airborne allergens, which were divided into six main categories: 1) cat, dog, horse, cow and feathers; 2) dust; 3) *D.farinae* and *D.Pterionisus*; 4) grass, weed, Ambrosia, Tymotheny, ryegrass; 5) tree mix, birch, maple, oak, elm; 6) *Chladosporium*, *Hormodendrum*, *Alternaria Alternata*, *Alternaria Tenuis*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Serum IgE was measured with enzyme immunofluorometry (QuantiCLONE total IgE kit, Kallestad Diagnostics). Methacholine based bronchoprovocation tests were performed for participants 12 years and older according to the method described by Juniper and colleagues (E5). The dose of methacholine that resulted in a 20% fall in FEV<sub>1</sub> was recorded as the PC<sub>20</sub>. All the tests were performed by the investigators for every participant (except for bronchoprovocation) at the University of Montreal Community Genomic Medicine Centre in Saguenay (Qc), Canada. Medical charts were also reviewed for any previous function tests and medication. Airway hyperresponsiveness (AHR) was defined as a PC<sub>20</sub> < 8 mg/ml. If PC<sub>20</sub> was unavailable, AHR was defined as either a rise in the post-bronchodilator FEV<sub>1</sub> of > 15% from baseline or a variation of the morning-evening peak expiratory flow rate (PEFR) of > 12% over a two-week period. Participants were defined as asthmatic if 1) they had a reported history of asthma (validated with physician), or if 2) they showed asthma related symptoms and a positive methacholine provocation test (PC<sub>20</sub>). Subjects were deemed atopic if they had at least one positive response (wheal diameter ≥ 3 mm at 10 minutes) on skin prick test. The Chicoutimi University Hospital local ethics committee approved the study and all subjects gave their informed consent.

## **Replication cohorts**

### **Canadian Asthma Primary Prevention Study cohort (CAPPS cohort)**

The Canadian Asthma Primary Prevention Study was initiated in 1995 to assess the effectiveness of a multifaceted intervention program applied in the first twelve months of life on the primary prevention of asthma and other atopic disorders in high-risk infants (E6). Infants at high risk for developing asthma and other allergic disorders were identified and their mothers were recruited during their third trimester of pregnancy. Infants at high risk were defined as those who had a parent with asthma or two first-degree relatives with allergies or atopic disorders. The study had two recruitment centers in Canada (Vancouver and Winnipeg). The diagnosis of asthma at the seven year time point (E7) was made by a pediatric allergist in each center without knowledge of the group allocation status of the children and who did not provide health care services to the families. The physician conducted a structured interview with parents by using a standardized form to record symptoms and physical findings. Spirometry and methacholine challenge testing were performed after obtaining parental consent. The diagnoses of asthma and other atopic disorders were clinical decisions made by the pediatric allergists without knowledge of the results of the questionnaire, allergy skin tests, spirometry, or methacholine challenge tests. Atopy was defined as at least one positive response (wheal diameter  $\geq 3$  mm at 10 minutes) on skin prick tests (refer to main SLSJ familial sample description for complete list of allergens). Allergy skin tests were performed with the epicutaneous method by using a prick lanceter (Hollister-Stier, Omega Laboratories LTD, Montreal, Quebec, Canada) with the following allergens (Hollister-Stier, Omega Laboratories LTD): house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae*), cat, dog, cockroach, *Alternaria* species, *Cladosporium* species, tree, grass and weed (ragweed) pollens, cow's milk, egg white, wheat, soy, and peanut. Histamine (1 mg/ml) was used as the positive control, and saline was used as the negative control. The largest wheal diameter and its perpendicular were measured at 15 minutes after testing. A mean wheal diameter of 3 mm or greater than that elicited by the negative control was

considered a positive reaction. Atopy was defined as a positive skin test reaction to one or more of these common allergens.

Methacholine (Methapharm Inc, Brantford, Ontario, Canada) challenge testing was carried out according to the protocol of Cockcroft et al. (E8). Two children who had FEV<sub>1</sub> values of less than 70% of predicted value were excluded from methacholine testing, but both of them had a postbronchodilator change in FEV<sub>1</sub> of 12% or more, and they were considered to have airway hyperresponsiveness (AHR). The provocative concentration of methacholine that induced a 20% decrease in FEV<sub>1</sub> from postsaline value (PC<sub>20</sub>) was determined. AHR was defined as a PC<sub>20</sub> of less than 6.6 mg/ml methacholine (E9, E10). The percentages of children whose FEV<sub>1</sub> values decreased by 20% at 2, 4, 6, and 7.8 mg/ml methacholine were also determined. The Ethics Committees of the University of British Columbia and the University of Manitoba approved the study and parents provided written informed consent for participation.

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

The Study of Asthma Genes and the Environment (SAGE), is derived from a population-based cohort of 16,320 children born in province of Manitoba, Canada, between January 1, 1995 through December 31, 1995. A survey on child health and home environment exposures was mailed to the parents of this birth cohort in 2002. Following parent response to the mailed survey and approval to be contacted, a subset of children was invited to join the study at age 8-10 years. This included all children with parent-declared asthma and a comparable number of children without asthma, randomly selected following stratification of the received surveys by urban / rural location and family income. All recruited children underwent clinical assessment for asthma by a pediatric allergist (AB or JL) on the basis of the Canadian Asthma Consensus Guidelines. To aid in the diagnosis, a standardized history was used including questions on cough, wheeze, shortness of breath, response to current medications (i.e. bronchodilators, corticosteroids) and the presence of other allergic conditions (e.g. allergic rhinitis, atopic dermatitis, and food allergies) were elicited. Physical examination included examination for chest symptoms (hyperinflation,



wheeze, prolonged expiration and decreased breath sounds). Hospitalization and medical visits for breathing difficulty in the past year were also noted. All findings were recorded and a diagnosis of asthma in the last 12 months was made. In total 723 study trios (child and both parents) were recruited, 247 of which have a child affected with asthma. A child affected with asthma was defined as follows: pediatric allergist diagnosis of asthma based upon history and the physical exam. Airway hyperresponsiveness (AHR) was assessed in all children following a methacholine challenge test (Methapharm Inc, Brantford, Ontario Canada), carried out according to the protocol of Crockcroft et al. (E8). AHR was defined as a  $PC_{20}$  (dose of methacholine that resulted in a 20% fall in  $FEV_1$ ) of less than 6.6 mg/ml (E9, E10). This definition is based on recent literature supporting the use of this more specific cut-off value when testing AHR in children (E9, E10). The children with  $FEV_1 < 70\%$  had reversibility testing with an aerosol bronchodilator. Reversibility was defined as an improvement in  $FEV_1$  by  $> 12\%$  following inhalation of a beta2-adrenergic agonist. Bronchoprovocation was not attempted for these children. Atopic status was determined for all children; skin prick tests to common relevant allergens were performed (Tree pollen mix, Weed pollen mix, Ragweed (separate), Grass pollen mix, Alternaria, Cladosporium, Penicillium, House dust mites (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*), Cockroach, Cat, Dog, Feathers and Peanut) and atopy was defined as at least one positive response (wheal diameter  $\geq 3$  mm at 10 minutes). For children in Winnipeg and immediate surroundings the assessment was carried out in the investigator's laboratories in the Manitoba Institute of Child Health. For children in remote and northern communities a team travelled to the communities to assess children in and surrounding those communities. The study was approved by the Ethics Committee at the University of Manitoba and parents provided written informed consent for participation.

### Sequencing

The gene was divided in ten regions amplified with the following conditions: 95°C 15 min followed by 35 cycles of 94°C 30 sec, 59-66°C 40 sec and 72°C 1 min, then 72°C 5 min. Oligonucleotides and annealing temperatures are listed in Table E1. PCR were done in 25 $\mu$ L volume containing of 0.6 unit of Taq DNA polymerase (New England Biolabs), 50 $\mu$ M of each dNTPs, 20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 % Triton, pH 8.8, 0.4 $\mu$ M of each primer and 10  $\mu$ g of human genomic DNA. Amplification products were purified with multiscreen PCR plates (Millipore Corporation), sequenced with BigDye terminator v3.1 chemistry following instructions of the manufacturer and analyzed on a 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems). Sequence analysis was performed with Codoncode Aligner software (CodonCode Corporation).

### Genotyping

#### *Template-directed dye-terminator incorporation assay with fluorescence polarization detection (FP-TDI)*

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2227566 and rs2227571 were genotyped with the FP-TDI technique, which distinguishes the polymorphic base of a SNP by the template-directed incorporation of a dye-labeled dideoxynucleotide onto an oligonucleotide primer that anneals just 5' to the polymorphic base (E11). The FP-TDI assays are accomplished in four steps according to the method described by Kwok (E11). Briefly, the first step involves PCR amplification of the genomic DNA regions containing the SNPs. The forward and reverse primers were designed according to the human *PLAU* gene sequence (NM\_002658) using Primer 3 software ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (see Table E2 for oligonucleotides used designed as "Primer OUT"). In the second step, the PCR products are cleaned by digesting the excess primers and deoxynucleotides enzymatically with exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase. The third step was primer extension containing DNA polymerase, SNP-specific primer, and dye-terminators. The sequences of forward and reverse TDI probes were also designed using Primer 3 software (see Table E2 for oligonucleotides used designed as "Primer

IN"). Finally, the SNP analysis was done using the Analyst HT (LJL Biosystems, Sunnyvale, CA). An automatically created genotype cluster chart and output worksheet was obtained by plotting the TAMRA polarization vs. R110 polarization in dimensionless units (mP) as previously described (E11, E12). Full technical details are available on request.

*TaqMan® SNP Genotyping Assays*

SNPs rs1916341 and rs2227568 (part number C\_26165619\_10 and C\_11458608\_10, respectively) were done with TaqMan® SNP Genotyping Assays multiplex platform (Applied Biosystems) using the Rotor Gene (Corbett Research). PCR was carried out using 15 ng of genomic DNA, 0.2 units of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 0.5  $\mu$ l of 10x PCR Gold Buffer (Applied Biosystems), 3.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of dNTPs, 0.15  $\mu$ l of 20X TaqMan® SNP Genotyping Assay mix and water for a final volume of 5  $\mu$ l with the following cycling conditions: 95°C 10 min, 45 cycles of 92°C 15 sec and 58°C 1 min. Genotypes were attributed by the Rotor Gene software using the scatter graph analysis option.

*AllerGen SNPs selection and Illumina genotyping assays*

Genotype information for SNPs rs2688607, rs2227562, rs2227564 and rs4065 was provided by the Allergen gene panel (AllerGen Network of Excellence, Theme I: Genes & Early life determinants (<http://www.genapha.ca>) for the original and both replication cohorts. SNP genotyping was performed using the Illumina BeadLab platform as described previously (E13) with oligonucleotides sequences available on the AllerGen website. These SNPs were initially selected from the International HapMap Project release 16c using 10 kb upstream and downstream of the gene. Tags were selected using the program Tagger using a r<sup>2</sup> cutoff of 0.8. If equivalent tags were identified, those with the highest Illumina design score were kept. Only SNPs with a design score above 0.4 were retained for the panel. Samples with call rate below 95% were excluded from the final dataset. Also, SNPs with poor cluster separation, with a call rate below 90% and with more than two Mendelian errors were removed from the final dataset.

## REFERENCES

- E1. Heyer E, Tremblay M. Variability of the genetic contribution of Quebec population founders associated to some deleterious genes. *Am J Hum Genet* 1995;56(4):970-978.
- E2. Labuda M, Labuda D, Korab-Laskowska M, Cole DE, Zietkiewicz E, Weissenbach J, Popowska E, Płonicka E, Root AW, Glorieux FH. Linkage disequilibrium analysis in young populations: pseudo-vitamin D-deficiency rickets and the founder effect in French Canadians. *Am J Hum Genet* 1996;59(3):633-643.
- E3. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136 (1): 225-244.
- E4. American Thoracic Society. ATS statement--Snowbird workshop on standardization of spirometry. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:831-838.
- E5. American Thoracic Society. Standardization of Spirometry, 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152: 1107-1136.
- E6. 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.
- E7. 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. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(1):49-55.
- E8. Crockcroft DW, Murdock KY, Berscheid BA. Relationship between atopy and bronchial responsiveness to histamine in a random population. *Ann Allergy* 1984;53:26-29.
- E9. Godfrey S. Bronchial hyper-responsiveness in children. *Paediatr Respir Rev* 2000;1(2):148-155.

- E10. Godfrey S, Springer C, Bar-Yishay E, Avital A. Cut-off points defining normal and asthmatic bronchial reactivity to exercise and inhalation challenges in children and young adults. *Eur Respir J* 1999;14(3):659-668.
- E11. Kwok PY. SNP genotyping with fluorescence polarization detection. *Hum Mutat* 2002;19(4):315-323.
- E12. PerkinElmer Life Sciences. 2000. AcycloPrime™-FP SNP Detection Kit. PerkinElmer, Inc., Boston.
- E13. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dyment DA, Tiislar M, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2005;37(10):1108-1112.

**FIGURE LEGENDS**

**Figure E1:** Pairwise linkage disequilibrium pattern of *PLAU*.

The location of each tested SNP along the chromosome is indicated on top. The number in each diamond indicates the magnitude of linkage disequilibrium ( $D'$ ) between respective pairs of SNPs. Squares without numbers written on them represent perfect linkage disequilibrium ( $D' = 1.0$ ). A) Haplotype blocks for CAPPS cohort. B) Haplotype blocks for SAGE cohort.

**Table E1**

Oligonucleotides and annealing temperatures used for amplification of sequenced fragments

Oligo name	Covered region	Product size	Annealing temperature	Sequence
PLAU-1F	5' upstream	837	59°C	GTCCTCCAGTCTCCCAATTC
PLAU-1R				CGCAACGCTCACAAAGAT
PLAU-2FB	5'UTR, exon 1	1023	62,5°C	ACAAGCCTCTCGATTCTCA
PLAU-2RB				ACTCTTCCCTCTCCCTCTCG
PLAU-3FB	Exons 2, 3	973	60°C	AGCTTGCTTGGGTCAATCC
PLAU-3RB				AGTTGGAGTGCAGTGGTGTG
PLAU-4F	Exons 4, 5	998	66°C	GACCCTGTCCAGTCTTCTGG
PLAU-4R				GGAGGCAGGTAGGAGAAAGC
PLAU-5F	Exons 5, 6, 7	1046	62,5°C	TTGTCCAAGAGTGCATGGTG
PLAU-5R				CCAAGCCATATACCCACAGG
PLAU-6F	Exons 8, 9	1037	66°C	GGAGTGGCAGGGAAGAGTTC
PLAU-6R				GGTGGGAAATCAGCTTCACA
PLAU-7FB	Exon 9	693	66°C	GGCCTTCCCTGGTAGAGATAC
PLAU-7RB				ATATGCCAGCCTCCTTCTCA
PLAU-8F	Exon 10, 3'UTR	1100	66°C	GCAGAGGGAAGAAAGGAAGG
PLAU-8R				CACCCATGCACAGGAGATG
PLAU-9F	Exon 10, 3'UTR	994	66°C	GCAGTCACACCAAGGAAGAGA
PLAU-9R				CCATACAAGCACCAGGGAGA
PLAU-10FB	3'UTR, 3' downstream	668	62,5°C	GTTTCATCCAATCCTCACTGG
PLAU-10RB				TGCTACCACACCTGGCTAAT



**Table E 2****Oligonucleotides used in FP-TDI genotyping assays**

SNP	Primer OUT		Primer IN	
	Sequence 5' - 3'	T (°C)	Sequence 5' - 3'	T (°C)
rs222756 6	F - GGGAGGGAAGGAAGAAGTGG R - CCCTTGCGTGTGGAGTTAAG	52	F - GCTGTTTGATGGGTATCTTCT R - CTTGGGTAATCACTGTGG	54
rs222757 1	F - TGTGAGATCACTGGCTTTGG R - CTC TTCATCCATCCCTGGAC	55	F - CCTGAAAATGAGCCCAG R - GCAGTCTCCCTTGATCAC	54

F = Forward, R = Reverse, T = Annealing temperature

**Table E 3**

Allele frequencies stratified by ethnicity in the CAPPS and SAGE cohorts

SNP	Caucasian *		Asian †		Other ‡	
	Minor	Major	Minor	Major	Minor	Major
<b>CAPPS Cohort</b>						
rs2227562	A (0.17)	G (0.83)	G (0.25)	A (0.75)	G (0.18)	A (0.82)
rs2227564	T (0.23)	C (0.77)	T (0.31)	C (0.67)	T (0.23)	C (0.74)
rs2688607	T (0.25)	C (0.75)	C (0.40)	T (0.60)	T (0.25)	C (0.75)
rs4065	C (0.43)	T (0.57)	T (0.16)	C (0.84)	C (0.25)	T (0.75)
<b>SAGE Cohort</b>						
rs2227562	A (0.17)	G (0.83)	A (0.37)	G (0.63)	A (0.33)	G (0.67)
rs2227564	T (0.24)	C (0.76)	T (0.28)	C (0.72)	T (0.16)	C (0.84)
rs2688607	T (0.24)	C (0.76)	T (0.38)	C (0.62)	T (0.32)	C (0.68)
rs4065	C (0.43)	T (0.57)	T (0.19)	C (0.81)	T (0.30)	C (0.70)

\* Caucasians-child and both parents race were reported as Caucasian

† Asian- child and both parents were reported as Asian

‡ Other-Child has two parents with different ethnicities

Note: Rows highlighted above are SNPs where the major and minor allele depends upon the ethnicity of the population being studied.

**Table E4**

Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the additive model for the CAPPS cohort

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs268807	C	39	37.5	0.48	NS §
		T	25	26.5		
	rs2227562	G	52	48.5	1.093	NS
		A	18	21.5		
	rs2227564 (P141L)	C	36	34.5	0.539	NS
		T	18	19.5		
rs4065	C	39	43.5	1.236	NS	
	T	47	42.5			
Atopy	rs2688607	C	97	93	0.800	NS
		T	63	67		
	rs2227562	G	109	106	0.632	NS
		A	45	48		
	rs2227564 (P141L)	C	93	89	0.883	NS
		T	45	49		
rs4065	C	90	96	1.163	NS	
	T	103	97			
AHR	rs2688607	C	151	147	0.658	NS
		T	85	89		
	rs2227562	G	173	163	1.859	0.06
		A	63	74		
	rs2227564 (P141L)	C	153	150.50	0.427	NS
		T	77	79.50		
rs4065	C	133	144	1.596	0.11	
	T	165	154			

\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

**Table E5**

Family-based association test results between *PLAU* SNPs and asthma and related phenotypes under the dominant model for the CAPPS cohort

Phenotype	SNP	Allele	S *	E(S) †	Z ‡	P value
Asthma	rs268807	C	7	8.75	-1.000	NS §
	rs2227562	A	15	18.5	-1.228	NS
	rs2227564	C	4	5	-0.756	NS
	rs4065	C	13	15.5	-1.031	NS
Atopy	rs2688607	C	22	22.75	-0.268	NS
	rs2227562	A	38.00	40.25	-0.535	NS
	rs2227564	C	12	13.75	-0.831	NS
	rs4065	C	34	38.50	-1.203	NS
AHR	rs2688607	C	30	30	0	NS
	rs2227562	A	54	62.50	-1.632	0.10
	rs2227564	C	20	22	-0.763	NS
	rs4065	C	53	30.25	-1.531	0.12

\* S = Association test statistic

† E(S) = Expected statistic

‡ Z = Z-score

§ NS = not significant (p value > 0.05)

**Table E6**

Family-based association test results between *PLAU* haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the CAPPS cohort

Phenotype	Haplotype*	Additive				Dominant			
		S †	E(S) ‡	Z §	P value	S	E(S)	Z	P value
Asthma	H4 (1)	48	43.5	1.236	NS	35	33.5	0.626	NS **
	H4 (2)	21	23	0.707	NS	17	20	1.279	NS
	H4 (3)	18	21.5	1.093	NS	16	19.5	1.257	NS
Atopy	H4 (1)	112	105	1.257	NS	81	79	0.563	NS
	H4 (2)	52	56	0.863	NS	43	49	1.576	NS
	H4 (3)	45	48	0.632	NS	40	42.5	0.602	NS
AHR	H4 (1)	184	171	1.867	0.061	138	129	1.434	NS
	H4 (2)	84	87.5	0.598	NS	68	73.50	1.153	NS
	H4 (3)	60	71	1.954	<b>0.051</b>	55	65	-2.00	<b>0.045</b>

\* Refer to Table 6 for haplotype description

† S = Association test statistic

‡ E(S) = Expected statistic

§ Z = Z-score

\*\* NS = non significant (p value > 0.05)

**Table E7**

Family-based association test results between *PLAU* haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the SAGE cohort

Phenotype	Haplotype *	Additive				Dominant			
		S †	E(S) ‡	Z §	P value	S	E(S)	Z	P value
Asthma	H4 (1)	123	120	0.543	NS	85	85.25	-0.77	NS **
	H4 (2)	62	57	0.990	NS	54	47.25	1.691	NS
	H4 (3)	38	44.5	1.501	NS	32	37.5	1.511	NS
Atopy	H4 (1)	174	158	2.546	<b>0.010</b>	112	111.25	0.213	NS
	H4 (2)	58	63.5	1.044	NS	51	54.25	0.747	NS
	H4 (3)	56	61.5	1.026	NS	46	52.50	1.463	NS
AHR	H4 (1)	136	134.5	0.275	NS	97	95.25	0.598	NS
	H4 (2)	56	53	0.600	NS	50	44.75	1.285	NS
	H4 (3)	43	45	0.436	NS	38	39.5	0.372	NS

\* Refer to Table 6 for haplotype description

† S = Association test statistic

‡ E(S) = Expected statistic

§ Z = Z-score

\*\* NS = non significant (p value > 0.05)

**Table E8**

Family-based association test results between *PLAU* 4-SNP haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models in the SLSJ familial sample

Phenotyp e	Haplotype *	Additive				Dominant			
		S †	E(S) ‡	Z §	P value	S	E(S)	Z	P value
Asthma	H4 (1)	270	266.5	0.425	NS	198	198.5	0.107	NS **
	H4 (2)	107	112	0.716	NS	99	99.7	0.138	NS
	H4 (3)	95	96	0.174	NS	84	86.3	0.389	NS
Atopy	H4 (1)	258	255.5	0.324	NS	190	191	0.378	NS
	H4 (2)	104	105	0.136	NS	93	93	0.012	NS
	H4 (3)	95	98.5	0.566	NS	84	87.2	0.599	NS
AHR	H4 (1)	212	207	0.724	NS	159	155.1	0.963	NS
	H4 (2)	82	89.6	1.243	NS	76	78.7	0.529	NS
	H4 (3)	69	70.1	0.216	NS	62	63.5	0.323	NS

\* Refer to Table 6 for haplotype description

† S = Association test statistic

‡ E(S) = Expected statistic

§ Z = Z-score

\*\* NS = non significant (p value > 0.05)

**Table E9**

Family-based association test results between PLAU SNPs and asthma and related phenotypes and under the additive and dominant models for the combined CAPPS and SAGE cohorts

Phenotype	SNP	Allele	Additive		Dominant	
			Combined Z-score	P value	Combined Z-score	P value
Asthma	rs268807	C	-0.7016	NS	-0.693	NS
	rs2227562	A	-1.993	<b>0.0462</b>	-2.194	<b>0.0281</b>
	rs2227564 (P141L)	C	0.6364	NS	-1.280	NS
	rs4065	C	-1.236	NS	-1.895	<b>0.0579</b>
Atopy	rs2688607	C	-0.695	NS	-1.495	NS
	rs2227562	A	-1.3018	NS	-1.1656	NS
	rs2227564 (P141L)	C	0.4221	NS	-1.313	NS
	rs4065	C	-1.163	NS	-3.714	<b>0.0002</b>
AHR	rs2688607	C	0.3825	NS	0.4546	NS
	rs2227562	A	-1.666	0.096	-1.4605	NS
	rs2227564 (P141L)	C	-0.6523	NS	-0.2965	NS
	rs4065	C	-1.6497	0.099	-1.3221	NS



**Table E10**

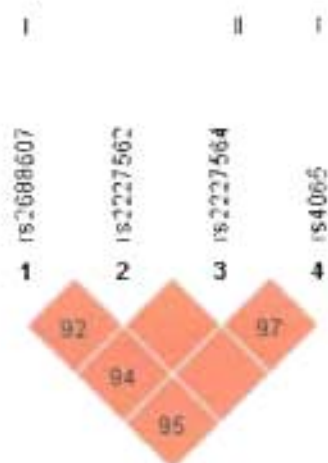
Family-based association test results between *PLAU* haplotypes and asthma and related phenotypes under the additive and dominant models for the combined CAPPS and SAGE cohorts

Phenotype	Haplotype *	Additive		Dominant	
		Combine d Z-score	P value	Combine d Z-score	P value
Asthma	H4 (1)	1.133	NS	0.31068	NS
	H4 (2)	0.518	NS	0.8099	NS
	H4 (3)	-1.856	0.06	-1.9639	<b>0.049</b>
Atopy	H4 (1)	2.739	<b>0.006</b>	0.5563	NS
	H4 (2)	-1.3536	NS	-1.5996	NS
	H4 (3)	-1.1873	NS	-1.4795	NS
AHR	H4 (1)	1.6391	NS	0.3106	NS
	H4 (2)	-0.0649	NS	0.8099	NS
	H4 (3)	-1.7856	0.074	-1.9639	<b>0.0495</b>

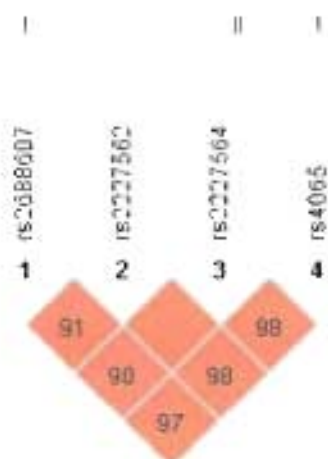
\* Refer to Table 6 for haplotype description

Figure E.1

A)



B)



## Discussion

Deux cent trente et une familles nucléaires dont le *propositus* est un sujet asthmatique, diagnostiqué depuis au moins un an par un clinicien, ont été recrutées au Saguenay–Lac-Saint-Jean dans le but de réaliser une étude d’association génétique avec l’asthme. Le gène *PLAU*, identifié comme candidat à l’asthme par la combinaison des micropuces à ADN et du clonage positionnel, a été séquencé chez 50 *propositi* non apparentés. Les huit variants génétiques ainsi identifiés ont ensuite été génotypés dans l’ensemble de l’échantillon familial et les allèles rs2688607C, rs2227564C (P141) et rs2227566T ont pu être associés à une susceptibilité à l’asthme et à l’hyperréactivité bronchique (HRB) dans cette population. Des études de validation ont ensuite été réalisées pour quatre de ces variants dans deux cohortes de la Colombie-Britannique et du Manitoba, CAPPS (238 trios) et SAGE (237 trios). Une analyse de déséquilibre de transmission a révélé une association négative hautement significative entre le variant rs4065C et l’atopie dans l’échantillon SAGE. Ces résultats ont de surcroît été appuyés par des analyses haplotypiques mettant en évidence une distribution non aléatoire des haplotypes formés par les variants examinés. La démonstration d’une telle association entre l’asthme et le gène *PLAU* concorde avec la littérature actuelle relative aux modèles fonctionnels proposés et vient appuyer l’hypothèse d’un rôle du système d’activation du plasminogène dans l’asthme. Des études additionnelles seront nécessaires pour évaluer, notamment, l’effet du variant rs4065 sur la fonction d’uPA et vérifier s’il est possible de rattacher la forte association observée à un impact fonctionnel significatif.

### *Sélection du candidat*

La technologie des micropuces à ADN a déjà été employée dans le passé pour mettre en évidence des gènes candidats jusqu’alors non identifiés par le clonage positionnel classique (Tremblay et al. 2006). Nos résultats viennent confirmer la pertinence d’une telle stratégie de sélection, puisque c’est l’observation d’une surexpression de *SERPINB2* dans les bronches d’asthmatiques qui a initialement permis l’identification de *PLAU* comme gène candidat à l’asthme. Alors que classiquement les gènes candidats sélectionnés par micropuces se limitaient à ceux dont l’expression est modulée par la

maladie, nos résultats démontrent la pertinence d'étendre cette considération à l'ensemble de leur voie biologique.

Nos résultats confirment également l'importance des populations à effet fondateur, comme celle du Saguenay-Lac-Saint-Jean (SLSJ), dans la cartographie génétique (*genetic mapping*) de traits complexes (Peltonen et al. 2000). Les populations à effet fondateur, par le partage de longs blocs haplotypiques, comportent un nombre plus restreint d'allèles associés à une maladie donnée (Malerba et Pignatti 2005). Ceci permet l'identification de *loci* de susceptibilité qui aurait autrement été camouflés par d'autres *loci* hautement associés dans une population sans effet fondateur (Malerba et Pignatti 2005). Ceci peut expliquer pourquoi la région 10q24 n'a que tout récemment été liée à l'asthme, malgré les multiples études de liaisons réalisées dans les dernières années (Laprise et al.).

#### *Équilibre d'Hardy-Weinberg*

La structure génétique particulière du SLSJ rend d'autant plus essentielle la confirmation des résultats auprès de cohortes d'origines différentes, avant de pouvoir les généraliser à l'ensemble de la population. Les cohortes CAPPS et SAGE, qui sont plus hétérogènes, ont été recrutées à cet effet et sont constituées de populations de l'Ouest Canadien. On notait d'ailleurs à cet égard une déviation significative de l'équilibre d'Hardy-Weinberg (HWE) pour 3 des 4 variants qui y étaient génotypés. Cette déviation pouvait être partiellement corrigé après stratification pour l'ethnicité.

Classiquement, une déviation significative du HWE s'explique par la présence dans l'échantillon 1) d'erreurs de génotypage, 2) de consanguinité, 3) de multiethnicité ou 4) d'une association génétique (Nussbaum et al. 2004). Dans cette étude, les erreurs de génotypage sont peu probables vu la haute qualité des génotypes obtenus, avec des taux d'erreurs mendéliennes très bas et confirmés, pour certains, par plusieurs méthodes de génotypage (données non présentées). Dans les déviations du HWE secondaires à la consanguinité, on observe un excès d'homozygotes. Or, dans les échantillons étudiés, c'est au contraire un excès d'hétérozygotes qui est observé. Dans les cohortes de l'Ouest, la multiethnicité contribue certainement à la déviation du HWE, puisqu'une

stratification pour l'ethnicité parvient à la corriger partiellement. Par contre, une déviation significative du HWE est également observée dans l'échantillon du SLSJ, pour lequel les grands-parents des sujets sélectionnés devaient être originaires de la région, éliminant du coup les risques de multiethnicité. En fait, l'observation d'une déviation récurrente du HWE dans trois populations asthmatiques distinctes tend plutôt à suggérer la présence d'une association entre le locus étudié et l'asthme, qui engendrerait la sélection préférentielle de certains génotypes.

#### *Variation des variants génétiques répliqués*

L'analyse par TDT des deux échantillons additionnels a permis de confirmer que l'association entre l'asthme, l'atopie et le gène PLA1 ne constitue pas une caractéristique unique à la population du SLSJ. Il est toutefois important de souligner que les associations n'ont pas été parfaitement reproduites d'un échantillon à l'autre. En effet, à la fois les SNP et les phénotypes associés tendaient à varier lorsqu'on comparait les résultats du SLSJ à ceux de l'Ouest.

La variabilité des SNP associés pourrait s'expliquer par les structures génétiques différentes des populations étudiées. Toute association spécifique rapportée dans une population est influencée à divers degrés par les phénotypes mesurés dans l'échantillon, par la façon dont le phénotypage a été réalisé, par les fréquences alléliques et déséquilibres de liaison spécifiques à la population et par les expositions environnementales qu'on y retrouve (Ober et Hoffjan 2006). On sait que les variants génétiques associés aux maladies diffèrent selon les populations, par leur histoire naturelle et leur structure génétique (Ober et Moffatt 2000). Neale et Sham ont suggéré que le gène lui-même, plutôt qu'un variant spécifique ou un haplotype, devrait constituer l'unité de répllication pour valider les associations (Neale et Sham 2004). Cette définition de la répllication a été appuyée par Ober et Hoffjan, qui se basent sur de nombreux exemples d'associations établies dans plusieurs populations et impliquant des variants fonctionnels différents à l'intérieur d'un même gène (Ober et Hoffjan 2006).

### *Variation des sous-phénotypes répliqués*

La variabilité des sous-phénotypes associées pourrait pour sa part s'expliquer par des différences relatives à la nature des phénotypes analysés. L'asthme possédant une présentation clinique complexe, une variation phénotypique est inévitable et peut certainement contribuer, avec les variations génétiques inhérentes aux populations étudiées, à la faible reproductibilité des résultats (Malerba et Pignatti 2005; Binder 2006). Ainsi, malgré l'élaboration de définitions claires et la réalisation d'un phénotypage rigoureux, cette étude n'échappe pas à une variabilité phénotypique découlant de la structure même des cohortes étudiées.

Premièrement, il faut mentionner qu'à l'opposé des cohortes de l'Ouest, celle du SLSJ est construite selon un modèle familial qui inclut dans l'analyse les phénotypes de membres de la famille autres que le sujet probant. Malgré des critères d'inclusion très spécifiques — les *propositi* devaient remplir deux des trois critères de sélection suivants : un minimum de 3 visites en clinique pour asthme aigu à l'intérieur d'un an; 2 admissions ou plus à l'urgence pour des raisons liées à l'asthme (exacerbations) à l'intérieur d'un an; ou présenter une dépendance au corticostéroïdes, définie comme par 6 mois de prise de corticostéroïdes oraux ou 1 an de prise de corticostéroïdes inhalés — on se trouve confronté à des phénotypes intermédiaires beaucoup moins spécifiques et plus difficiles à interpréter chez les parents et la fratrie.

Par exemple, bien que l'hyperréactivité bronchique (HRB) soit incluse dans la définition de l'asthme, plusieurs individus présentent une HRB sans remplir les critères cliniques d'asthme. En fait, la relation entre l'HRB et les symptômes respiratoire ne serait pas toujours forte : 50% des sujets avec HRB ne présentent aucun symptôme associé (Cockcroft et al. 1983; Hopp et al. 1990). Des études antérieures ont bien démontré que chez des parents du premier degré de sujets asthmatiques, la prévalence d'HRB pourrait dépasser les 75% et persister pendant plusieurs années sans symptômes (Hopp et al. 1988). Au contraire, certains sujets de l'échantillon ne présentaient pas d'HRB aux tests de fonction respiratoire au moment du recrutement malgré une histoire d'asthme bien documentée. Ceci pourrait s'expliquer par une maturation du thorax, par un bon contrôle

de la symptomatologie par les corticostéroïdes inhalés ou par des stratégies d'évitement antigénique efficaces. Il est donc nécessaire de tester les deux phénotypes de façon indépendante si l'on veut caractériser de façon appropriée la nature des associations observées, d'autant plus que la régulation génétique des sous-phénotypes d'asthme (HRB, atopie, niveaux d'IgE élevés) pourrait se faire à des *loci* différents (Palmer et al. 2000).

Au sujet des niveaux totaux d'IgE, il est à noter que malgré que les taux adultes soient intimement liés à une prédisposition génétique, les taux mesurés dans l'enfance connaissent d'énormes variations dans le temps, et ce même chez les sujets non atopiques (Nickel et al. 2005). La prudence s'impose par conséquent lors de l'interprétation de ce phénotype, particulièrement chez les jeunes enfants, pour qui les taux mesurés d'IgE totaux corréleront très mal avec les taux adultes futurs (Nickel et al. 2005). C'est pour cette raison que les variants de PLAU n'ont pas été analysés en association avec les taux d'IgE totaux dans les 2 cohortes de l'Ouest. Ceci pourrait en outre expliquer l'absence d'association avec les taux d'IgE totaux dans l'échantillon familial du SLSJ (données non présentées).

Deuxièmement, une particularité des cohortes de l'Ouest découle du fait que, d'une part, seuls les sujets probants y sont phénotypés et que, d'autre part, tous ces sujets probants sont des enfants. Or, il est aujourd'hui bien reconnu que les bronches d'enfants sont naturellement plus réactives que celles des adultes (Godfrey et al. 1999). Ceci pourrait avoir pour effet de surestimer la prévalence de l'HRB dans des échantillons constitués uniquement d'enfants. C'est dans le but de pallier, du moins en partie, à ce problème qu'une valeur de 6.6 mg/ml au  $PC_{20}(\text{met})$ , considérée plus spécifique à ce groupe d'âge, a été employée pour définir les limites de l'HRB dans les cohortes CAPPS et SAGE. Le choix de cette valeur reposait à la fois sur la littérature scientifique actuelle et sur la distribution de la  $CP_{20}(\text{met})$  dans l'ensemble de l'échantillon (Godfrey et al. 1999; Godfrey 2000). La valeur de 8 mg/ml a été conservée dans l'échantillon original, où seuls les individus âgés de plus de 12 ans étaient soumis à la bronchoprovocation à la méthacholine.

Malgré leur apparence similaire, les cohortes SAGE et CAPPS présentent également entre elles certaines différences fondamentales. À la base, la cohorte CAPPS provient d'une étude prospective qui avait pour objectif ultime d'évaluer l'impact d'efforts de prévention primaire chez des enfants identifiés à haut risque de développer l'asthme. En finale, ces efforts ont permis de réduire significativement l'incidence d'asthme dans cette cohorte, sans pour autant avoir d'effet sur le statut atopique ou la CP<sub>20</sub>(met) (Chan-Yeung et al. 2000; Becker et al. 2004; Chan-Yeung et al. 2005). Ceci permet d'expliquer la faible distribution de sujets asthmatiques dans cet échantillon (71 pour 380) comparativement à la cohorte SAGE où aucun contrôle environnemental n'a été exercé (247 pour 723) (tableau 2). Cependant, cela laisse également supposer que certains individus génétiquement prédisposés à l'asthme auraient pu ne pas développer la maladie dans cette cohorte par réduction de stimuli environnementaux, alors qu'ils l'auraient peut-être fait dans un contexte non contrôlé, comme dans les autres échantillons SAGE ou SLSJ. Cet effet de l'environnement sur la fréquence et la nature du diagnostic d'asthme pourrait contribuer à la faible reproductibilité des associations pour ce phénotype dans la cohorte CAPPS.

#### *Portée et directions futures*

Le gène PLA2G4B vient s'ajouter à une liste déjà longue et croissante de gènes associés à l'asthme (Ober et Hoffjan 2006). Il devient de plus en plus clair que le nombre de gènes contribuant à une susceptibilité à développer la maladie pourrait bien dépasser la centaine et que l'effet individuel de chacun de ces gènes soit très faible. Par contre, il est également probable que pour un sous-phénotype donné, le nombre de gènes contribuant de façon significative au risque soit moindre (Malerba et Pignatti 2005). Qui plus est, pour chaque personne prise individuellement, seul un sous-ensemble de ces gènes pourrait s'avérer déterminant (Ober et Hoffjan 2006; Bosse et Hudson 2007).

Au fur et à mesure que seront dévoilés les acteurs génétiques de l'asthme, un défi majeur sera d'identifier les combinaisons de gènes entrant en interaction pour déterminer le risque spécifique à chaque patient ou sous-groupes de patients. À cet



effet, le réseau AllerGen ([www.allergen-nce.ca](http://www.allergen-nce.ca)) recrute de nouvelles cohortes en plus de SAGE, CAPPS et SLSJ dans le but d'atteindre une puissance statistique suffisante à la réalisation d'études d'interaction gène-gène (Gauderman 2002). De telles études permettraient entre autre d'évaluer l'existence d'une synergie entre les variants associés de PLAU et ceux du gène SERPINE1 (codant pour PAI-1, le principal inhibiteur de l'uPA). Par ailleurs, une avenue intéressante lors d'analyses ultérieures sera d'exploiter la valeur mesurée de CP<sub>20</sub> méthacholine comme une variable continue – *quantitative trait locus* (QtL) – plutôt que dichotomique, ce qui aura pour effet d'augmenter la puissance statistique (Fan et Xiong 2003). Avec l'émergence de la technologie des micropuces à ADN et sa disponibilité grandissante, une autre avenue à considérer sera l'analyse des phénotypes d'expression génique (voir section 4.3 de la revue de littérature) (Li et Burmeister 2005; Vawter et al. 2006). La méthode CAGE (Composite Atopy Gene Expression), mesurant à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique l'expression de 10 gènes déréglés chez les individus atopiques, serait notamment plus efficace que le taux d'IgE pour différencier les individus atopiques des non-atopiques et corrèle avec le niveau de sévérité de l'asthme (Brutsche et al. 2002). Sous réserve que les ressources nécessaires à sa détermination fussent disponibles pour l'ensemble des participants, le pointage CAGE pourrait être traité comme un phénotype QtL lors d'études d'association futures.

Ultimement, l'élaboration de cohortes prospectives à grand déploiement, telle celle du projet CHILD prévoyant le recrutement de plus de 10 000 nouveaux-nés sur l'ensemble du territoire canadien, permettra de quantifier le risque associé au variants génétiques et d'identifier les interactions gène-environnement (subvention demandée aux IRSC, avril 2007) (Sears et al. 2003). En plus d'un immense échantillon, un tel projet requérera un phénotypage rigoureux des sujets, un génotypage complet et systématique des gènes ciblés, et une approche statistique ajustée de façon appropriée pour les analyses multiples (Binder 2006; Ober et Hoffjan 2006). Selon toute vraisemblance, il s'agira d'un travail gigantesque, d'où l'importance d'établir des réseaux de collaboration solides entre les secteurs de la génétique, de la protéomique, de la recherche environnementale ainsi qu'avec les milieux clinique et communautaire. De tels réseaux

favoriseront l'intégration rapide des informations obtenues et leur application clinique. La diffusion et la fusion des banques de données ouvriront de nouvelles perspectives de recherche, notamment en permettant la réalisation de méta-analyses (Salanti et al. 2005). Elles présenteront cependant également un défi éthique considérable. Il sera du devoir des chercheurs et des comités d'éthique de recherche de faire preuve de prudence lors de la création ou utilisation de telles données pour préserver le droit à la confidentialité des participants (Énoncé de politique des trois conseils 1998).

Les connaissances ainsi acquises conduiront non seulement à une évaluation bonifiée du risque individuel, mais également au développement de traitements personnalisés basés sur les défauts génétiques associés à la maladie (*targeted therapeutics*) (Coon et al. 2007; Giacomini et al. 2007). Cette approche est déjà courante dans le traitement du cancer et il n'est ainsi pas étonnant que ce soit dans ce domaine que soit actuellement développée les nouvelles molécules ciblant l'uPA et son récepteur (Nozaki et al. 2006). Ces dernières incluent notamment des antagonistes du récepteur uPAR, des inhibiteurs direct d'uPA, des thérapies antisenses, la technologie interférence de l'ARN (Nozaki et al. 2006). Ces nouvelles avenues thérapeutiques, quoique prometteuses, n'en sont encore qu'au stade expérimental et n'ont pas été appliquées à l'asthme et aux autres maladies à composantes inflammatoires. Présentement, en asthme, les antagonistes des leucotriènes constituent le principal exemple de modalité thérapeutique ciblée (Thompson et al. 2006). D'autres stratégies pharmacologiques ciblant les produits de gènes candidats sont toutefois à l'étape d'essais cliniques et pourrait joindre l'arsenal thérapeutique sous peu (Holtzman 2003). Il n'est désormais plus irréaliste d'espérer voir apparaître d'ici quelques années les premiers «phénotypes moléculaires» de sujets asthmatiques ou atopiques, qui permettraient un ajustement thérapeutique spécifique et adapté au profil individuel du patient, jetant du coup les bases d'une médecine génomique (Giacomini et al. 2007; Kiley et al. 2007).

## **Conclusion**

En conclusion, l'étude présentée dans le cadre de ce mémoire appuie l'hypothèse d'un rôle du système d'activation du plasminogène dans la pathogenèse de l'asthme en démontrant des associations entre les variants du gène PLAU et une susceptibilité à développer l'asthme ou l'atopie dans deux des trois populations canadiennes distinctes évaluées. Les résultats supportent également l'emploi des micropuces à ADN et réitérent la pertinence d'examiner les populations à effet fondateur lors de la recherche de nouveaux *loci* à étudier en association avec un trait complexe.

## Bibliographie

- Abraham, E., Gyetko, M.R., et al. (2003). « Urokinase-type plasminogen activator potentiates lipopolysaccharide-induced neutrophil activation. » *J Immunol* 170(11): 5644–51.
- Ali, H. et Panettieri, R.A., Jr. (2005). « Anaphylatoxin C3a receptors in asthma. » *Respir Res* 6: 19.
- Andreasen, P.A., Egelund, R., et al. (2000). « The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. » *Cell Mol Life Sci* 57(1): 25–40.
- Andreasen, P.A., Kjoller, L., et al. (1997). « The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. » *Int J Cancer* 72(1): 1-22.
- Antalis, T.M., La Linn, M., et al. (1998). « The serine proteinase inhibitor (serpin) plasminogen activation inhibitor type 2 protects against viral cytopathic effects by constitutive interferon alpha/beta priming. » *J Exp Med* 187(11): 1799-811.
- Asokanathan, N., Graham, P.T., et al. (2002). « Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. » *J Immunol* 168(7): 3577-85.
- ATS (1962). « American Thoracic Society Committee on Diagnostic Standards. Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma, and pulmonary emphysema. » *Am Rev Respir Dis* 85: 762.
- Babu, K.S., Woodcock, D.A., et al. (2003). « Inhaled synthetic surfactant abolishes the early allergen-induced response in asthma. » *Eur Respir J* 21(6): 1046-9.
- Bachmann, F. (1994). The Plasminogen-Plasmin Enzyme System. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. J. H. Robert W.Colman, Victor J. Marder, and Edwin W. Salzman. Philadelphia, J.B. Lippincott Company: 1592-622.
- Baldini, M., Lohman, I.C., et al. (1999). « A Polymorphism\* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(5): 976-83.
- Banach-Wawrzencyk, E., Dziedziczko, A., et al. (2000). « Fibrinolysis system in patients with bronchial asthma. » *Med Sci Monit* 6(1): 103-7.

- Baritussio, A. (2004). « Lung surfactant, asthma, and allergens: a story in evolution. » *Am J Respir Crit Care Med* 169(5): 550-1.
- Barry, G.D., Le, G.T., et al. (2006). « Agonists and antagonists of protease activated receptors (PARs). » *Curr Med Chem* 13(3): 243-65.
- Beck, J.M., Preston, A.M., et al. (1999). « Urokinase-type plasminogen activator in inflammatory cell recruitment and host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. » *Infect Immun* 67(2): 879-84.
- Becker, A., Watson, W., et al. (2004). « The Canadian asthma primary prevention study: outcomes at 2 years of age. » *J Allergy Clin Immunol* 113(4): 650-6.
- Berger, P., Perng, D.W., et al. (2001). « Tryptase and agonists of PAR-2 induce the proliferation of human airway smooth muscle cells. » *J Appl Physiol* 91(3): 1372-9.
- Bianchi, E., Ferrero, E., et al. (1996). « Integrin-dependent induction of functional urokinase receptors in primary T lymphocytes. » *J Clin Invest* 98(5): 1133-41.
- Binder, A. (2006). « Identification of genes for a complex trait: examples from hypertension. » *Curr Pharm Biotechnol* 7(1): 1-13.
- Blumenthal, M.N. (2005). « The role of genetics in the development of asthma and atopy. » *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5(2): 141-5.
- Blumenthal, M.N., Ober, C., et al. (2004). « Genome scan for loci linked to mite sensitivity: the Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA). » *Genes Immun* 5(3): 226-31.
- Booth, N.A. (1999). « Fibrinolysis and thrombosis. » *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12(3): 423-33.
- Bosse, Y. et Hudson, T.J. (2007). « Toward a comprehensive set of asthma susceptibility genes. » *Annu Rev Med* 58: 171-84.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., et al. (2000). « Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. » *Am J Respir Crit Care Med* 161(5): 1720-45.
- Bradding, P. (2003). « The role of the mast cell in asthma: a reassessment. » *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3(1): 45-50.
- Brightling, C.E., Bradding, P., et al. (2002). « Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. » *N Engl J Med* 346(22): 1699-705.

- Brooks, A.M., Bates, M.E., et al. (2006). « Urokinase-type Plasminogen Activator Modulates Airway Eosinophil Adhesion in Asthma. » *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Brutsche, M.H., Joos, L., et al. (2002). « Array-based diagnostic gene-expression score for atopy and asthma. » *J Allergy Clin Immunol* 109(2): 271-3.
- Buckova, D., Izakovicova Holla, L., et al. (2002). « Polymorphism 4G/5G in the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with IgE-mediated allergic diseases and asthma in the Czech population. » *Allergy* 57(5): 446-8.
- Burgel, P.R. et Chanez, P. (2005). « [Asthma 2005]. » *Rev Pneumol Clin* 61(5 Pt 2): 5S13-5S15.
- Burrage, P.S., Mix, K.S., et al. (2006). « Matrix metalloproteinases: role in arthritis. » *Front Biosci* 11: 529-43.
- Busse, W.W. et Lemanske, R.F., Jr. (2001). « Asthma. » *N Engl J Med* 344(5): 350-62.
- Capra, V., Thompson, M.D., et al. (2006). « Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: Critical update and emerging trends. » *Med Res Rev*.
- Cardon, L.R. et Palmer, L.J. (2003). « Population stratification and spurious allelic association. » *Lancet* 361(9357): 598-604.
- Carroll, M.C. (2004a). « The complement system in B cell regulation. » *Mol Immunol* 41(2-3): 141-6.
- Carroll, M.C. (2004b). « The complement system in regulation of adaptive immunity. » *Nat Immunol* 5(10): 981-6.
- Cataldo, D., Munaut, C., et al. (2000). « MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. » *Int Arch Allergy Immunol* 123(3): 259-67.
- Cataldo, D.D., Bettioli, J., et al. (2002). « Matrix metalloproteinase-9, but not tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, increases in the sputum from allergic asthmatic patients after allergen challenge. » *Chest* 122(5): 1553-9.
- Cawston, T.E. et Wilson, A.J. (2006). « Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. » *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20(5): 983-1002.

- Cederqvist, K., Siren, V., et al. (2006). « High concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 in lungs of preterm infants with respiratory distress syndrome. » *Pediatrics* 117(4): 1226-34.
- Cesarman-Maus, G. et Hajjar, K.A. (2005). « Molecular mechanisms of fibrinolysis. » *Br J Haematol* 129(3): 307-21.
- Chan-Yeung, M., Ferguson, A., et al. (2005). « The Canadian Childhood Asthma Primary Prevention Study: outcomes at 7 years of age. » *J Allergy Clin Immunol* 116(1): 49-55.
- Chan-Yeung, M., Manfreda, J., et al. (2000). « 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* 154(7): 657-63.
- Chang, W.C., Shi, G.Y., et al. (1993). « Human plasmin induces a receptor-mediated arachidonate release coupled with G proteins in endothelial cells. » *Am J Physiol* 264(2 Pt 1): C271-81.
- Chapman, H.A.J., Vavrin, Z., et al. (1982). « Macrophage fibrinolytic activity: identification of two pathways of plasmin formation by intact cells and of a plasminogen activator inhibitor. » *Cell Mol Life Sci* 28(3): 653-662.
- Chetta, A., Foresi, A., et al. (1997). « Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. » *Chest* 111(4): 852-7.
- Cho, S.H., Hall, I.P., et al. (2001). « Possible role of the 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene in the development of asthma. » *J Allergy Clin Immunol* 108(2): 212-4.
- Cho, S.H., Tam, S.W., et al. (2000). « Production of plasminogen activator inhibitor-1 by human mast cells and its possible role in asthma. » *J Immunol* 156(6): 3154-61.
- Chou, H.T., Chen, Y.T., et al. (2004). « Association between urokinase-plasminogen activator gene T4065C polymorphism and risk of mitral valve prolapse. » *Int J Cardiol* 96(2): 165-70.
- Choudry, S., Me, I.R., et al. (2005). « Genome-Wide Association Study of Severe Asthma among Puerto Ricans. » *AST 2005 International Conference, San Diego, California.*

- Chu, E.K., Cheng, J., et al. (2006). « Induction of the plasminogen activator system by mechanical stimulation of human bronchial epithelial cells. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 35(6): 628-38.
- Cockcroft, D.W., Berscheid, B.A., et al. (1983). « Unimodal distribution of bronchial responsiveness to inhaled histamine in a random human population. » *Chest* 83(5): 751-4.
- Colognato, R., Slupsky, J.R., et al. (2003). « Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. » *Blood* 102(7): 2645-52.
- Coon, K.D., Dunckley, T.L., et al. (2007). « A generic research paradigm for identification and validation of early molecular diagnostics and new therapeutics in common disorders. » *Mol Diagn Ther* 11(1): 1-14.
- Cotran, R.S., Kumar, V., et al. (1999). *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 6e edition, 1425 pages.
- Cubellis, M.V., Wun, T.C., et al. (1990). « Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. » *Embo J* 9(4): 1079-85.
- Cunnane, G., FitzGerald, O., et al. (2001). « Synovial tissue protease gene expression and joint erosions in early rheumatoid arthritis. » *Arthritis Rheum* 44(8): 1744-53.
- D'Orazio, D., Besser, D., et al. (1997). « Cooperation of two PEA3/AP1 sites in uPA gene induction by TPA and FGF-2. » *Gene* 201(1-2): 179-87.
- Dawson, S.J., Wiman, B., et al. (1993). « The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. » *J Biol Chem* 268(15): 10739-45.
- Dekkers, B.G., Schaafsma, D., et al. (2007). « Extracellular matrix proteins differentially regulate airway smooth muscle phenotype and function. » *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*.
- Demeds, I.K., Brusselle, G.G., et al. (2005). « Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. » *Curr Opin Pharmacol* 5(3): 257-63.



- Dickinson, J.L., Bates, E.J., et al. (1995). « Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function. » *J Biol Chem* 270(46): 27894-904.
- Dizier, M.H., Besse-Schmittler, C., et al. (2000). « Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study. » *Am J Respir Crit Care Med* 162(5): 1812-8.
- Duffy, D. (1994). *Asthma and Allergic Disease in Australian Twins and their Families. Department of Medicine. Queensland, University of Queensland. PhD: 548.*
- Dumler, I., Weis, A., et al. (1998). « The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. » *J Biol Chem* 273(1): 315-21.
- Duval-Jobe, C. et Parmely, M.J. (1994). « Regulation of plasminogen activation by human U937 promonocytic cells. » *J Biol Chem* 269(33): 21353-7.
- Ebeling, C., Forsythe, P., et al. (2005). « Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. » *J Allergy Clin Immunol* 115(3): 623-30.
- Ehrlich, H.J., Keijer, J., et al. (1991). « Functional interaction of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and heparin. » *Biochemistry* 30(4): 1021-8.
- Eitzman, D.T., McCoy, R.D., et al. (1996). « Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. » *J Clin Invest* 97(1): 232-7.
- Fan, R. et Xiong, M. (2003). « Linkage and association studies of QTL for nuclear families by mixed models. » *Biostatistics* 4(1): 75-95.
- Fazioli, F., Resnati, M., et al. (1997). « A urokinase-sensitive region of the human urokinase receptor is responsible for its chemotactic activity. » *Embo J* 16(24): 7279-86.
- Finckh, U., van Hadeln, K., et al. (2003). « Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of PLAU, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. » *Neurogenetics* 4(4): 213-7.

- Fiorucci, L. et Ascoli, F. (2004). « Mast cell tryptase, a still enigmatic enzyme. » *Cell Mol Life Sci* 61(11): 1278-95.
- Fixman, E.D., Stewart, A., et al. (2007). « Basic mechanisms of development of airway structural changes in asthma. » *Eur Respir J* 29(2): 379-89.
- Franchini, M., Veneri, D., et al. (2007). « Inflammation and hemostasis: a bidirectional interaction. » *Clin Lab* 53(1-2): 63-7.
- Fukao, H., Ueshima, S., et al. (1997). « Enhancement of tissue-type plasminogen activator (t-PA) activity by purified t-PA receptor expressed in human endothelial cells. » *Biochim Biophys Acta* 1356(1): 111-20.
- Gabazza, E.C., Taguchi, O., et al. (1999). « Thrombin in the airways of asthmatic patients. » *Lung* 177(4): 253-62.
- Gao, P.S. et Huang, S.K. (2004). « Genetic aspects of asthma. » *Panminerva Med* 46(2): 121-34.
- Gao, P.S., Mao, X.Q., et al. (1999). « Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. » *Clin Genet* 56(2): 164-5.
- Gauderman, W.J. (2002). « Sample size requirements for association studies of gene-gene interaction. » *Am J Epidemiol* 155(5): 478-84.
- Gauderman, W.J. (2003). « Candidate gene association analysis for a quantitative trait, using parent-offspring trios. » *Genet Epidemiol* 25(4): 327-38.
- Giacomini, K.M., Brett, C.M., et al. (2007). « The pharmacogenetics research network: from SNP discovery to clinical drug response. » *Clin Pharmacol Ther* 81(3): 328-45.
- Girodet, P.O., Casset, A., et al. (2005). « [IgE and respiratory disease]. » *Rev Mal Respir* 22(6 Pt 1): 967-81.
- Godfrey, S. (2000). « Bronchial hyper-responsiveness in children. » *Paediatr Respir Rev* 1(2): 148-55.
- Godfrey, S., Springer, C., et al. (1999). « Cut-off points defining normal and asthmatic bronchial reactivity to exercise and inhalation challenges in children and young adults. » *Eur Respir J* 14(3): 659-68.
- Graham, L.M. (2006). « Classifying asthma. » *Chest* 130(1 Suppl): 13S-20S.

- Green, R.H., Brightling, C.E., et al. (2007). « The reclassification of asthma based on subphenotypes. » *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(1): 43-50.
- Gueders, M.M., Foidart, J.M., et al. (2006). « Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. » *Eur J Pharmacol* 533(1-3): 133-44.
- Guilbert, M., Ferland, C., et al. (1999). « 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid induces important eosinophil transmigration through basement membrane components: comparison of normal and asthmatic eosinophils. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 97-104.
- Gundersen, D., Tran-Thang, C., et al. (1997). « Plasmin-induced proteolysis of tenascin-C: modulation by T lymphocyte-derived urokinase-type plasminogen activator and effect on T lymphocyte adhesion, activation, and cell clustering. » *J Immunol* 158(3): 1051-60.
- Guo, R.F. et Ward, P.A. (2005). « Role of C5a in inflammatory responses. » *Annu Rev Immunol* 23: 821-52.
- Gyetko, M.R., Chen, G.H., et al. (1996). « Urokinase is required for the pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus neoformans*. A murine transgenic model. » *J Clin Invest* 97(8): 1818-26.
- Gyetko, M.R., Libre, E.A., et al. (1999). « Urokinase is required for T lymphocyte proliferation and activation in vitro. » *J Lab Clin Med* 133(3): 274-88.
- Gyetko, M.R., Shollenberger, S.B., et al. (1992). « Urokinase expression in mononuclear phagocytes: cytokine-specific modulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. » *J Leukoc Biol* 51(3): 256-63.
- Gyetko, M.R., Sud, S., et al. (2002). « Urokinase-type plasminogen activator is required for the generation of a type 1 immune response to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. » *J Immunol* 168(2): 801-9.
- Gyetko, M.R., Sud, S., et al. (2004). « Urokinase-deficient mice fail to generate a type 2 immune response following schistosomal antigen challenge. » *Infect Immun* 72(1): 461-7.

- Gyetko, M.R., Sud, S., et al. (2000). « Urokinase receptor-deficient mice have impaired neutrophil recruitment in response to pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. » *J Immunol* 165(3): 1513–9.
- Gyetko, M.R., Sud, S., et al. (2001). « Antigen-driven lymphocyte recruitment to the lung is diminished in the absence of urokinase-type plasminogen activator (uPA) receptor, but is independent of uPA. » *J Immunol* 167(10): 5539–42.
- Gyetko, M.R., Todd, R.F., 3rd, et al. (1994). « The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis in vitro. » *J Clin Invest* 93(4): 1380–7.
- Gyetko, M.R., Wilkinson, C.C., et al. (1993). « Monocyte urokinase expression: modulation by interleukins. » *J Leukoc Biol* 53(5): 598–601.
- Haagerup, A., Bjerke, T., et al. (2002). « Asthma and atopy - a total genome scan for susceptibility genes. » *Allergy* 57(8): 680–6.
- Hajjar, K.A., Jacovina, A.T., et al. (1994). « An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. » *J Biol Chem* 269(33): 21191–7.
- Hakonarson, H. et Halapi, E. (2002). « Genetic analyses in asthma: current concepts and future directions. » *Am J Pharmacogenomics* 2(3): 155–66.
- Hara, K., Hasegawa, T., et al. (2001). « Inhibitory Role of Eosinophils on Cell Surface Plasmin Generation by Bronchial Epithelial Cells: Inhibitory Effects of Transforming Growth Factor b. » *Lung* 179(1): 9–20.
- Henderson, W.R. J., Lewis, D.B., et al. (1996). « The importance of leukotrienes in airway inflammation in a mouse model of asthma. » *J Exp Med* 184(4): 1483–94.
- Henderson, W.R. J., Tang, L.O., et al. (2002). « A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. » *Am J Respir Crit Care Med* 165(1): 108–16.
- Higazi, A.A., Upson, R.H., et al. (1996). « Interaction of single-chain urokinase with its receptor induces the appearance and disappearance of binding epitopes within the resultant complex for other cell surface proteins. » *Blood* 88(2): 542–51.
- Hoffjan, S., Nicolae, D., et al. (2003). « Association studies for asthma and atopic diseases: a comprehensive review of the literature. » *Respir Res* 4: 14.

- Holloway, J.W. et Koppelman, G.H. (2007). « Identifying novel genes contributing to asthma pathogenesis. » *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(1): 69-74.
- Holtzman, M.J. (2003). « Drug development for asthma. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(2): 163-71.
- Hopp, R.J., Bewtra, A.K., et al. (1988). « Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. » *Ann Allergy* 61(3): 184-6.
- Hopp, R.J., Townley, R.G., et al. (1990). « The presence of airway reactivity before the development of asthma. » *Am Rev Respir Dis* 141(1): 2-8.
- Howard, T.D., Koppelman, G.H., et al. (2002). « Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. » *Am J Hum Genet* 70(1): 230-6.
- Hsu, F.C., Liang, K.Y., et al. (2003). « Multipoint linkage disequilibrium mapping approach: incorporating evidence of linkage and linkage disequilibrium from unlinked region. » *Genet Epidemiol* 25(1): 1-13.
- Huang, C.M., Chen, C.L., et al. (2004). « Association between urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism and Chinese patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. » *Clin Exp Rheumatol* 22(2): 219-22.
- Illig, T. et Wjst, M. (2002). « Genetics of asthma and related phenotypes. » *Paediatr Respir Rev* 3(1): 47-51.
- Instituts de recherche en santé du Canada, Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, Conseil de recherches en sciences humaines du Canada. *Énoncé de politique des trois Conseils : Éthique de la recherche avec des êtres humains*. 1998 (avec les modifications de 2000, 2002 et 2005).
- Irigoyen, J.P., Munoz-Canoves, P., et al. (1999). « The plasminogen activator system: biology and regulation. » *Cell Mol Life Sci* 56(1-2): 104-32.
- Izumo, T., Kondo, M., et al. (2007). « Cysteinyl-leukotriene 1 receptor antagonist attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. » *Life Sci* 80(20): 1882-6.

- Jarjour, N.N. et Enhorning, G. (1999). « Antigen-induced airway inflammation in atopic subjects generates dysfunction of pulmonary surfactant. » *Am J Respir Crit Care Med* 160(1): 336-41.
- Jin, T., Tarkowski, A., et al. (2003). « Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis. » *Arthritis Res Ther* 5(1): R9-R17.
- Joseph, K. et Kaplan, A.P. (2005). « Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. » *Adv Immunol* 86: 159-208.
- Kawabata, A. et Kawao, N. (2005). « Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PARs in the respiratory system: cellular signaling and physiological/pathological roles. » *J Pharmacol Sci* 97(1): 20-4.
- Kiley, J., Smith, R., et al. (2007). « Asthma phenotypes. » *Curr Opin Pulm Med* 13(1): 19-23.
- King, C., Brennan, S., et al. (1998). « Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. » *J Immunol* 161(7): 3645-51.
- Kinnby, B. (2002). « The plasminogen activating system in periodontal health and disease. » *Biol Chem* 383(1): 85-92.
- Klotsman, M., York, T.P., et al. (2007). « Pharmacogenetics of the 5-lipoxygenase biosynthetic pathway and variable clinical response to montelukast. » *Pharmacogenet Genomics* 17(3): 189-196.
- Knight, D.A., Lim, S., et al. (2001). « Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. » *J Allergy Clin Immunol* 108(5): 797-803.
- Koppelman, G.H., Reijmerink, N.E., et al. (2001). « Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. » *Am J Respir Crit Care Med* 163(4): 965-9.
- Kruithof, E.K.O., Baker, M.S., et al. (1995). « Biological and Clinical Aspects of Plasminogen Activator Inhibitor Type 2. » *Blood* 86(11): 4007-24.
- Kucharewicz, I., Kowal, K., et al. (2003). « The plasmin system in airway remodeling. » *Thromb Res* 112(1-2): 1-7.

- Kuiper, J., Otter, M., et al. (1995). « Characterization of the interaction of a complex of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 with rat liver cells. » *Thromb Haemost* 74(5): 1298-304.
- Laitinen, L.A., Laitinen, A., et al. (1999). « Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. » *Am Rev Respir Dis* 147(3): 697-704.
- Laitinen, T. (2007). « Gene mapping in asthma-related traits. » *Methods Mol Biol* 376: 213-34.
- Laitinen, T., Daly, M.J., et al. (2001). « A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. » *Nat Genet* 28(1): 87-91.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., et al. (2007). « Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. » *Cell Death Differ* 14(1): 44-55.
- Lander, E.S. et Schork, N.J. (1994). « Genetic dissection of complex traits. » *Science* 265(5181): 2037-48.
- Landis, R.C. (2007). « Protease activated receptors: clinical relevance to hemostasis and inflammation. » *Hematol Oncol Clin North Am* 21(1): 103-13.
- Langlois, A., Ferland, C., et al. (2006). « Montelukast regulates eosinophil protease activity through a leukotriene-independent mechanism. » *J Allergy Clin Immunol* 118(1): 113-9.
- Laprise, C., Laviolette, M., et al. (1999). « Asymptomatic airway hyperresponsiveness: relationships with airway inflammation and remodelling. » *Eur Respir J* 14(1): 63-73.
- Laprise, C., Lemire, M., et al. (2003). « Asthma Genome Scan in a French-Canadian Founder Population [abstract]. » *Am J Respir Crit Care Med* 169: A628.
- Laprise, C., Sladek, R., et al. (2004). « Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. » *BMC Genomics* 5(1): 21-30.
- Laufs, S., Schumacher, J., et al. (2006). « Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. » *Cell Cycle* 5(16): 1760-71.

- Lazaar, A.L., Plotnick, M.I., et al. (2002). « Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells. » *J Immunol* 169(2): 1014-20.
- Lee, Y.C., Lee, H.B., et al. (2001). « The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. » *Clin Exp Allergy* 31(10): 1623-30.
- Lemière, C., Bai, T., et al. (2004). « Adult asthma consensus guidelines update 2003. » *Can Respir J* 11(Suppl A): 9A-18A.
- Lengyel, E., Klostergaard, J., et al. (1995). « Stimulation of urokinase expression by TNF-alpha requires the activation of binding sites for the AP-1 and PEA3 transcription factors. » *Biochim Biophys Acta* 1268(1): 65-72.
- Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E., et al. (1999). « Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). » *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96(17): 9660-5.
- Li, J. et Burmeister, M. (2005). « Genetical genomics: combining genetics with gene expression analysis. » *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R163-9.
- Li, Q., Laumonier, Y., et al. (2007). « Plasmin Triggers Cytokine Induction in Human Monocyte-Derived Macrophages. » *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Lindberg, P., Baker, M.S., et al. (2001). « The localization of the relaxed form of plasminogen activator inhibitor type 2 in human gingival tissues. » *Histochem Cell Biol* 116:(5): 447-52.
- Los, H., Postmus, P.E., et al. (2001). « Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. » *Twin Res* 4(2): 81-93.
- Madore, A.M., Tremblay, K., et al. (2007). « Replication of an association between 17q21 SNPs and asthma in a French-Canadian familial collection. » *Hum Genet*, Epub: 9 nov 2007
- Malerba, G. et Pignatti, P.F. (2005). « A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. » *J Appl Genet* 46(1): 93-104.
- Margaglione, M., Cappucci, G., et al. (1998). « PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants. »: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(4): 562-7.



- Masoli, M., Fabian, D., et al. (2004). « Global Burden of Asthma. » *Global Initiative for Asthma*, National Heart Blood and Lung Institute, National Institute of Health & World Health Organisation disponible en ligne à <http://www.ginasthma.com>.
- Matthay, M. A. et Clements, J.A. (2004). « Coagulation-dependent mechanisms and asthma. » *J Clin Invest* 114: 20-23.
- Mattos, W., Lim, S., et al. (2002). « Matrix metalloproteinase-9 expression in asthma: effect of asthma severity, allergen challenge, and inhaled corticosteroids. » *Chest* 122(5): 1543-52.
- Mautino, G., Oliver, N., et al. (1997). « Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(5): 583-591.
- Medina, C. et Radomski, M.W. (2006). « Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. » *J Pharmacol Exp Ther* 318(3): 933-8.
- Miles, L. A., Dahlberg, C.M., et al. (1991). « Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. » *Biochemistry* 30(6): 1682-91.
- Minshall, E.M., Leung, D.Y., et al. (1997). « Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 17(3): 326-33.
- Molinari, J.F., Scuri, M., et al. (1996). « Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. » *Am J Respir Crit Care Med* 154(3 Pt 1): 649-53.
- Mondino, A. et Blasi, F. (2004). « uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. » *Trends Immunol* 25(8): 450-5.
- Montemurro, P., Barbuti, G., et al. (1999). « Retinoic acid stimulates plasminogen activator inhibitor 2 production by blood mononuclear cells and inhibits urokinase-induced extracellular proteolysis. » *Br J Haematol* 107(2): 294-.
- Montuori, N., Visconte, V., et al. (2005). « Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? » *Thromb Haemost* 93(2): 192-8.
- Moreau, M.E., Garbacki, N., et al. (2005). « The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. » *J Pharmacol Sci* 99(1): 6-38.

- Morley, M., Molony, C.M., et al. (2004). « Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. » *Nature* 430(7001): 743-7.
- Munakata, M. (2006). « Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. » *Allergol Int* 55(3): 235-43.
- National Asthma Education and Prevention Program (NAEPP). Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma (2007). National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute. Item No.: 08-4051. 440 pages. disponible à <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/>.
- Naldini, L., Tamagnone, L., et al. (1992). « Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. » *Embo J* 11(13): 4825-33.
- Neale, B.M. et Sham, P.C. (2004). « The future of association studies: gene-based analysis and replication. » *Am J Hum Genet* 75(3): 353-62.
- Nickel, R., Illi, S., et al. (2005). « Variability of total serum immunoglobulin E levels from birth to the age of 10 years. A prospective evaluation in a large birth cohort (German Multicenter Allergy Study). » *Clin Exp Allergy* 35(5): 619-23.
- Nienaber, V.L., Young, S.L., et al. (1992). « Conformational similarities between one-chain and two-chain tissue plasminogen activator (t-PA): implications to the activation mechanism on one-chain t-PA. » *Biochemistry* 31(15): 3852-61.
- Nozaki, S., Endo, Y., et al. (2006). « Targeting urokinase-type plasminogen activator and its receptor for cancer therapy. » *Anticancer Drugs* 17(10): 1109-17.
- Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., et al. (2004). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. Philadelphia, Saunders.
- Nykjaer, A., Moller, B., et al. (1994). « Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes. » *J Immunol* 152(2): 505-16.
- Ober, C. et Hoffjan, S. (2006). « Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. » *Genes Immun* 7(2): 95-100.
- Ober, C. et Moffatt, M.F. (2000). « Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. » *Clin Chest Med* 21(2): 245-61.
- Ogawa, Y. et Calhoun, W.J. (2006). « The role of leukotrienes in airway inflammation. » *J Allergy Clin Immunol* 118(4): 789-98; quiz 799-800.

- Oh, C.K., Ariue, B., et al. (2002). « PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of murine asthma model. » *Biochem Biophys Res Commun* 294(5): 1155-60.
- Olofsson, A., Lindberg, P., et al. (2003). « Relationship between fibrinolytic activity and gingival inflammatory reaction in young individuals. » *J Periodont Res* 38(1): 104-8.
- Organisation Mondiale de la Santé (2006). *Asthme : aide-mémoire N° 307*, visité le 29 avril 2007, disponible en ligne à <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/fr/index.html>.
- Ossowski, L., Russo-Payne, H., et al. (1991). « Inhibition of urokinase-type plasminogen activator by antibodies: the effect on dissemination of a human tumor in the nude mouse. » *Cancer Res* 51(1): 274-81.
- Ozturk, A., Minster, R.L., et al. (2007). « Association of tagSNPs in the urokinase-plasminogen activator (PLAU) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits. » *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144(1): 79-82.
- Palmer, L.J., Burton, P.R., et al. (2000). « Independent inheritance of serum immunoglobulin E concentrations and airway responsiveness. » *Am J Respir Crit Care Med* 161(6): 1836-43.
- Pare, P.D., Roberts, C.R., et al. (1997). « The functional consequences of airway remodeling in asthma. » *Monaldi Arch Chest Dis* 52(6): 589-96.
- Park, H.S., Kim, H.A., et al. (2003). « Metalloproteinase-9 is increased after toluene diisocyanate exposure in the induced sputum from patients with toluene diisocyanate-induced asthma. » *Clin Exp Allergy* 33(1): 113-8.
- Parks, W.C., Wilson, C.L., et al. (2004). « Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. » *Nat Rev Immunol* 4(8): 617-29.
- Peltonen, L., Palotie, A., et al. (2000). « Use of population isolates for mapping complex traits. » *Nat Rev Genet* 1(3): 182-90.
- Petersen, L.C., Lund, L.R., et al. (1988). « One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. » *J Biol Chem* 263(23): 11189-95.

- Pizzichini, E., Pizzichini, M.M., et al. (1996). « Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. » *Am J Respir Crit Care Med* 154(2 Pt 1): 308-17.
- Plesner, T., Behrendt, N., et al. (1997). « Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. » *Stem Cells* 15(6): 398-408.
- Potempa, J., Korzus, E., et al. (1994). « The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. » *J Biol Chem* 269(23): 15957-60.
- Preissner, K.T. (1991). « Structure and biological role of vitronectin. » *Annu Rev Cell Biol* 7: 275-310.
- Przybylowska, K., Smolarczyk, K., et al. (2002). « Antigen levels of the urokinase-type plasminogen activator and its gene polymorphisms in colorectal cancer. » *Cancer Lett* 181(1): 23-30.
- Ragno, P. (2006). « The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule. » *Cell Mol Life Sci* 63(9): 1028-37.
- Reed, C.E. et Kita, H. (2004). « The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. » *J Allergy Clin Immunol* 114(5): 997-1008; quiz 1009.
- Resnati, M., Guttinger, M., et al. (1996). « Proteolytic cleavage of the urokinase receptor substitutes for the agonist-induced chemotactic effect. » *Embo J* 15(7): 1572-82.
- Reuning, U., Magdolen, V., et al. (2003). « Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. » *Biol Chem* 384(8): 1119-31.
- Riemenschneider, M., Konta, L., et al. (2006). « A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. » *Hum Mol Genet* 15(16): 2446-56.
- Rolph, M.S., Sisavanh, M., et al. (2006). « Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies. » *Pharmacol Ther* 109(1-2): 284-94.

- Ryan, T.J., Lai, L., et al. (1992). « Plasmin generation induces neutrophil aggregation: dependence on the catalytic and lysine binding sites. » *J Cell Physiol* 151(2): 255-61.
- Saito, H. (2005). « Role of mast cell proteases in tissue remodeling. » *Chem Immunol Allergy* 87: 80-4.
- Salanti, G., Sanderson, S., et al. (2005). « Obstacles and opportunities in meta-analysis of genetic association studies. » *Genet Med* 7(1): 13-20.
- Sarma, V.J., Huber-Lang, M., et al. (2006). « Complement in lung disease. » *Autoimmunity* 39(5): 387-94.
- Sears, M.R., Greene, J.M., et al. (2003). « A longitudinal, population-based, cohort study of childhood asthma followed to adulthood. » *N Engl J Med* 349(15): 1414-22.
- Seeger, W., Stohr, G., et al. (1985). « Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. » *J Appl Physiol* 58(2): 326-38.
- Shafren, D.R., Gardner, J., et al. (1999). « Picornavirus receptor down-regulation by plasminogen activator inhibitor type 2. » *J Virol* 73(9): 7193-8.
- Shinagawa, K., Martin, J.A., et al. (2007). « Coagulation factor Xa modulates airway remodeling in a murine model of asthma. » *Am J Respir Crit Care Med* 175(2): 136-43.
- Sillaber, C., Baghestanian, M., et al. (1999). « The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. » *J Immunol* 162(2): 1032-41.
- Sillaber, C., Baghestanian, M., et al. (1997). « Molecular and functional characterization of the urokinase receptor on human mast cells. » *J Biol Chem* 272(12): 7824-32.
- Simpson, J.L., Scott, R.J., et al. (2005). « Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. » *Am J Respir Crit Care Med* 172(5): 559-65.
- Sitrin, R.G., Todd, R.F., 3rd, et al. (1996). « The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. » *J Clin Invest* 97(8): 1942-51.
- Sloand, E.M. (2005). « Soluble urokinase activator receptor (suPAR) in stem cell mobilization. » *Blood* 105(5): 1847-8.

- Spielman, R.S. et Ewens, W. J. (1996). « The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. » *Am J Hum Genet* 59(5): 983-9.
- Stack, M.S. et Johnson, D.A. (1994). « Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). » *J Biol Chem* 269(13): 9416-9.
- Stefansson, S. et Lawrence, D.A. (1996). « The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. » *Nature* 383(6599): 441-3.
- Stellato, C. (2005). *Regulation of Airway Epithelial Chemokine Expression By Alteration in RNA Stability*. Gene Expression : Beyond Transcription Factors, San Diego Convention Center.
- Sternlicht, M.D. et Werb, Z. (2001). « How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. » *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463-516.
- Stockley, R.A. (2002). « Neutrophils and the pathogenesis of COPD. » *Chest* 121(5 Suppl): 151S-155S.
- Stump, D.C., Lijnen, H. R., et al. (1986). « Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator. » *J Biol Chem* 261(36): 17120-6.
- Sun, G., Stacey, M.A., et al. (2001). « Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells. » *J Immunol* 167(2): 1014-21.
- Swaisgood, C.M., French, E.L., et al. (2000). « The development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice deficient for components of the fibrinolytic system. » *Am J Pathol* 157(1): 177-87.
- Swiatkowska, M., Szemraj, J., et al. (2005). « Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. » *Febs J* 272(22): 5821-31.
- Syrovets, T., Jendrach, M., et al. (2001). « Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation. » *Blood* 97(12): 3941-50.

- Syrovets, T. et Simmet, T. (2004). « Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. » *Cell Mol Life Sci* 61(7-8): 873-85.
- Tabor, H.K., Risch, N.J., et al. (2002). « Opinion: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. » *Nat Rev Genet* 3(5): 391-7.
- Tanaka, H., Masuda, T., et al. (2001). « The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodeling in a murine model of allergic asthma. » *Inflamm Res* 50(12): 616-24.
- Tang, H., Kerins, D.M., et al. (1998). « The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. » *J Biol Chem* 273(29): 18268-72.
- Temple, R., Allen, E., et al. (2001). « Microarray analysis of eosinophils reveals a number of candidate survival and apoptosis genes. » *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(4): 425-33.
- Tessier, P.A., Naccache, P.H., et al. (1998). « Induction of acute inflammation in vivo by staphylococcal superantigens. II. Critical role for chemokines, ICAM-1, and TNF-alpha. » *J Immunol* 161(3): 1204-11.
- Theoharides, T.C. et Kalogeromitros, D. (2006). « The critical role of mast cells in allergy and inflammation. » *Ann N Y Acad Sci* 1088: 78-99.
- Thompson, M.D., Takasaki, J., et al. (2006). « G-protein-coupled receptors and asthma endophenotypes: the cysteinyl leukotriene system in perspective. » *Mol Diagn Ther* 10(6): 353-66.
- Tomimori, Y., Muto, T., et al. (2002). « Chymase participates in chronic dermatitis by inducing eosinophil infiltration. » *Lab Invest* 82(6): 789-94.
- Tran, H., Maurer, F., et al. (2003). « Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. » *Mol Cell Biol* 23(20): 7177-88.
- Tremblay, K., Lemire, M., et al. (2006). « Association study between the CX3CR1 gene and asthma. » *Genes Immun* 7(8): 632-9.

- Tsai, F.J., Lin, C.C., et al. (2002). « Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with urolithiasis. » *Urology* 59(3): 458-61.
- Tuder, R.M., Yoshida, T., et al. (2006). « State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. » *Proc Am Thorac Soc* 3(6): 503-10.
- Tutluoglu, B., Gurel, C.B., et al. (2005). « Platelet function and fibrinolytic activity in patients with bronchial asthma. » *Clin Appl Thromb Hemost* 11(1): 77-81.
- van Beijsterveldt, C.E. et Boomsma, D.I. (2007). « Genetics of parentally reported asthma, eczema and rhinitis in 5-yr-old twins. » *Eur Respir J* 29(3): 516-21.
- van Hinsbergh, V.W. (1988). « Regulation of the synthesis and secretion of plasminogen activators by endothelial cells. » *Haemostasis* 18(4-6): 307-27.
- Vawter, M.P., Atz, M.E., et al. (2006). « Genome scans and gene expression microarrays converge to identify gene regulatory loci relevant in schizophrenia. » *Hum Genet* 119(5): 558-70.
- Vercelli, D. (2004). « Genetics, epigenetics, and the environment: switching, buffering, releasing. » *J Allergy Clin Immunol* 113(3): 381-6; quiz 387.
- Vignola, A.M., Riccobono, L., et al. (1998). « Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. » *Am J Respir Crit Care Med* 158(6): 1945-50.
- Vos, C.M., van Haastert, E.S., et al. (2003). « Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions. » *J Neuroimmunol* 138(1-2): 106-14.
- Wagers, S.S., Norton, R.J., et al. (2004). « Extravascular fibrin, plasminogen activator, plasminogen activator inhibitors, and airway hyperresponsiveness. » *J Clin Invest* 114(1): 104-11.
- Watabe, T., Yoshida, K., et al. (1998). « The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. » *Int J Cancer* 77(1): 128-37.
- Weide, I., Romisch, J., et al. (1994). « Contact activation triggers stimulation of the monocyte 5-lipoxygenase pathway via plasmin. » *Blood* 83(7): 1941-51.



- Wiesch, D.G., Meyers, D.A., et al. (1999). « Genetics of asthma. » *J Allergy Clin Immunol* 104(5): 895-901.
- Wilborn, J., Bailie, M., et al. (1996). « Constitutive activation of 5-lipoxygenase in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. » *J Clin Invest* 97(8): 1827-36.
- Wjst, M., Fischer, G., et al. (1999). « A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. » *Genomics* 58(1): 1-8.
- Wojta, J., Kaun, C., et al. (2002). « C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. » *Blood* 100(2): 517-23.
- Wong, G.W., Foster, P.S., et al. (2002). « Biochemical and functional characterization of human transmembrane tryptase (TMT)/tryptase gamma. TMT is an exocytosed mast cell protease that induces airway hyperresponsiveness in vivo via an interleukin-13/interleukin-4 receptor alpha/signal transducer and activator of transcription (STAT) 6-dependent pathway. » *J Biol Chem* 277(44): 41906-15.
- Xiao, Y., Li, H., et al. (2001). « The expression of plasminogen activator system in a rat model of periodontal wound healing. » *J Periodontol* 72(7): 849-57.
- Xu, J., Postma, D.S., et al. (2000). « Major genes regulating total serum immunoglobulin E levels in families with asthma. » *Am J Hum Genet* 67(5): 1163-73.
- Xu, X., Fang, Z., et al. (2001). « A genomewide search for quantitative-trait loci underlying asthma. » *Am J Hum Genet* 69(6): 1271-7.
- Yager, D., Kamm, R.D., et al. (1995). « Airway wall liquid. Sources and role as an amplifier of bronchoconstriction. » *Chest* 107(3 Suppl): 105S-10S.
- Yang, I.A., Savarimuthu, S., et al. (2007). « Gene-environmental interaction in asthma. » *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(1): 75-82.
- Yu, H., Maurer, F., et al. (2002). « Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. » *Blood* 99(8): 2810-8.
- Zieve, I., Wiener, A., et al. (1936). « On the linkage relations of the genes for allergic disease and the genes determining the blood groups, MN types and eye colour in man. » *Ann Eugen* 7: 163-178.

Zimmermann, N., King, N. E., et al. (2003). « Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. » *J Clin Invest* 111(12): 1863-74.

## **Annexes**

**Annexe 1 : Consentement de l'éditeur**

**Annexe 2 : Accord des coauteurs**

## ANNEXE I

**Editor's consent**1. *Identification of journal*

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

2. *Identification of editor*

Christina Shepperd

3. *Identification of article*

Begin P, Tremblay K, Daley D, Lemire M, Claveau S, Salesse C, Kacel S, Montpetit A, Becker A, Yang-Cheung M, Kozyrskyj AL, Hudson TJ, Laprise C. / 2007 / Association of Urokinase-type Plasminogen Activator with Asthma and Atopy / American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine / Mar 15; [Epub ahead of print]

The student Philippe Bégin is authorized to include the above-mentioned article in his master's thesis which is entitled *Étude d'association entre l'asthme et PLAU dans la population du Saguenay-Lac-Saint-Jean*.\*

\*[Association study between asthma and PLAU in the Saguenay-Lac-Saint-Jean population]

Subject: FW: Blue-200607-1012OC.R1 (non-structured abstract)  
 Date: Tue, 3 Apr 2007 16:01:10 -0400  
 Thread-Topic: Blue-200607-1012OC.R1 (non-structured abstract)  
 Thread-Index: AcdiX7WvYZ3noncmSTS6Q5iaorgg5wFp1CSwA4jvn9A=  
[information retiree / information withdrawn]

PERMISSION GRANTED FOR THE PURPOSE INDICATED.  
 CITE: AUTHOR(S)/ YEAR/ TITLE/  
 AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE  
 /VOLUME/ PAGES.  
 OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY  
 © AMERICAN THORACIC SOCIETY  
 CHRISTINA SHEPHERD, MANAGING EDITOR, 3/27/07