

Université de Montréal

Associations entre des polymorphismes génétiques des gènes CHRN et  
l'étourdissement ressenti lors de l'initiation à la nicotine

par

Maxime Pedneault

Département de médecine sociale et préventive

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en santé communautaire  
option mémoire

Avril, 2013

© Maxime Pedneault, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Associations entre des polymorphismes génétiques des gènes CHRN et  
l'étourdissement ressenti lors de l'initiation à la nicotine

Présenté par :

Maxime Pedneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Anita Koushik, président-rapporteur

Jennifer O'Loughlin, directrice de recherche

Aurélie Labbe, co-directrice

Marie-Pierre Dubé, membre du jury

## Résumé

**Objectifs:** Plusieurs polymorphismes nucléaires localisés sur les gènes des récepteurs nicotiniques cholinergiques CHRN sont associés au tabagisme. Cependant, peu d'études ont examiné l'association entre les polymorphismes sur les gènes CHRN et l'étourdissement. Les polymorphismes et les symptômes subjectifs sont peu être lié à la dépendance à la nicotine et à l'étourdissement ressenti lors de l'initiation. Le but de cette étude est d'étudier l'association entre 61 polymorphismes sur huit gènes CHRN (*CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA6*, *CHRNA7*, *CHRNA2*, *CHRNA3*, *CHRNA4*) et l'étourdissement ressenti lors de l'initiation. **Méthodes:** Les données provenant d'une étude de cohorte longitudinale composée de 1293 étudiants, ont été analysées selon un devis d'étude gène-candidat. Les données ont été collectées par le biais de questionnaires auto-reportés aux trois mois, durant 5 ans. L'ADN provenant de la salive ou du sang a été génotypé pour 61 polymorphismes localisés sur les gènes CHRN ont été génotypés, à l'aide d'une stratégie de couverture maximale du gène. L'équation d'analyse est une régression logistique, incluant un ajustement sur l'âge, le sexe et l'origine ethnique. **Résultats:** Trois SNPs sur le gène *CHRNA6* (rs7812298, rs2304297, rs7828365) sont associés à notre phénotype (OR (95% CI)= 0.54 (0.36, 0.81), 0.59 (0.40, 0.86) and 0.58 (0.36, 0.95, respectivement),. Trois autres polymorphismes (rs3743077 (*CHRNA3*), rs755204 (*CHRNA4*), rs7178176 (*CHRNA7*)) sont également associés à phénotype (OR (95% CI)=1.40 (1.02, 1.90), 1.85 (1.05, 3.27) and 1.51 (1.06, 2.15), respectivement) **Conclusion:** Plusieurs SNPs localisés sur les gènes CHRN sont associés à l'étourdissement, un phénotype de l'initiation qui est peut-être associé à la dépendance à la nicotine.

**Mots-clés:** polymorphismes, association génétique, initiation à la cigarette, récepteurs cholinergiques nicotiniques, nicotine, adolescents.

## Abstract

**Background:** Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in multiple nicotinic receptor genes (*CHRN*) are associated with smoking. However few studies have examined the association between *CHRN* SNPs and subjective responses to smoking which may relate to sustained smoking, such as dizziness at first inhalation. The objective of this study was to investigate the association between 61 SNPs in eight *CHRN* genes (*CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA6*, *CHRNA7*, *CHRNB2*, *CHRNB3*, *CHRNB4*) and dizziness at first inhalation. **Methods:** Data were available in a longitudinal cohort investigation of 1293 students 12-13 years old at baseline. Students completed self-report questionnaires at-school every 3 months for 5 years during secondary school, and a mailed self-report questionnaire three years later. DNA extracted from blood or saliva was genotyped for 61 *CHRN* SNPs selected using a gene tagging approach. Associations were modeled using logistic regression controlling for sex, race and age at first cigarette. **Results:** The minor alleles of three SNPs in *CHRNA6* (rs7812298, rs2304297, rs7828365) were associated a decreased probability of dizziness (OR (95% CI)=0.54(0.36, 0.81), 0.59(0.40,0.86) and 0.58(0.36,0.95, respectively), while one SNP in each of three other genes (rs3743077 (*CHRNA3*), rs755204 (*CHRNA4*), rs7178176 (*CHRNA7*)) was associated with an increased probability of dizziness (OR(95% CI)=1.40 (1.02,1.90), 1.85(1.05,3.27) and 1.51(1.06,2.15), respectively). **Conclusion:** Thus, several SNPs located in *CHRN* genes are associated with dizziness at first inhalation, a smoking initiation phenotype that may relate to sustained smoking.

**Keywords:** SNP; genetic association; cigarette initiation; nicotinic cholinergic receptors; nicotine; adolescent.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract.....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Remerciements .....	xi
1. Introduction.....	1
2. Revue de littérature.....	5
2.1 Revue des facteurs de risque génétiques associés au tabagisme.....	5
2.2 Explications des concepts en génétique moléculaire .....	6
2.2.1. ADN .....	6
2.2.2. Bases.....	7
2.2.3. Polymorphismes nucléotidiques.....	7
2.3. Méthodes en épidémiologie génétique.....	8
2.3.1. Genome-wide association study.....	8
2.3.2. Approche du gène candidat .....	9
2.3.3. Statistiques appliquées en génétique.....	10
2.3.3.1. Fréquence des allèles mineurs .....	10
2.3.3.2. Association génétique.....	11
2.4 Associations avec les gènes CHRN .....	11
2.4.1 Mécanismes physiologiques et neuronaux des récepteurs nicotiques....	11
2.4.2 Recension des études épidémiologiques .....	14
2.4.2.1. CHRN2 .....	15
2.4.2.2. CHRN3 .....	16
2.4.2.3. CHRNA6 .....	17
2.4.2.4. CHRNA5 .....	17
2.4.2.5. CHRNA7 .....	18
2.4.2.6. CHRNA3 .....	19
2.4.2.7. CHRN4 .....	19
2.4.2.8. CHRNA4 .....	20
2.4.3. Résumé des évidences génétiques.....	22
2.5 Les phénotypes du tabagisme .....	23
2.5.1 Phénotype d'intérêt : l'étourdissement.....	23
2.6 Ouvertures de la recherche.....	24
3. Objectif de la recherche .....	25
4. Méthodologie.....	26
4.1. Devis de recherche.....	26
4.1.1 Rationale de l'étude.....	26
4.1.2. Consentement .....	27
4.2. L'échantillon.....	27

4.3. La collecte de données .....	29
4.3.1 Données sociodémographiques .....	31
4.3.2 Données phénotypiques.....	31
4.3.3 Données génétiques.....	31
4.3.3.1 Extraction de l'ADN .....	32
4.3.3.2 Stratégie de couverture des gènes.....	33
4.3.3.3 Génotypage des polymorphismes.....	36
4.3.3.4 Choix et restriction des polymorphismes à analyser .....	36
4.4. Questionnaires.....	38
4.5. Variables de l'étude .....	39
4.5.1. Variable dépendante: Phénotype: Étourdissement ressenti lors de la première cigarette.....	39
4.5.2. Variables indépendantes.....	39
4.5.3. Covariables.....	40
4.5.3.1. Âge à la première cigarette .....	40
4.5.3.2. Sexe .....	40
4.5.4 Facteurs de confusion potentiels .....	40
4.5.4.1 L'ethnicité.....	40
4.6. Les analyses statistiques.....	41
4.6.1 Transformation des données.....	41
4.6.3 Analyses statistiques .....	43
5. Article .....	44
6. Discussion.....	65
6.1 Résumé et retour sur les résultats.....	65
6.1.1 Retour sur chaque gène .....	66
6.1.1.1 CHRNA3 .....	67
6.1.1.2 CHRNA4 .....	68
6.1.1.3. CHRNA6 .....	68
6.1.1.5 CHRNA7 .....	69
6.2 Analyses secondaires (MAF).....	70
6.3 Limites de l'étude.....	72
6.3.1 Précision .....	72
6.3.2 Biais potentiel.....	72
6.3.2.1 Biais de sélection.....	72
6.3.2.2 Biais d'information .....	74
6.3.2.2 Biais de confusion .....	76
6.4 Perspective en santé publique .....	77
6.4.1 Directions futures .....	77
6.4.2 Implications et politiques publiques de santé publique.....	77
6.4.3 Perspective de recherches futures.....	78
7. Conclusion .....	81
8. Références.....	82
Annexes .....	A-1
Annexe 1: Détails des études épidémiologiques recensées .....	A-2
Annexe 2: Questionnaire sur les phénotypes d'initiation au tabac .....	A-8
Annexe 3: Polymorphismes génotypés et retenus pour analyses .....	A-10

Annexe 4: Statistiques descriptives de l'échantillon.....	A-12
Annexe 5: OR et intervalle de confiance pour les associations entre le génotype et le phénotype.....	A-15
Annexe 6: Analyses préliminaires et associations entre le génotype et différents degrés du phénotype .....	A-17
Annexe 7: Fréquences d'allèles mineurs dans la population à l'étude .....	A-19
Annexe 8: Association entre les polymorphismes et le phénotype, modèle dominant et récessif .....	A-22
Annexe 9: OR par génotypes .....	A-28
Annexe 10: Comparaison des caractéristiques de bases des 356 participants de l'échantillon final contre les participants de l'échantillon complet.....	A-30
Annexe 11: Comparaison des participants exclus de l'échantillon final et ceux inclus dans notre échantillon final.....	A-32

**Liste des tableaux**

- Table 1. Single nucleotide polymorphisms in CHRN genes that were genotyped. Nicotine Dependence in Teens Study, 1999-2007
- Table 2. Comparison of selected characteristics of participants with and without genetic data. Nicotine Dependence in Teens Study, 1999-2005
- Table 3. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for the associations between selected SNPs in CHRN genes and dizziness at first inhalation of cigarette smoke. Additive model. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2005
- Tableau 4. Liste des polymorphismes localisés sur ou en périphérie des gènes CHRN. Polymorphismes en équilibre Hardy-Weinberg seulement.
- Tableau 5. Comparaison des participants exclus de l'échantillon final en fonction de ceux inclut dans notre échantillon final.
- Tableau 6. Rapport de cotes (OR) et intervalle de confiance 95% pour les associations entre l'étourdissement à la première inhalation de cigarette et des polymorphismes localisés sur les gènes CHRN. Régression logistique multinomiale ajustée pour le genre, l'ethnicité et l'âge à la première cigarette. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2007.
- Tableau 7. Analyses préliminaires des associations entre un polymorphisme et le degré d'étourdissement ressenti, testé par degré d'intensité du phénotype et en fonction de la population à l'étude
- Tableau 8. Allèles mineurs et majeurs des polymorphismes sur CHRN dans la population HapMap CEU et notre population.
- Tableau 9. Odds ratio (OR) et 95% intervalle de confiance (IC) pour les associations entre des polymorphismes de CHRN et l'étourdissement à la première cigarette. Modèle dominant. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2005.
- Tableau 10. Odds ratio (OR) et 95% intervalle de confiance (IC) pour les associations entre des polymorphismes de CHRN et l'étourdissement à la première cigarette. Modèle récessif. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2005.
- Tableau 11. Rapport de cotes (OR) et intervalle de confiance 95% pour les associations entre l'étourdissement à la première inhalation de cigarette et des polymorphismes localisés sur les gènes CHRN. Comparaison aa vs. AA et Aa vs. AA. Régression logistique multinomiale ajustée pour le genre, l'ethnicité

et l'âge à la première cigarette. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2007.

Tableau 12. Comparaison des participants dans l'échantillon final contre ceux de l'échantillon complet.

Tableau 13. Comparaison des participants exclus de l'échantillon final en fonction de ceux inclus dans notre échantillon final.

**Liste des figures**

Figure 1. Représentation graphique du circuit mésolimbique, un réseau neuronal impliqué dans le circuit de la récompense. (DA: dopamine)

Figure 2 Étapes menant à la constitution de l'échantillon final

**Liste des abréviations**

ADN = Acide désoxyribonucléique

ARN = Acide ribonucléique

DA = Dopamine

FTND = Fagerström test for nicotine dependence

GWAS = Genome-wide association study

LD = Déséquilibre de liaison (linkage disequilibrium)

MAF = Fréquence d'allèles mineurs

NAc = Nucleus accumbens

nAChR = Récepteur cholinergique nicotinique

OMS = Organisation mondiale de la santé

PCR = Polymerase chain reaction

VTA = Zone tegmentale ventrale

À ma famille

## **Remerciements**

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont soutenu durant cette période.

Je tiens d'abord à remercier le Dr Jennifer O'Loughlin, ma directrice de recherche, et Aurélie Labbe, ma codirectrice. Elles m'ont beaucoup encouragé dans ma démarche d'apprentissage et de familiarisation avec la recherche scientifique.

Merci à mes amis, scientifiques de formation ou de salon, pour leur soutien et leurs encouragements constants. La curiosité dont vous faites preuve m'a forcé à expliquer et vulgariser à maintes reprises le sujet de cette recherche. Merci pour les discussions interminables sur le rôle de la génétique dans le développement humain, le fonctionnement des cellules et les explications concernant les pathologies qui nous inquiètent tous.

Également, je tiens à remercier mes superviseurs qui m'ont aidé durant cette période. Leur support et encouragements m'ont toujours accompagnés au cours de cette période: Chris Robinson de l'Agence de santé publique du Canada, Dr James Talbot et Sherri Wilson du Office of the Chief Medical Officer of Health de l'Alberta ainsi que Drs Devendra Sinha et Nyo Nyo Kyaing du World Health Organisation - South-East Asia Regional Office.

## 1. Introduction

Dans les pays industrialisés, le tabagisme est la cause principale du décès, ou précipite la mort, d'environ un quart des hommes. (Peto, Lopez et al. 1996) Pourtant, il s'agit d'une statistique étonnante puisque le tabagisme est un phénomène relativement récent, ce fléau est un malheur pour les sociétés du monde entier. Environ 50% des fumeurs qui ont consommé des produits du tabac tout au long de leur vie vont mourir de complications liées au tabagisme. (Doll, Peto et al. 2005) Le tabagisme cause une dépendance puissante, persistante et difficile à maîtriser où le consommateur se trouve dans une situation de dépendance physiologique et psychologique. (Li 2003; Karp, O'Loughlin et al. 2006; Benowitz 2009; Kaprio 2009; Swan and Lessov-Schlaggar 2009; Benowitz 2010; Hartz and Bierut 2010) Annuellement, le tabagisme provoque la mort de plus de 5 millions d'êtres humains et ce chiffre est appelé à augmenter, sauf si l'on continue à lutter efficacement contre ce fléau qui entraîne des morts évitables. (WHO 2009) Le pouvoir addictif de la nicotine n'est plus à prouver, les taux de cessation tabagique restent bas dans la plupart des populations. Cela nous renseigne sur le potentiel hautement addictif des composés chimiques inhalés lors de la consommation régulière de tabac. (Bancej, O'Loughlin et al. 2007; Mannino 2009; Small, Shah et al. 2010) Les mécanismes de la dépendance sont multiples, complexes et inter relié au sein d'un réseau que la recherche scientifique essaie de déchiffrer. (Rhee, Hewitt et al. 2003; Ray, Schnoll et al. 2009; Swan and Lessov-Schlaggar 2009; Benowitz 2010) Le tabagisme est un phénomène récent dans la plupart de sociétés industrialisées, on estime que le tabagisme a déjà tué plus de 100 millions de personnes au cours du 20<sup>e</sup> siècle. (WHO 2010) Il s'agit d'un comportement néfaste qui s'est récemment répandu à l'échelle planétaire comme une trainée de poudre. (Peto, Lopez et al. 1996) De plus, la hausse sans cesse grandissante du nombre absolu de fumeurs dans les pays nouvellement industrialisés, ainsi que la hausse du taux de tabagisme dans les pays en voie de développement, ne sont pas sans inquiéter la communauté mondiale de spécialistes du tabagisme. (Peto, Lopez et al. 1996; WHO 2009)

Selon les dernières estimations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre de morts annuelles causées par le tabagisme en 2030 se chiffre à environ huit millions et de ce chiffre, plus de 80% de ces décès auront lieu dans des pays à faible ou moyen revenu. (WHO 2010) Le cas de la Chine, où le tabagisme est la cause primaire chez 1,2 million de décès par année, nous informe sur l'urgence de procéder à des changements drastiques et efficaces dans notre stratégie de lutte anti-tabac. Un nouveau traité international vient faire souffler un vent de changement sur le problème du contrôle tabagique et de l'implantation des mesures anti-tabac. Le World Health Organisation Framework Convention for Tobacco Control (WHO FCTC) est un exemple d'effort international envers cet important problème de santé publique, le Canada fait partie des pionniers dans la lutte anti-tabac et a signé ce traité en juillet 2003. (WHO 2010)

La prévention est la meilleure solution au problème qu'est le tabagisme. (Wipfli et Samet 2009) Au sein de la population adulte canadienne âgée de plus de 15 ans, on remarque une baisse de 8% (51% à 43%) du nombre d'adultes ayant été ou qui sont présentement fumeurs. Une baisse semblable est observée pour le taux de fumeurs, le quart de la population adulte canadienne fumait en 1999, alors qu'en 2010, environ 17% des adultes fument. Ces proportions s'établissent à 20% pour les jeunes Québécois et 18% pour les jeunes de l'ensemble du Canada. (Manske 2009; Payette 2009) Fait intéressant à noter, environ 17% des fumeurs sont considérés des fumeurs occasionnels, alors qu'en 1999, cette proportion était de 22% (Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada (ESUTC) 2010).

Cependant, les taux de tabagisme varient énormément selon l'âge et le sexe. Les données préliminaires de l'Enquête sur le tabagisme chez les jeunes 2008-2009 nous indiquent que les étudiants de niveau scolaire six à neuf (11 à 15 ans) ne sont pas épargnés par la cigarette. De plus, l'enquête rapporte que les jeunes de niveau scolaire six à neuf ont, en moyenne, fumé une cigarette complète à l'âge de 12,1 années, alors que chez les étudiants de niveau scolaire 10 à 12, l'âge moyen est de 14,1 années. (YSS, 2009) Environ 3% des jeunes de niveau scolaire six à neuf sont des fumeurs réguliers, cette proportion monte à 13% chez les étudiants de niveau 10 à

12 (15 à 17 ans). Les données de l'Enquête de surveillance de l'usage du tabac au Canada (ESUTC) 2010 rapporte que 12% des jeunes canadiens de 15 à 19 ans fument la cigarette, 22% chez les 20 à 24 ans. (CTUMS, 2010) Près la moitié des jeunes canadiens de niveau scolaire 10 à 12 ont déjà essayé les produits du tabac, une statistique qui n'a pas diminuée de 2006 à 2009 et qui est semblable autant chez les garçons que les filles. (CTUMS, 2010) (YSS, 2009)

Une comparaison des populations étudiantes du monde entier nous permet de révéler que les jeunes filles présentent des taux de tabagisme semblables à celui des jeunes garçons dans plus de 50% des 154 pays qui ont appliqué le Global Youth Tobacco Survey conçu par le CDC et l'OMS. (Warren, Lee et al. 2009)

Le tabagisme peut être divisé grossièrement en trois phases, l'initiation, la dépendance et la cessation. (Haberstick, Timberlake et al. 2007; Dwyer, McQuown et al. 2009) Au niveau conceptuel, il est utile de concevoir que l'histoire naturelle du développement de la dépendance au tabac commence par l'initiation aux produits du tabac. Cependant, le développement d'une dépendance à la nicotine est associé à certains facteurs prédictifs. Une méta-analyse critique de la littérature pointe vers une association entre l'exposition aux publicités du tabac et les attitudes envers le tabagisme, les croyances et les attentes face à la consommation de tabac, ainsi qu'avec l'intention de consommer ou l'utilisation de produits du tabac. (DiFranza, Wellman et al. 2006) L'exposition à des niveaux élevés de publicités et produits commerciaux du tabac est associée à un risque plus élevé de s'initier aux produits du tabac, même après un ajustement sur les covariables à l'étude initiale. (Hanewinkel, Isensee et al. 2011) Les effets de la promotion des produits du tabac par le biais d'attitudes positives présentées dans les films et les productions audiovisuelles sont également associés à un risque plus élevé d'initiation aux produits du tabac, cette association est significative dans la majorité des articles évalués par deux méta-analyses indépendantes. (Wellman, Sugarman et al. 2006; Nunez-Smith, Wolf et al. 2010) L'âge est également un prédictif de l'initiation aux produits du tabac selon certaines études, alors que ce lien n'est pas clairement démontré dans d'autres études. (Ausems, Mesters et al. 2009; Morrell, Song et al. 2011) Une étude chez les résidents

adultes du Massachusetts sélectionnés au hasard rapporte que les fumeurs légers non-quotidiens sont significativement plus jeunes, se définissent comme des fumeurs sociaux et rapportent une date plus tardive d'initiation au tabac plus basse que les fumeurs légers quotidiens. (Levy, Biener et al. 2009) Ils sont également moins à risque d'augmenter leur consommation de cigarettes que les fumeurs légers quotidiens. (Levy, Biener et al. 2009) On rapporte également que le statut de fumeur régulier à l'adolescence est un prédicteur du statut de fumeur à l'âge adulte. (Chassin, Presson et al. 1996) L'apport de la composante génétique à ces processus n'est pas précisément connu, mais certaines études établissent l'héritabilité de l'initiation à une valeur entre 0,37 et 0,56, alors que la dépendance présenterait une héritabilité un peu plus élevée, entre 0,46 et 0,84. (Kaprio 2000; Batra, Patkar et al. 2003; Li 2003; Li, Cheng et al. 2003; Vink, Smit et al. 2009; Benowitz 2010; Conner, Helleman et al. 2010) D'autres mécanismes génétiques, sociaux et psychologiques sont en cause, un complexe réseau de relations interdépendantes est au centre de la dépendance à la nicotine. Les dernières découvertes en génétique et en biologie moléculaire ont permis le développement relativement récent d'un sous-domaine de l'épidémiologie, l'épidémiologie génétique du tabagisme. (Calafell and Malats 2003; Kaprio 2009)

Bref, en dépit du déclin constant du taux de tabagisme observé au Canada, la minorité de jeunes fumeurs qui persévère constitue le cœur du problème. Il y a un besoin réel de mieux comprendre et de décortiquer les déterminants du tabagisme dans le but d'informer et de guider le développement d'interventions et de politiques de santé publique efficaces. Une forte composante génétique semble faire partie du portrait, mais la littérature sur le sujet est difficile et complexe. Beaucoup de résultats ne sont pas répliqués à cause de problèmes méthodologiques. Parmi eux, on recense le manque de spécificité et les mesures déficientes des phénotypes, en plus de la variabilité des phénotypes observés dans les études.

## 2. Revue de littérature

### 2.1 Revue des facteurs de risque génétiques associés au tabagisme

Une définition classique de l'épidémiologie est la suivante: «L'épidémiologie est l'étude de la distribution et des déterminants des états de santé ou des événements de santé dans une population délimitée et l'application de cette étude au contrôle des problèmes de santé.» (Last 2008) Elle s'intéresse d'abord et en premier lieu aux populations et cherche à comprendre les mécanismes qui influencent la santé au sein des populations (Kaprio 2009; Kaprio 2000; Calafell and Malats 2003) La génétique quant à elle s'intéresse aux mécanismes biologiques et héréditaires des mécanismes causant les maladies. (Calafell and Malats 2003) L'étude des gènes est au centre des préoccupations des généticiens. (Calafell and Malats 2003) Le développement des connaissances en génétique a permis l'exploration des mécanismes épigénétiques, soit les changements dans l'expression des gènes causés par des mécanismes autre que des changements au génome. L'apport des gènes au développement biologique des individus, de la conception jusqu'à la naissance, est indéniable. (Calafell and Malats 2003; Haga 2010) Cependant, les variations génétiques sont également au centre de mécanismes biologiques et de certaines maladies qui ne sont pas congénitales. Le cas du tabagisme et des phénotypes qui y sont associés n'est pas un cas exceptionnel, les variations génétiques au sein des populations sont susceptibles d'avoir un impact phénotypique significatif. (Kaprio 2009)

L'épidémiologie génétique combine donc deux éléments clés; l'étude des gènes et de l'environnement dans l'étiologie des maladies et une approche populationnelle. Cette discipline cherche donc à résoudre l'architecture génétique d'un phénotype ou de la manifestation clinique d'une pathologie. Elle s'intéresse aux mécanismes génétiques sous-jacents qui ont un impact sur le phénotype des individus. (Last 2008; Ray, Schnoll et al. 2009; Shin, Kayser et al. 2009) L'étude de la variation génétique est à la base de l'épidémiologie génétique, les différences interindividuelles associées à la génétique des individus sont quantifiables à l'aide d'outils épidémiologiques et statistiques. (Malats and Calafell 2003) Lors de l'étude

es gènes, il est important de ne pas oublier l'apport de l'environnement sur le génome, car l'apport de l'environnement sur le développement des gènes est important pour l'étiologie de plusieurs maladies. (Conner, Hellemann et al. 2010; Javaras, Hudson et al. 2010) Ainsi, l'épidémiologie génétique s'intéresse aux variations génétiques dans un contexte particulier, d'où l'importance de l'épidémiologie comme discipline primaire qui tient compte de l'aspect populationnel et environnemental lors de l'étude des déterminants de santé. (Khoury 1999)

L'architecture génétique des comportements tabagiques est un domaine de la recherche qui a connu un essor récent, notamment grâce aux avancées technologiques permises par les nouvelles découvertes génétiques. (Kaprio 2000) L'épidémiologie génétique du tabagisme a permis de révéler que plusieurs voies neurales sont associées à la dépendance à la nicotine. Également, plusieurs processus métaboliques de la transformation et de la détoxification de la nicotine sont également associés à des polymorphismes génétiques. (Mansvelder and McGehee 2002; Li 2003; Swan and Lessov-Schlaggar 2009) Ces efforts mènent à une meilleure compréhension de plusieurs mécanismes, alors que la recherche en génétique a permis de mettre à jour l'implication de gènes autrefois insoupçonnés. (Benowitz 2010; Hartz and Bierut 2010)

## 2.2 Explications des concepts en génétique moléculaire

### 2.2.1. ADN

Les gènes et ses mécanismes de régulation forment une petite partie du matériel génétique qui est encodé sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN). (Alberts 2002) Le matériel génétique contient des régions qui seront conservées et éliminées lors d'un processus appelé «épissage». Plusieurs régions régulatrices parsèment le génome et contribuent également au processus de transcription. Les régions conservées se nomment des exons, alors que les régions éliminées se nomment introns. L'information transcrite en protéine provient majoritairement des exons. (Alberts 2002)

### 2.2.2. Bases

Les gènes sont codés par des nucléotides. Les quatre nucléotides présents dans l'ADN sont la guanine, l'adénosine, la thymine et la cytosine. Les nucléotides sont composés d'un groupement phosphate, d'un sucre à cinq atomes de carbone et d'une base azotée. (Alberts 2002) Le matériel génétique doit être lu selon un ordre précis lors du processus de synthèse protéique. Le brin d'ADN est habituellement situé dans le noyau cellulaire alors que la synthèse a lieu à l'extérieur de celui-ci. (Alberts 2002) L'ADN nucléaire n'est pas mobile et doit donc être répliqué par la cellule. Dans un premier lieu, l'ADN est traduit en un deuxième composé organique, l'acide ribonucléique (ARN). (Alberts 2002) L'information contenue par l'ADN est répliquée sur un deuxième brin, celui-ci mobile et prêt à être utilisé par la machinerie cellulaire. Ce brin d'ARN est presque en tout point semblable au brin d'ADN originel, sauf pour le remplacement des nucléotides de thymine par de l'uracile. L'information contenue sur le brin d'ARN est ensuite transcrite lors de la synthèse protéique. Un groupe de trois nucléotides contigus sur le génome forme un ensemble appelé «codon». Les codons sont spécifiques à des acides aminés. (Alberts 2002) La famille des acides aminés est composée de 22 acides aminés et toutes les protéines sont un assemblage d'acides aminés. (Alberts 2002)

### 2.2.3. Polymorphismes nucléotidiques

Parmi les principaux éléments qui expliquent la variation génétique interindividuelle figurent les polymorphismes nucléotidiques (single-nucleotide polymorphism). (Stankiewicz and Lupski 2010) Environ 80% des différences au niveau des chromosomes homologues sont expliquées par les polymorphismes, la majorité de la variabilité génétique interindividuelle naît de ces polymorphismes nucléotidiques. (Carlson 2008) Ces éléments sont des mutations causées par la substitution d'un nucléotide par un autre nucléotide et qui sont présentes chez une minorité quantifiable d'humains. Ces différences dans le bagage génétique d'un individu causent parfois des variations phénotypiques. (Alberts 2002) Certains polymorphismes nucléotidiques peuvent coder des versions alternatives d'un enzyme,

produire une version inactive d'une protéine ou induire une coupure momentanée dans le processus de transcription des gènes. Certains polymorphismes sont en déséquilibre de liaison, linkage disequilibrium (LD). (Neale 2010) Ce phénomène se produit lorsque la substitution d'un nucléotide dans un allèle est prédictive de la substitution d'un autre nucléotide sur un autre allèle. Deux polymorphismes sont donc en corrélation, la présence d'un allèle mineur est corrélée à la présence d'un allèle mineur. (Neale 2010) En bref, un allèle en LD avec un autre allèle signifie qu'un allèle du polymorphisme X est souvent présent chez la plupart des porteurs d'un allèle précis sur un polymorphisme Y. Nous avons donc besoin de génotyper qu'un seul des polymorphismes pour déterminer la variabilité génétique d'un autre polymorphisme. Les tagSNPs sont des polymorphismes que nous identifions et génotypons dans le but de quantifier la variation génétique d'une manière efficace, rapide et peu coûteuse. Ces tagSNPs permettent d'avoir une bonne compréhension de la variabilité génétique présente chez un individu, tout en couvrant efficacement le gène à l'étude. (Neale 2010)

### 2.3. Méthodes en épidémiologie génétique

Une grande variété de méthodes peut être utilisée lorsque l'on cherche à confirmer la présence d'associations entre une région du génome humain et un phénotype. Les articles présentés dans la revue de littérature utilisent une ou plusieurs des techniques décrites ici-bas pour récolter l'information qui permet de tester la force d'association.

#### 2.3.1. Genome-wide association study

Les maladies chroniques sont pour la plupart déterminées par une combinaison de gènes et d'interactions gène-environnement. Les études d'association concernant plusieurs polymorphismes pointent vers un effet pléiotropique, soit la contribution d'un gène à plusieurs étiologies distinctes. (Consortium 2007) Un genome-wide association study (GWAS) cherche à découvrir des associations entre des polymorphismes et un phénotype particulier. (Consortium 2007) Pour ce faire, des plateformes contenant des sondes biochimiques sont créées. Ces plateformes

permettent de détecter la présence d'environ 500 000 ou 1 000 000 polymorphismes, selon la plateforme utilisée. (LaFramboise 2009) Le génotypage d'autant de polymorphismes dans un échantillon de participants nous permet ensuite de découvrir des associations entre les polymorphismes et des phénotypes. (Kaprio 2009) Les études de cas-témoins comparent la présence du polymorphisme chez les sujets qui présentent le phénotype étudié face à des sujets qui font office de contrôles. L'association ne nous permet pas d'inférer un lien de causalité entre la mutation génétique et le phénotype étudié. Cependant, les GWAS sont utiles dans l'élaboration d'une stratégie d'analyse par gène candidat ultérieur ou dans le but de mettre à jour la liste des gènes possiblement impliqués dans le développement du phénotype. Un des avantages de cette technique est qu'elle ne requiert pas de connaissances préalables des gènes impliqués dans l'étiologie de la pathologie étudiée. (Consortium 2007)

Le concept de déséquilibre de liaison est le tenant central de ces analyses, il permet de quantifier la force de l'association entre un locus génétique et un phénotype. Ce type d'analyse permet d'économiser les ressources humaines et techniques nécessaires à une étude d'épidémiologie génétique, puisque des groupes de polymorphismes sont corrélés entre eux et les populations génétiques sont parfois stratifiées. Cette méthode permet d'associer un locus entier à un phénotype, il est parfois difficile d'établir s'il existe une association entre un polymorphisme particulier et le phénotype d'intérêt. (Neale 2010) Pour cette raison, cette méthode peut être utilisée dans le cadre d'études exploratoires, lorsque l'on désire étudier les relations possibles entre une multitude de gènes et un phénotype d'intérêt.

### 2.3.2. Approche du gène candidat

L'approche par gène candidat consiste à analyser les associations entre les polymorphismes localisés sur un gène que l'on soupçonne impliqué dans l'étiologie d'une pathologie par rapport aux phénotypes de cette pathologie. (Munafo and Johnstone 2008; Dattani 2009) Une connaissance préalable de l'étiologie génétique de la pathologie étudiée est nécessaire dans le but d'établir la liste de gènes à génotyper, les analyses GWAS sont utiles à cette fin. L'approche par gène candidat

étudie donc la fréquence allélique de gènes candidats préalablement identifiés en fonction des phénotypes étudiés. L'avantage de cette approche est que l'on peut mieux quantifier la variation génétique d'un ou de plusieurs gènes, en sélectionnant des polymorphismes représentatifs de la variance interindividuelle. Lorsque l'on détecte des associations statistiquement significatives, cela nous permet de mettre en avant l'apport probable d'un allèle avec un phénotype, ce qui pave la voie aux études fonctionnelles ou biochimiques. (Dattani 2009)

### 2.3.3. Statistiques appliquées en génétique

#### 2.3.3.1. Fréquence des allèles mineurs

Les polymorphismes qui se retrouvent dans le matériel génétique peuvent être non synonymes, c'est-à-dire responsable de la substitution d'acides aminés lors de la transcription, alors que les polymorphismes synonymes n'entraînent pas de changements biochimiques. Cependant, de plus en plus de preuves scientifiques nous amènent à penser que les polymorphismes synonymes sont également associés à des phénotypes, par des mécanismes fonctionnels autres que le changement d'un acide aminé par un autre. (Hunt, Sauna et al. 2009) Une fréquence d'allèle mineur supérieure à 5% est souvent considérée comme un seuil minimum à respecter lors de l'identification des polymorphismes. (Crawford, Akey et al. 2005) Cependant, une revue de polymorphismes provenant d'allèles peu communs (<5%) nous informe que ces polymorphismes peuvent aussi faire l'objet d'association avec des phénotypes, d'autant plus que ces polymorphismes peuvent être communs (>5%) dans certaines populations spécifiques. (Panagiotou, Evangelou et al. 2010) Une plus grande puissance statistique est nécessaire pour détecter les associations liées aux variantes rares. Même si des techniques comme Sequence Kernel Association Test (SKAT) ou EREC sont plus adaptées lorsque l'on analyse des variantes rares (Bacanu, SA., Nelson, MR. et al. 2012), nous avons décidé de nous concentrer sur l'analyse des variantes dont la fréquence de l'allèle mineur est supérieure à 5% puisque nous n'avons pas une puissance élevée et des calculs complexes de niveaux plus avancés sont requis

### 2.3.3.2. Association génétique

Les études d'associations communes ne sont pas conçues pour détecter les associations avec des variantes peu communes (<5%), principalement pas manque de puissance ou le manque d'une banque de données répertoriant les variantes rares au sein de ces populations. (Gorwood, Le Strat et al. 2012) Il est donc nécessaire d'utiliser des méthodes spécifiques, par exemple collapser toutes les variantes rares d'un polymorphisme en une seule variable. (Asimit et Zeggini 2010) L'utilisation de familles complètes pour contrôler le linkage des polymorphismes permet de contrôler la stratification dans la population à l'étude, ce qui nous permet de mieux identifier les variantes rares. (Ott, Kamatani et al. 2011) De plus, la montagne de données récoltées lors de GWAS ne tient pas en compte le type de mutations causées par les polymorphismes. Identifier la cause d'une maladie n'est pas aisé, car les GWAS détectent les associations, sans égard à la causalité. (Kingsley 2011) Il faut donc coupler ces GWAS à des recherches sur la fonctionnalité des polymorphismes, leurs effets biochimiques et leur position sur des séquences codantes du génome.

## 2.4 Associations avec les gènes CHRN

### 2.4.1 Mécanismes physiologiques et neuronaux des récepteurs nicotiniques

La neurobiologie de la dépendance à la nicotine est un phénomène complexe dans lequel le système limbique occupe une place importante. (Dwyer, McQuown et al. 2009; Hartz et Bierut 2010; Iwahashi et Aoki 2009; Nestler 2005) La modulation de la libération de dopamine est complexe et plusieurs types de sous-unités des nAChRs sont en action. (Changeux 2010; Stice et Dagher 2010) La nicotine pénètre dans le système sanguin principalement par le biais des voies aériennes, typiquement lorsqu'un individu consomme une cigarette ou un produit du tabac. (Yanbaeva, Dentener et al. 2007) Lorsque la nicotine se lie aux récepteurs localisés sur les neurones du réseau de la récompense, il fait passer les neurones d'un état tonique à un état phasique. (Wanat, Willuhn et al. 2009) Le neurone, qui libérait ses neurotransmetteurs en phase continue, à petites doses, passe donc en mode phasique, soit une libération massive et transitoire de neurotransmetteurs. (Wanat, Willuhn et al.

2009) L'afflux de cations  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Ca}^+$  dans la cellule entraîne une polarisation du neurone et provoque l'ouverture de canaux à calcium voltage-dépendent. (Changeux 2010) En modifiant l'état d'excitabilité du neurone, le nAChR module indirectement la libération de neurotransmetteurs. La libération transitoire d'une grande quantité de neurotransmetteurs, comme la dopamine (DA), provoque des effets physiologiques importants associés aux mécanismes de la dépendance. (Mineur and Picciotto 2008) De plus, la nicotine active d'autres réseaux nerveux ailleurs dans le cerveau, particulièrement les neurones glutaminergiques qui originent dans le cortex préfrontal et qui synapsent sur les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Cela résulte en une potentialisation de l'effet physiologique des neurones dopaminergiques et une augmentation de la quantité de dopamine libérée. (Benowitz 2009; Ray, Schnoll et al. 2009; Benowitz 2010)

Les récepteurs cholinergiques nicotiques (nAChR) sont un type de canal à ions modulé par un ligand. (Grady, Drenan et al. 2010) Il s'agit d'un des types de protéine membranaire allostérique parmi les plus étudiés. (Changeux 2009; Changeux 2010) Les sous-unités qui les composent s'assemblent pour former un complexe pentamérique. Ces complexes peuvent moduler l'échange de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Ca}^+$ , selon la composition de leurs sous-unités. (Mansvelder et McGehee 2002) Une douzaine de gènes codent les sous-unités présentes dans les récepteurs cholinergiques nicotiques humains. (Portugal et Gould 2008) L'agencement spécifique de différents types de sous-unités apporte une variabilité des récepteurs et détermine leurs propriétés pharmacologiques, tel que la spécificité pharmacologique, la sélectivité ionique et la cinétique de désensibilisation. (Mineur et Picciotto 2008) La composition des récepteurs a donc un effet direct sur la spécificité des récepteurs, certaines sous-unités possèdent des caractéristiques biochimiques qui influencent sa spécificité. (Rucktooa, Smit et al. 2009) Le mécanisme de renforcement de la dépendance et de cessation tabagique est influencé par les différences structurelles des récepteurs ainsi que par l'expression des récepteurs. (Gotti, Clementi et al. 2009) Ces récepteurs se situent à la fois dans le système nerveux central et le système nerveux périphérique et sont surtout localisés sur la région présynaptique et préterminale des neurones de la VTA.

(Changeux 2009; Mansvelder and McGehee 2002) Les sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha_2$ -  $\alpha_{10}$ ) et  $\beta$  ( $\beta_2$  —  $\beta_4$ ) sont présentes dans le cerveau mammalien. (Schlaepfer, Hoft et al. 2008; Changeux 2009) Chez les humains, le sous-groupe de récepteurs formés par les sous-unités  $\alpha_4$  et  $\beta_2$  est le plus fréquemment exprimé dans le cerveau, ce récepteur  $\alpha_4\beta_2$  est le récepteur qui se trouve en plus grande quantité dans le cerveau humain. (Dwyer, McQuown et al. 2009)

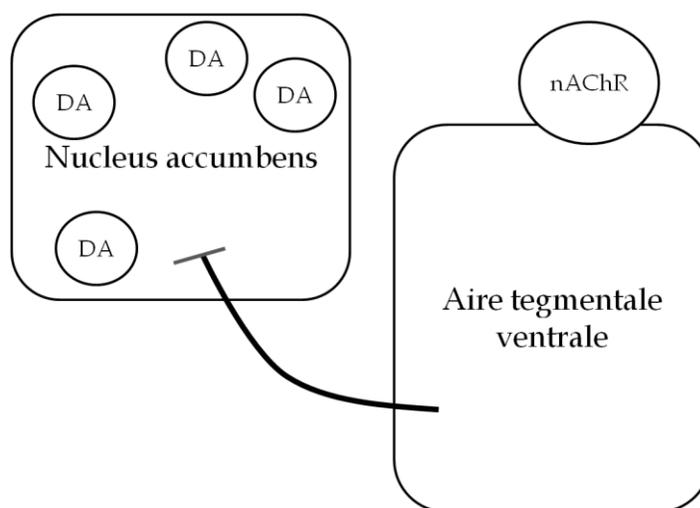


Figure 1. Représentation graphique du circuit mésolimbique, un réseau neuronal impliqué dans le circuit de la récompense. (DA : dopamine)

L'augmentation de la quantité de DA stimule le réseau neural de la récompense. (Mansvelder, De Rover et al. 2003; Hartz and Bierut 2010) Cependant, cette stimulation passagère du système limbique n'est pas permanente, un phénomène de tolérance survient rapidement lorsque l'organisme réagit face à la stimulation des neurones. Les neurones réagissent en augmentant la quantité de récepteurs à leur

surface ou en diminuant la quantité de DA libérée. (Kelley 2002; Mansvelder, De Rover et al. 2003; Benowitz 2009) Ce phénomène de tolérance est à la base des symptômes de sevrage, car les niveaux de DA normaux ne sont plus suffisants pour activer le réseau de la récompense. Au même moment, l'exposition chronique à la nicotine sensibilise les neurones du système dopaminergique et cet état persiste après la cessation de la prise de nicotine. (Kelley 2002; Mansvelder and McGehee 2002; Nestler 2005) Ce phénomène semble expliquer les fortes envies de fumer (cravings) et les rechutes associées à la cessation tabagique. (Mooney et Sofuoglu 2006)

#### 2.4.2 Recension des études épidémiologiques

Plusieurs polymorphismes nucléotidiques situés sur les gènes de la famille CHRN ou dans leur zone régulatrice sont associés avec des phénotypes relatifs à la dépendance à la nicotine. (Saccone, Schwantes-An et al. 2010; Stevens, Bierut et al. 2008; Voineskos, De Luca et al. 2007) Plusieurs autres associations sont rapportées entre plusieurs gènes de la famille CHRN et une grande variété de phénotypes. Les principales études qui concernent les polymorphismes nucléotidiques des gènes CHRN sont décrites dans la sous-section suivante. Nous avons répertorié les écrits épidémiologiques concernant l'initiation, la dépendance et la cessation, avec une attention particulière pour les articles décrivant des phénotypes d'initiation au tabagisme. Une compréhension des mécanismes de l'initiation au tabac peut donc faciliter la prévention de la progression vers la dépendance au tabac. Les détails des études révisées qui concernent l'initiation à la nicotine sont présentés à l'annexe 1.

Plusieurs dizaines de gènes sont soupçonnés de moduler l'effet et l'impact de la dépendance à la nicotine. (Benowitz 2010; Changeux 2009; Hartz and Bierut 2010; Laucht, Becker et al. 2008; Munafo and Johnstone 2008; Swan and Lessov-Schlaggar 2009) Les évidences épidémiologiques pointent vers leur action dans l'initiation et l'entretien de la dépendance à la nicotine chez l'être humain.

La revue de la littérature a été faite au début du projet de recherche. Premièrement, une recherche d'articles sur PubMed à l'aide de plusieurs mots-clés a permis l'identification de plusieurs articles pertinents. La sélection a été restreinte aux

articles en français et en anglais, de plus, dans le but d'exclure les résumés et les sources de données incomplètes, seuls les articles complets et archivés ont été téléchargés. Les mots-clés suivants ont été utilisés: «SNP», «nicotinic cholinergic receptor», «polymorphisms», «cigarette», «CHRN\*», «adolescent». Nous avons utilisé plusieurs combinaisons de mots-clés, tel que SNP AND nicotinic cholenergic receptor, ou bien CHRN AND polymorphism. Puis, dans le but d'élargir le nombre d'articles retenus, les résumés concernant des populations adultes ont également été retenus. Plusieurs articles additionnels ont été identifiés par des coauteurs et sont inclus dans la revue de la littérature. Nous avons également mis à jour la recension des écrits lors de l'analyse des données et de la rédaction du mémoire.

Suite à ces recherches bibliographiques, 202 résumés ont été téléchargés puis lus. De ce nombre, seulement 55 rapportaient des informations sur des gènes impliqués dans le tabagisme. 19 de ces résumés contenaient des informations génétiques se rapportant à des gènes autres que les CHRN. La recension des écrits finale comporte 36 références qui rapportent des informations utiles pour ce projet. On retrouve les études en Annexe 1.

#### 2.4.2.1. CHRNB2

Une étude de gène candidat a trouvé une association entre un polymorphisme (rs2072661) localisé dans la région UTR (untranslated region) 3' et la cessation tabagique grâce à une étude clinique randomisée sur l'utilisation du Bupropion<sup>md</sup> chez des participants d'origine européenne. Des associations significatives pour l'abstinence à la fin du traitement et après une période de suivi de 6 mois se sont révélées présentes dans cet échantillon. (Conti, Lee et al. 2008) Également, dans une autre étude de type cross-over (croisée, administration du placebo et du composé en alternance), les associations entre ce polymorphisme et le temps de rechute et les symptômes de sevrage sont significatifs, ainsi que l'association entre la cessation à court terme à l'aide de timbres transdermiques et ce polymorphisme chez un groupe d'origine européenne est statistiquement significative. (Conti, Lee et al. 2008; Perkins, Lerman et al. 2009) Également, un polymorphisme (rs2072658) de la région

5' UTR semble être associé aux symptômes subjectifs précoces dans un échantillon multiethnique de jeunes adultes américains. (Ehringer, Clegg et al. 2007) Deux autres études portant sur une multitude de polymorphismes localisés sur CHRN2 ou ses régions environnantes n'ont pas trouvé d'associations significatives avec le niveau de dépendance ou les habitudes tabagiques. (Lueders, Hu et al. 2002; Etter, Hoda et al. 2009)

#### 2.4.2.2. CHRN3

Des associations avec le nombre d'essais d'arrêt tabagique et quatre polymorphismes (rs7004381, rs4950, rs13280604 et rs4953) ont été observées dans une cohorte nord-américaine ethniquement représentative de fumeurs, en plus d'associations avec la dépendance à la nicotine chez trois de ces mêmes polymorphismes (rs4953 exclus). (Hoft, Corley et al. 2009) Une autre étude a trouvé une association très significative entre trois polymorphismes de ce récepteur, rs4950, rs4953 et rs13280604, et plusieurs types de réponses précoces subjectives dans un échantillon représentatif de la population américaine. (Zeiger, Haberstick et al. 2008) Pour ajouter à ce résultat, une autre étude cas-témoin chez des fumeurs et non-fumeurs américains de descendance européenne révèle une association très significative suite à des analyses de régression entre près d'une dizaine de polymorphismes et un étourdissement important lors de l'initiation. (Ehringer, McQueen et al. 2010) Une association entre plusieurs polymorphismes, incluant rs13277254 et rs6474413 sur CHRN3, et la dépendance à la nicotine sont également relevées dans une autre étude cas-témoin de type GWAS dans un échantillon de participants d'origine européenne, mais l'association ne résiste pas à une correction pour tests multiples. (Bierut, Madden et al. 2007) Finalement, plusieurs tests d'association entre deux polymorphismes et plusieurs catégories du phénotype de fumeurs, tels que les ex-fumeurs ou les fumeurs légers, ne révèlent également aucune associations significatives dans une étude transversale de fumeurs quotidiens d'origine européenne. (Etter, Hoda et al. 2009)

#### 2.4.2.3. CHRNA6

Plusieurs polymorphismes de ce récepteur sont associés à la dépendance à la nicotine. Une autre étude révèle des associations entre un polymorphisme, rs2304297, de ce gène et les réponses positives à la nicotine, résultat répliqué dans une cohorte caucasienne et également dans l'échantillon complet (caucasien, hispanique et afro-américain) représentatif de la population nord-américaine. (Zeiger, Haberstick et al. 2008) Ce gène forme un cluster (groupe de gènes) avec le gène CHRNA3. Une association avec le nombre d'essais d'arrêt tabagique et un polymorphisme, rs2304297, a été observé dans une cohorte ethniquement représentative de fumeurs nord-américains, ainsi qu'une association avec la dépendance à la nicotine. (Hoft, Corley et al. 2009) Par contre, une autre étude cas-témoin chez des fumeurs et non-fumeurs américains de descendance européenne n'a pas révélé d'associations entre des polymorphismes localisés sur ou en périphérie de CHRNA6 et une réponse marquée d'étourdissement lors de l'initiation. (Ehringer, McQueen et al. 2010)

#### 2.4.2.4. CHRNA5

Un groupe de cinq polymorphismes, incluant rs16969968 est associé à un risque plus élevé d'être un grand fumeur, selon une étude de cohorte chez des grands fumeurs américains et une seconde étude qui visait le polymorphisme rs16969968 localisé dans le locus 15q25. (Lips, Gaborieau et al. 2010; Stevens, Bierut et al. 2008) Une autre étude chez des caucasiens américains associe ce gène à l'expérimentation d'une sensation plaisante lors de la première cigarette, ainsi qu'au statut de fumeur. (Sherva, Wilhelmsen et al. 2008) Une étude clinique randomisée concernant l'utilisation du Bupropion<sup>md</sup> chez des fumeurs américains a révélée, entre autre, une association significative entre rs871058 et la réussite suite à l'utilisation du traitement au Bupropion<sup>md</sup>. Malheureusement, ces associations ne survivent pas à un contrôle pour tests multiples et deviennent alors non-significatives. (Heitjan, Guo et al. 2008) Ensuite, une méta-analyse de type GWAS des polymorphismes de ce locus révèle une association très significative avec la quantité de cigarettes fumées. (Liu, Tozzi et al. 2010) Cependant, le statut de fumeur n'a pas pu être associé à aucun polymorphisme

localisé sur ce gène lors d'une étude transversale chez des participants fumeurs quotidiens de descendance européenne. Pourtant, une étude cas-témoin américaine confirme l'association entre rs16969968 et l'état de dépendance à la nicotine dans un échantillon d'américains de descendance européenne et africaine. (Saccone, Wang et al. 2009) Ce même résultat est confirmé par une méta-analyse des résultats de trois échantillons européens variés (Berrettini, Yuan et al. 2008), ainsi que par seconde étude cas-témoin utilisant un échantillon d'américains de descendance européenne et un échantillon australien d'origine européenne. (Saccone, Hinrichs et al. 2007) Également, une étude transversale réalisée à l'aide de plusieurs échantillons de fumeurs réguliers de descendance européenne confirme les associations entre rs16969968 et la dépendance à la nicotine. (Chen, Chen et al. 2009) Finalement, un polymorphisme particulier relevé par plusieurs études antérieures, rs16969968, est la cible de plusieurs études fonctionnelles et épidémiologiques, les résultats pointent vers une association significative de ce polymorphisme et plusieurs phénotypes tels que la dépendance à la nicotine, un risque de rechute élevé et le cancer du poumon, entre autre. (Hartz and Bierut 2010)

#### 2.4.2.5. CHRNA7

Ce gène est étudié par beaucoup d'études qui se penchent sur les polymorphismes associés à la schizophrénie et à la maladie d'Alzheimer. (Xu, Pato et al. 2001; Gault, Hopkins et al. 2003; De Luca, Wong et al. 2004) Chez un groupe de schizophrènes blancs du Royaume-Uni, un polymorphisme localisé en 3' UTR de CHRNA7 est faiblement associé à une consommation précoce de tabac dans une étude cas-témoin. (Zammit, Spurlock et al. 2007) Une étude transversale chez des schizophrènes canadiens a révélé une association entre un marqueur de ce gène et le risque de fumer. (De Luca, Wong et al. 2004) Une seconde étude du même groupe de recherche canadien, cette fois chez des participants souffrant de troubles de l'attention avec hyperactivité, n'a révélé aucune association entre ce gène et le statut de fumeur. (Manchia, Viggiano et al. 2010) La dépendance à la nicotine n'est que faiblement associée à ce gène (rs6494212) dans une étude cas-témoin de fumeurs présents ou passés, nicotine-dépendants ou non, mais seulement dans le sous-échantillon de

participants d'origine afro-américaine. (Saccone, Schwantes-An et al. 2010) Finalement, une étude cas-témoin a révélé une association entre rs8028396 et le statut de fumeurs autant que les contrôles sains que dans le groupe de participants schizophrènes. (Stephens, Franks et al. 2012)

#### 2.4.2.6. CHRNA3

Une faible association entre la dépendance à la nicotine et rs1051730 a été trouvée dans une étude de cohorte de fumeurs ou souffrant de troubles neurotiques, par contre cette association n'est présente que dans le sous-échantillon formé par les participants afro-américains. (Chen, Chen et al. 2009) Plusieurs autres études révèlent une association avec la dépendance à la nicotine chez des Américaines d'origine européenne, où rs578776 est un prédicteur de la variance phénotypique dans la première étude et où quatre polymorphismes sont associés à une augmentation ou une baisse du risque d'être dépendant à la nicotine dans la deuxième étude. (Saccone, Wang et al. 2009; Stevens, Bierut et al. 2008) Ce gène fait partie d'un groupe de trois gènes liés (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4). Un ensemble de polymorphismes de ce groupe de gènes est associé à un risque plus élevé d'être un grand fumeur. (Mooney and Sofuoglu 2006) Une étude cas-témoin américaine confirme l'association entre rs578776 et l'état de dépendance à la nicotine dans un sous-échantillon d'Américains de descendance européenne, sans toutefois trouver la même association dans le sous-échantillon de participants d'origine afro-américaine. (Saccone, Wang et al. 2009) L'âge de l'initiation et l'âge à la première cigarette sont tout deux associés à un polymorphisme, rs8023462, localisé sur CHRNA3, dans un échantillon multiethnique américain. (Schlaepfer, Hoft et al. 2008)

#### 2.4.2.7. CHRNA4

Une étude sur les associations entre le groupe de gène CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 et la dépendance à la nicotine n'a pas révélé de polymorphismes localisés sur CHRNA4 directement associés à ce phénotype au sein d'un échantillon américain de fumeurs nicotine-dépendant ou non. Cependant, la variation entre ces 3 gènes est faiblement associée à ce phénotype, ce qui nous permet de penser que ce groupe de

gènes contribue à l'étiologie de la dépendance à la nicotine. (Li, Xu et al. 2010) Ce groupe est cependant associé à un risque d'être un grand fumeur. (Stevens, Bierut et al. 2008) Une étude de cohorte allemande recrutant des aînés allemands n'a pas rapporté d'associations significatives entre des polymorphismes localisés sur CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 et la cessation tabagique. (Breitling, Dahmen et al. 2009) Des résultats semblables sont rapportés par les instigateurs d'une étude cas-témoin de la dépendance à la nicotine, aucun polymorphisme localisé sur CHRNA4 n'est associé à la dépendance à la nicotine. (Sherva, Kranzler et al. 2010) Deux polymorphismes sont également associés à une baisse du risque d'être dépendant et une diminution du nombre de cigarettes fumées par jour dans les sous-échantillons européens et afro-américains tirés d'une étude cas-témoins de fumeurs nicotine-dépendant ou non. (Haller, Druley et al. 2012) Un polymorphisme peu commun chez les Américains d'origine européenne, et presque inexistant dans le sous-échantillon afro-américain d'une étude de cohorte de fumeurs nicotine-dépendant ou non, est associé à la dépendance à la nicotine. Une seconde étude du même groupe révèle la présence d'une association entre rs17487223 et un plus grand risque d'être dépendant à la nicotine (Saccone, Saccone et al. 2009) Une étude américaine rapporte que rs1948 est associé à l'âge de la première consommation de tabac dans un échantillon multiethnique provenant d'une étude de cohorte étudiant les dépendances et à deux autres phénotypes, âge à la première cigarette et l'âge à l'initiation au tabagisme, dans un second échantillon représentatif de la population américaine. (Schlaepfer, Hoft et al. 2008) On rapporte aussi la présence d'associations entre plusieurs polymorphismes localisés sur CHRNA4 et la dépendance à la nicotine selon une étude de cohorte de jumeaux finlandais concordants sur leur consommation de nicotine. (Broms, Wedenoja et al. 2012)

#### 2.4.2.8. CHRNA4

Ce gène est associé à une intensification de la dépendance à la nicotine dans une étude cas-témoins de fumeurs réguliers et de contrôles jamais fumeurs sud-allemands. (Breitling, Dahmen et al. 2009) Une autre étude chez des schizophrènes blancs a révélé une association avec le risque d'être un grand fumeur. (Voineskos, De

Luca et al. 2007) Les résultats d'une étude américaine pointent vers une association avec la gravité du statut de fumeur et avec le score au test de dépendance de Fagerström (FTND). Une étude américaine sur une population ethniquement diverse n'a toutefois pas révélé d'associations avec plusieurs phénotypes, tels que les réponses subjectives ou la fréquence d'utilisation. (Ehringer, Clegg et al. 2007) Une étude cas-témoin semblable chez des fumeurs nicotine-dépendants ou non d'origine chinoise a rapporté une association entre rs2236196 et la sévérité de la dépendance. (Wei, Chu et al. 2012) Des résultats semblables sont publiés par une équipe suisse. (Etter, Hoda et al. 2009) Ce même polymorphisme est associé aux symptômes subjectifs des fumeurs dans le cadre d'une étude expérimentale, ils sont plus à risque d'expérimenter une sensation de plaisir ou d'étourdissement après une période d'abstinence d'une semaine. (Hutchison, Allen et al. 2007) Cinq polymorphiques sont nominalement associés au même phénotype dans une étude cas-témoins de participants nicotine-dépendants et non nicotine-dépendants de descendance européenne, cependant ces associations ne survivent pas aux corrections pour test multiples. (Saccone, Saccone et al. 2009) rs2236196, rs3787138 et rs2229959 sont tous associés à la dépendance à la nicotine au sein d'un échantillon multiethnique américain provenant d'une étude cas-témoin de fumeurs nicotine-dépendants ou non. (Saccone, Schwantes-An et al. 2010) Cependant, un haplotype composé de plusieurs polymorphismes s'est révélé significativement associé à un risque moins grand de dépendance à la nicotine chez des participants chinois. (Feng, Niu et al. 2004) Puis rs1044396 et rs1044397 sont associés à la dépendance à la nicotine, de plus, le premier est également associé avec l'initiation au tabagisme dans un échantillon cas-témoin de participants masculins fumeurs ou non d'origine chinoise. (Chu, Yang et al. 2011) Ensuite, rs1044394 est également associé à la dépendance à la nicotine, même après correction pour tests multiples, au sein de deux sous-échantillons d'origine européenne ou afro-américaine provenant d'une étude de cohorte américaine. (Han, Yang et al. 2011)

### 2.4.3. Résumé des évidences génétiques

Bref, même si les études épidémiologiques précédemment rapportées ne rapportent pas toujours les mêmes associations, la plupart des évidences scientifiques publiées au cours des dernières années pointent vers des associations entre les polymorphismes localisés sur ou près des gènes CHRN et des phénotypes associés au tabagisme. Pour bien des polymorphismes, la présence d'un allèle mineur est associée à un phénotype particulier, comme le démontre la recension ci-haut. Cependant, les études en épidémiologie génétique regroupent parfois des dizaines, centaines ou des milliers de polymorphismes, l'analyse de ces polymorphismes permet de révéler des associations, mais pas d'établir de lien causal. Le domaine est en croissance rapide, le nombre d'articles publiés sur le sujet des gènes CHRN est en hausse constante, particulièrement depuis les dernières deux années. Le nombre d'échantillons pour lesquels nous avons des données génétiques est en expansion, les techniques de génotypage nous permettent de génotyper des milliers de polymorphismes à faible coût et il est possible de faire des analyses secondaires en utilisant des échantillons recrutés pour d'autres études.

Malgré la multitude d'associations recensées, toutes les études n'effectuent de correction pour tests multiples, une procédure qui permet de prendre compte du nombre de tests dans le but de réduire le nombre d'artéfacts statistiques. De plus, les échantillons ne sont pas tous ethniquement homogènes. Lorsque l'on sait que certains polymorphismes ont des fréquences d'allèles très différentes en fonction de l'origine ethnique, les analyses peuvent grandement varier si l'on utilise ou non un groupe de participants ethniquement homogènes sans contrôler pour l'ethnicité. La réplication est également un problème courant en épidémiologie génétique, plusieurs polymorphismes associés à un phénotype n'ont pas fait l'objet d'études de réplication. De plus, la plupart des études utilisent des données transversales, peu ont pu analyser le développement longitudinal de la dépendance à la nicotine. De plus, les articles qui traitent de phénotypes relatifs à l'initiation à la nicotine sont moins nombreux que pour la dépendance à la nicotine ou la cessation tabagique.

## 2.5 Les phénotypes du tabagisme

Une difficulté majeure est la grande variété des phénotypes étudiés. De plus, beaucoup de phénotypes ne sont pas spécifiques. Pour cette raison, il est difficile de synthétiser les évidences statistiques. Plutôt que d'étudier des construits vagues, comme le tabagisme, nous devons nous concentrer sur des phénotypes spécifiques qui sont liés à l'initiation. Alors que la plupart des études utilisent des données phénotypiques existantes concernant la dépendance à la nicotine, peu d'études ont testé des phénotypes reliés à l'initiation à la nicotine. Pourtant, il est important d'étudier tout le spectre des phénotypes liés au tabagisme, puisque des preuves scientifiques pointent vers une intensification de la consommation de tabac chez les individus ayant rapporté avoir ressenti de fortes réponses précoces positives. (DiFranza, Savageau et al. 2004; Pomerleau, Pomerleau et al. 2005)

### 2.5.1 Phénotype d'intérêt : l'étourdissement

Le besoin de circonscrire l'initiation à certains concepts précis facilite la tâche des chercheurs, il est utile et avantageux de communiquer avec un langage commun et concis lorsqu'un phénotype aussi précis est analysé. Médicalement parlant, l'étourdissement est un phénotype vague et mal défini par les patients eux-mêmes. Souvent associé à d'autres maladies, l'étourdissement est prévalent dans toutes les populations, de 1.8% chez les jeunes adultes à 30% chez les aînés. (Sloane, Coeytaux et al. 2001) Il est divisé en quatre types: vertigo (sentiment de mouvements), presque syncope (un sentiment de perte de conscience imminente), disequilibrium (perte d'équilibre) et l'étourdissement léger non défini (un manque de concentration ou une incapacité à se concentrer). (Anderson, Yolton et al. 1995) Il s'agit d'un symptôme clinique fréquemment utilisé en clinique pour affiner le diagnostic différentiel du médecin. L'étourdissement est également défini comme un "état de trouble, d'insécurité, voisin du vertige, d'origine vasculaire ou nerveuse et pouvant prélude à la perte de connaissance." (Shiffman, Waters et al. 2004)

## 2.6 Ouvertures de la recherche

La compréhension des mécanismes génétiques sous-jacents sera utile lors de la conception de programmes de santé publique axés sur la prévention de l'initiation au tabac, la dépendance à la nicotine et l'augmentation des taux de cessation tabagique. (Stewart 2010; Williams 2010) Plusieurs spécialistes des politiques publiques ont appelé à une baisse des fonds accordés à la recherche sur la génétique des dépendances dans le but d'augmenter les budgets alloués à la prévention et au traitement des dépendances. (Haga 2010; Stewart 2010) Cependant, la compréhension des mécanismes génétiques n'est pas un exercice vain, ces résultats permettront d'économiser temps et argent, en permettant aux interventions d'adapter les interventions selon les profils de réponses des participants. (Haga 2010; Stewart 2010)

### **3. Objectif de la recherche**

L'objectif premier est de déterminer s'il y a une association entre le phénotype et le génotype. Notre phénotype d'intérêt est un symptôme subjectif, l'étourdissement ressenti lors de la première inhalation de fumée de cigarette. Notre objectif est d'évaluer les associations entre plusieurs polymorphismes génétiques et l'étourdissement ressenti à la première cigarette. Plus spécifiquement, nous évaluons les associations entre un groupe de 61 polymorphismes localisés sur les gènes CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNB2, CHRNB3 et CHRNB4 et la présence d'un symptôme d'étourdissement lors de la première inhalation de fumée de cigarette.

## **4. Méthodologie**

### 4.1. Devis de recherche

Les données proviennent d'une étude de cohorte prospective actuellement en cours. Il s'agit d'une sous-étude génétique issue d'une cohorte à devis longitudinal portant sur l'usage du tabac chez les jeunes. La première vague de questionnaires a s'est échelonnée sur une période de cinq ans, de 1999 à 2005. Ensuite, deux autres vagues de collectes de données ont été organisées pour faire suite à la collecte initiale, la première deux à trois ans après la fin du suivi initial et la deuxième cinq ans après l'étude initiale. Les questionnaires des cycles de suivi, les cycles 21 et 22, étaient légèrement différents des précédents questionnaires. Ces questionnaires nous permettent de suivre longitudinalement l'évolution de l'état de santé des participants et, surtout, suivre le développement des symptômes de dépendance à la nicotine chez les adolescents. Cet échantillon a été constitué de façon à obtenir un échantillon qui comprend des adolescents provenant de plusieurs milieux sociaux, culturels et économiques. Un soin particulier a été porté à la sélection des écoles. Elle comprend des écoles anglophones et francophones, de niveaux socioéconomiques bas, moyen ou élevé ainsi que des écoles localisées dans des zones urbaines, semi-urbaines ou rurales.

#### 4.1.1 Rationale de l'étude

L'étude NICO, nommée Nicotine Dependence in Teens Study (NDIT) en anglais, fut créée dans le but de suivre longitudinalement l'apparition des symptômes de la dépendance à la nicotine après l'initiation à la cigarette au sein d'une cohorte de jeunes adolescents. L'étude cherche également à identifier les facteurs de risques environnementaux, sociaux et génétiques du tabagisme chez les adolescents. La collecte de données initiale s'est concentrée sur une période cruciale dans le développement des individus, l'adolescence. Ensuite, l'étude permet de capturer de l'information relative à une période plus tardive dans la vie des participants. En effet,

nous voulons identifier des déterminants du tabagisme au sein de ces populations, une étude longitudinale permet d'identifier de tels prédicteurs. Le questionnaire de suivi comporte des questions semblables aux questions de l'étude initiale. Par contre, il est bonifié par l'ajout de questions relatives, entre autres, à l'état de santé des participants, l'utilisation de médicaments, la consommation de drogues ainsi que l'ethnicité ou l'identité culturelle.

#### 4.1.2. Consentement

Le consentement des parents ou du titulaire de l'autorité parentale est obtenu en début d'étude pour la collecte de données par questionnaires auto-rapportés et la collecte de sang. Le consentement (assentiment puisque mineur) du participant est obtenu au début, en plus du consentement parental. De plus, les participants du cycle 21 ont signé un consentement légal écrit lors de la période de suivi, puisque les participants ont tous atteint l'âge de la majorité légale lors de la période entre l'étude initiale et la période de suivi. La collecte de données, les échantillons de salive et la mesure de plusieurs variables anthropométriques ont donc fait l'objet d'un second certificat éthique. L'étude a obtenu un certificat d'éthique de la part du comité d'éthique de la Direction de santé publique de Montréal, du comité de revue institutionnel de la Faculté de médecine de l'université McGill ainsi que du comité d'éthique du Centre de recherche du CHUM.

#### 4.2. L'échantillon

L'échantillon est composé de 1293 jeunes québécois provenant d'un échantillon de commodité. L'échantillon rassemblé grâce à cette méthode se compare favorablement à la population adolescente québécoise de la même tranche d'âge lorsqu'on évalue les indicateurs du tabagisme. (O'Loughlin, Karp et al. 2009) Il s'agit de jeunes Québécois âgés de 12 ou 13 au moment du premier cycle d'administration du questionnaire. Les questionnaires, mesures anthropomorphiques et collecte d'échantillon de salive et de sang ont été administrés à différents moments de l'étude.

Les jeunes ont été recrutés grâce à un échantillon de commodité parmi des classes de première secondaire. Les participants proviennent d'un ensemble de 10 écoles de la région montréalaise. Ces écoles ont été choisies suite à un processus consultatif avec les commissions scolaires locales et les directeurs d'école. Cet ensemble inclut des écoles francophones et anglophones et de milieux urbains, semi-urbains et ruraux. Un soin particulier est également appliqué dans le processus de sélection de manière à choisir des écoles situées dans des milieux favorisés et défavorisés. Au total, 13 écoles ont été approchées par l'équipe de recherche, toutes ont accepté de participer à l'étude. Cependant, le taux de retour des formulaires de consentement était trop bas pour deux écoles, alors que les administrateurs de la troisième école ne pouvaient pas garantir leur participation à long terme; elles ont donc été exclues de la démarche de recrutement. (O'Loughlin, Karp et al. 2009)

Cette méthode de recrutement a permis de recruter les 1293 participants de l'étude. Le taux de participation des participants éligibles est de 55,4%. Il faut préciser qu'un conflit de travail au sein de plusieurs commissions scolaires a entraîné des refus de coopérer de la part des professeurs. Plusieurs étudiants ont également émis des inquiétudes sur la collecte de matériel génétique et n'ont par conséquent pas participé à la collecte de matériel génétique. Certains professeurs ont refusé de collecter les formulaires de consentement, une étape nécessaire lors de tels études où des mineurs font l'objet d'une collecte de données. (O'Loughlin, Karp et al. 2009) L'étude NDIT a suivi 1293 participants durant leurs études secondaires, peu importe s'ils fument ou non. Une majorité des participants (n=859) a fourni du matériel génétique lors de deux collectes d'échantillon biologique, soit une première collecte de sang et une deuxième collecte d'échantillon de salive. De plus, environ la moitié (n=702) des participants ont inhalé de la fumée de cigarette au cours du suivi. Nous avons donc un sous-échantillon de 475 participants ayant fournis du matériel génétique et ayant inhalé de la fumée de cigarette. Au final, le sous-échantillon comporte 356 participants pour lesquels nous avons des données phénotypiques, génotypiques et sur les covariables complètes. Ces 356 participants forment

l'échantillon analytique utilisé pour conduire ces analyses et la taille de l'échantillon est tout de même assez grande.

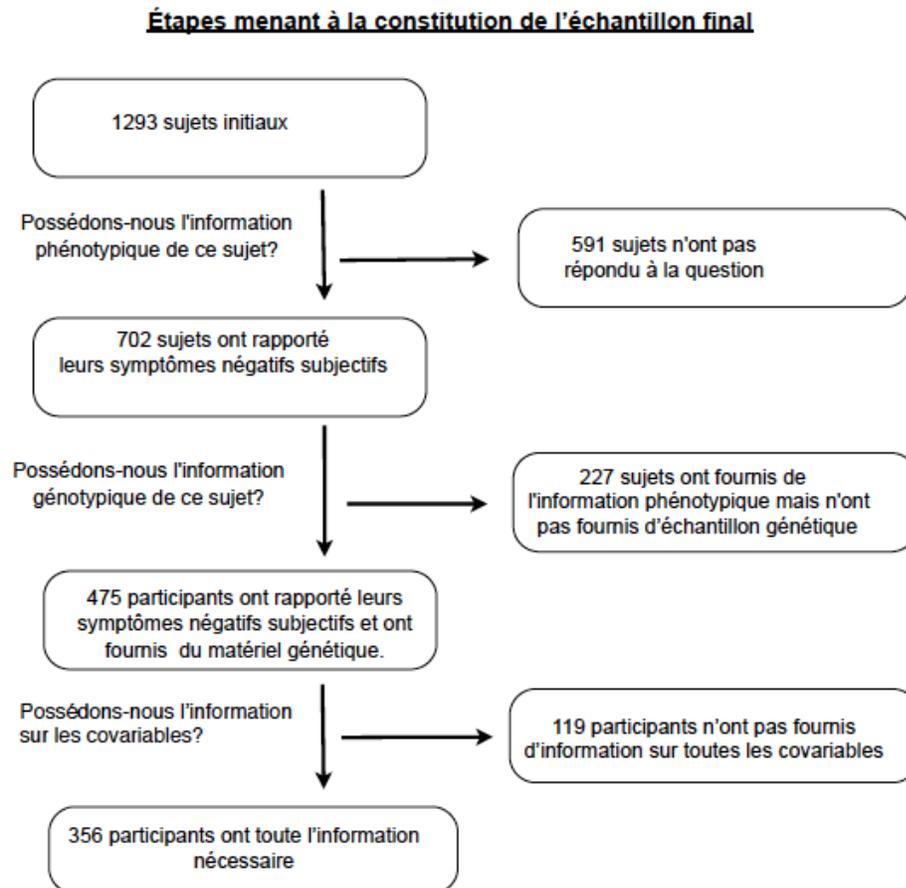


Figure 2. Étapes menant à la constitution de l'échantillon final

#### 4.3. La collecte de données

La collecte de données primaire avait pour but de récolter de l'information phénotypique dans une cohorte de jeunes adolescents sur l'apparition des symptômes de la dépendance à la nicotine après l'initiation à la cigarette. Des collectes de données subséquentes ont mené à la création d'une gamme de données phénotypiques et génotypiques plus extensive. Des techniciens qualifiés ont récolté les

questionnaires du cycle 1 sur le terrain, soit directement dans les salles de classe. Cette méthode permet de nous assurer que les participants reçoivent toute l'aide nécessaire lorsqu'ils remplissent les questionnaires et nous permet également d'expliquer les buts de l'étude, ainsi que de présenter l'équipe de recherche. Les membres de l'équipe de recherche ont donc pu rencontrer les participants au cours de multiples visites sur le terrain. De plus, les cycles 1, 12 et 19 ont également fait l'objet d'un protocole particulier dans le milieu scolaire du participant, puisqu'ils incluent une collecte de données anthropométriques.

Deux cycles supplémentaires, ont eu lieu par la suite, le premier environ deux ou trois ans après la fin de l'étude principale et le second environ 5 ans après l'étude initiale. Ces cycles supplémentaires permettent de récolter des informations sur l'état de santé des participants, maintenant devenus de jeunes adultes, leurs habitudes tabagiques ainsi qu'une foule de données. Certaines variables sont présumées constantes chez tous les participants et n'ont donc été collectées qu'une seule fois. Certaines variables sont capturées par des questions additionnelles, qui ont été posées de manière ponctuelle.

#### 4.3.1 Données sociodémographiques

Les questionnaires de suivi ont ensuite été collectés quatre fois par année scolaire au cours d'une période de cinq ans. Les participants ont fournis des informations sur leurs caractéristiques sociodémographiques à plusieurs reprises au cours de cette période. Certaines variables qui ne varient pas dans le temps, tels que le genre et la date de naissance, ne sont demandées qu'au cours des premiers cycles de l'étude. Nous avons récolté d'autres données sociodémographiques au cours des cycles 21 et 22. L'ethnicité, par exemple, a fait l'objet d'une question dans le questionnaire du cycle 21.

#### 4.3.2 Données phénotypiques

Les symptômes de dépendance physiologique à la nicotine, les habitudes tabagiques et les symptômes de sevrage font l'objet d'une attention particulière, plus de 40 questions concernent ces concepts. Le phénotype d'intérêt de cette analyse est l'étourdissement, ce qui nous permet d'étudier les associations entre les symptômes subjectifs négatifs et positifs ressentis lors de l'expérimentation avec la cigarette et le génotype. Les participants ont été invités à décrire leurs symptômes subjectifs négatifs ressentis lors de l'initiation à la cigarette lors de chaque cycle de l'étude initiale. Les données sont recueillies au début de l'étude, dans le cas des participants ayant expérimenté avant le début de l'étude, ou lors de la collecte de données suivant l'épisode d'expérimentation avec la cigarette. L'information phénotypique provient donc d'une récolte rétrospective ou prospective, selon le moment de l'expérimentation avec le tabac.

#### 4.3.3 Données génétiques

Le matériel génétique provient de deux collectes de données différentes, afin d'augmenter le nombre d'échantillons disponibles. Premièrement, des prélèvements sanguins effectués lors du cycle 9 nous permettent d'extraire du matériel génétique provenant une importante minorité de participants. Nous avons récolté 523

échantillons de sang alors que 561 participants ont fourni le formulaire de consentement parental requis. Deuxièmement, les questionnaires du cycle 21 étaient accompagnés d'un kit de prélèvement de salive. Ces prélèvements de salive devaient ensuite être envoyés à l'équipe de recherche par la poste. Suite à cet effort, nous avons récolté des échantillons de salive provenant d'un deuxième groupe distinct de 336 participants. Le génotype des participants est ensuite déterminé grâce à un génotypage sélectif. Au total, un sous-échantillon de 859 participants peut être inclus dans nos analyses. Ces échantillons de matériel génétique sont congelés, puis le génotypage et les analyses génétiques sont effectuées par une équipe spécialisée, Génome Québec. Dans le cas de l'étude génétique de la variation allélique des gènes nAChR, seul le génotype de 356 participants qui ont initié une consommation de tabac durant la période de l'étude est inclus dans notre analyse. Nous avons choisi de génotyper 325 polymorphismes localisés sur ou en périphérie (10 kb en amont ou en aval du gène) de 23 gènes. Les plaques comprenaient également d'autres gènes associés à des phénotypes tels que l'obésité, pour un total de plus de 325 polymorphismes. Cette analyse s'inscrit dans le cadre d'une plus grande étude dans laquelle nous avons génotypé plusieurs autres gènes. La présente analyse n'utilise que l'information relative aux gènes de la famille CHRN, les gènes codant les récepteurs cholinergiques nicotiques. Les génotypes dérivés des 66 polymorphismes à l'étude ont ensuite été transformés de manière à pouvoir faire des analyses statistiques, nous avons regroupé les 2 allèles par participant en une seule variable, soit une variable pour chacun des polymorphismes. Nous avons ensuite calculé la fréquence d'allèle mineur et le nombre d'allèle mineur pour chacun des polymorphismes. Ces variables ont ensuite été utilisées pour les analyses statistiques.

#### 4.3.3.1 Extraction de l'ADN

Un kit Qiagen (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) numéro 29104 et 29106 permet d'extraire le matériel génétique à partir d'échantillons sanguins. 400 microlitres de sang est transféré dans un tube Eppendorf et mélangé à 50 mL de solution Proteinase

et 400 microlitres de solution buffer AL. L'échantillon est incubé pendant 10 min à 70 C après un mixage par vortex. Un volume de 420 microlitres d'isopropanol 100% est ensuite ajouté et mélangé par vortex. Le liquide est ensuite transféré dans un tube à essai contenant une colonne de rotation avant d'être centrifugé à 8 000 rpm pendant 1 minute. Un volume de 500 microlitres de buffer AW permet de purger la colonne pour ensuite la centrifuger à 12 000 rpm pendant 3 minutes. La colonne est alors transférée dans un nouveau tube Eppendorf, puis éluée avec 40 microlitres de buffer AE à 70 C. Une dernière incubation de 1 minute à 70 C précède une centrifugation à 8 000 rpm pendant 1 minute. La colonne est éluée par 40 microlitres de buffer AE et centrifugée une dernière fois à 8 000 rpm pendant 1 minute. L'extraction de l'ADN et le génotypage a été effectué par une équipe du Centre d'innovation McGill - Génome Québec. Les participants ont soumis un échantillon de salive sur un disque Oragene (DNA Genotek Inc, Kanata, Canada). L'échantillon est incubé durant une nuit à 50 C. Un échantillon de 500 microlitres est ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Une solution purifiante Oragene est ajoutée avant d'être mélangé par inversion et incubé sur glace pendant 10 minutes. Une centrifugation à 13 000 rpm pendant 3 minutes permet de séparer le supernatant, la couche supérieure, et de le transférer dans un tube Eppendorf. Un volume de 500 microlitres d'éthanol 95% est ajouté, suivi de 5 mixages par inversion et 10 minutes d'incubation à température pièce. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 1 minute à 13 000 rpm pour enlever le supernatant. Le volume d'ADN est alors quantifié par l'ajout d'une solution TE ( 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0) ) par fluorométrie.

#### 4.3.3.2 Stratégie de couverture des gènes

La sélection des polymorphismes a été effectuée par une spécialiste en épidémiologie génétique de manière à assurer une couverture optimale des gènes CHRN et de plusieurs autres gènes potentiellement associés à la dépendance à la nicotine, soit SLC6A3, OPRM1, DDC, DBH, CHAT, ANKK1, BDNF, DRD2, DRD4, TH, SLC6A4, EGLN2, COMT, MAOA. Le logiciel Haploview permet de

sélectionner des polymorphismes présents au sein de populations ethniques définies, à partir des données compilées par le consortium HapMap. (Consortium 2007) Nous utilisons la population d'origine européenne du Nord et de l'Ouest (CEU), soit un ensemble de participants d'origine ethnique caucasienne qui ont participé au projet HapMap. Les polymorphismes communs à cette population génétique ont été répertoriés par l'équipe du projet HapMap. Le logiciel Haploview permet de visualiser les polymorphismes communs à une population génétique. (Barrett, Fry et al. 2005)

Une technique TagSNP a été utilisée pour bien couvrir la variabilité génétique des gènes. (de Bakker et al. 2005) En bref, les polymorphismes qui présentent une fréquence d'allèle mineur de plus de 2,5% ont été sélectionnés, mais les tagSNPs dépassant le seuil de 5% sont privilégiés dans le but d'utiliser les polymorphismes dont la fréquence dans notre population est assez élevée au sein de notre population. Les polymorphismes qui possèdent une corrélation  $r^2$  de  $>0.8$  avec un tagSNP sont retenus, de manière à s'assurer que les polymorphismes sont en fort linkage disequilibrium avec un tagSNP. Certains polymorphismes pour lesquels la littérature recense des associations avec un phénotype associé au tabac sont également imposés dans la liste finale, ainsi que des polymorphismes pour lesquelles des associations avec un phénotype du tabagisme ont été publiés.

En conséquence, plusieurs polymorphismes localisés sur les gènes suivants ont été imposés sur la liste: CHRNA2 (Ehringer, Clegg et al. 2007; Conti, Lee et al. 2008; Perkins, Lerman et al. 2009), SLC6A3 (Schmid 2009; Ling 2004, Bergen 2009), DDC (Ma 2005), CHRNA6 (Hoft 2009; Zeiger 2008), CHRNA3 (Zeiger, Haberstick et al. 2008; Hoft, Corley et al. 2009), DBH (Tobacco Genetics Consortium GW meta-analysis (Nat. Genet. 2010)), CHAT (Ray, Mitra et al. 2010), BDNF (Tobacco Genetics Consortium GW meta-analysis (Nat. Genet. 2010)) CHRNA3 (Koskitalo 2009 ; Stevens, Bierut et al. 2008; Saccone, Saccone et al. 2009), CHRNA5 (Chen, Chen et al. 2009; Hung 2008; Lips, Gaborieau et al. 2010; Saccone,

Wang et al. 2009, *CHRNA4* (Stevens, Bierut et al. 2008; Saccone, Wang et al. 2009), *EGLN2* (Tobacco Genetics Consortium GW meta-analysis (Nat. Genet. 2010)), *CHRNA4* (Feng, Niu et al. 2004) Cette approche permet de couvrir efficacement le gène en y incluant des polymorphismes présentant un fort LD avec d'autres polymorphismes, tout en conservant des polymorphismes prometteurs et testés par d'autres équipes de recherche. Les polymorphismes localisés dans un intervalle de 10 kilobases avant et après chaque gène candidat sont soumis pour analyse génotypique, de manière à couvrir les zones régulatrices des gènes candidats. (Consortium 2007).

Ensuite, nous pouvons déterminer le taux de couverture des gènes. On calcule alors le nombre d'allèles mineurs sur des polymorphismes préidentifiés qui ont un  $r^2$  avec le tagSNP plus grand que 0.8. On capture ici tous les allèles ayant une fréquence plus élevée que 5% et qui présentent un  $r^2$  élevé. La variation allélique sur *CHRNA3* (6 tags SNP) est bien capturée à l'aide de 26 allèles sur 27, soit 96% des allèles identifiés dans la base de données HapMap. Pour *CHRNA4* (11 tags), on a capturé 14 allèles sur 18, soit environ 77% des allèles. *CHRNA5* (4 tags) capture 14 allèles sur 30, soit 46% des allèles. Le cinquième tag inclus par Génome Québec n'a pas pu être génotypé, ce qui diminue notre pourcentage de couverture de 0.96 à 0.46. La perte de couverture est notable. Les tagSNPs sur *CHRNA6* (5 tags) capturent 20 allèles sur 22, donc 90% des allèles. Nos tags sur *CHRNA7* (19 tags) capturent 77 allèles sur 106, soit 72% des allèles. Trois tagSNPs manquants lors du génotypage diminuent notre couverture de 0.83 à 0.72. Sur *CHRNA2* (8 tags), on capture 18 allèles, tous couverts par un ou l'autre de nos tagSNPs. La couverture est donc optimale, soit 100%. Les tags sur *CHRNA3* (6 tags) ont capturé 26 allèles sur 27, donc 96% des allèles. *CHRNA3* (2 tags) capture peu des allèles, 2 allèles sur 23, soit 8% des allèles. Cependant, ce calcul ne comprend pas 2 polymorphismes qui sont en déséquilibre Hardy-Weinberg dans notre échantillon, ces 2 tags ne sont pas inclus dans les calculs de taux de couverture. Si l'on inclut ces 2 polymorphismes, on passe à un taux de couverture de 86% (20 allèles sur 23 avec 4 tagSNPs). Finalement, sur *CHRNA4* (6 tags), on capture 10 allèles sur 17, donc 68% des allèles.

#### 4.3.3.3 Génotypage des polymorphismes

Les échantillons de matériel génétique proviennent des prélèvements de sang ou de salive. Les allèles des gènes nAChR sont répertoriés et les chercheurs peuvent synthétiser des sondes spécifiques aux allèles déjà répertoriés. Un appareil iPLEX MassARRAY<sup>md</sup> de Sequenom (San Diego, Californie) a été utilisé pour génotyper les polymorphismes. Trois groupes de 40 oligos correspondant à 40 polymorphismes chacun (en multiplex) ont été conçus par une technicienne de Génome Québec. Tous les 859 échantillons ont été génotypés en même temps. Le génotypage a commencé par une amplification des 40 polymorphismes dans un volume final de 5uL. Ensuite, 1uL de cette solution a été utilisé pour un test de contrôle de la qualité à l'aide de l'appareil QIAxcel de QIAGEN. Ensuite, on a utilisé du SAP (shrimp alkaline phosphatase) pour enlever les groupements phosphates avant d'utiliser des sondes spécifiques à chaque polymorphisme. Chaque sonde est spécifique à un polymorphisme et possède une masse particulière (masse X) lorsqu'elle est non hybridée. Cette masse sera différente si la sonde est hybridée avec l'allèle 1 (masse Y) ou si hybridée avec l'allèle 2 (masse Z). Un spectromètre de masse détecte ensuite les masses des sondes hybridées afin de déterminer si l'allèle 1 (masse Y) et/ou l'allèle 2 (masse Z) est présent sur ce polymorphisme et ce, pour chacun des 40 polymorphismes de la plaque .

#### 4.3.3.4 Choix et restriction des polymorphismes à analyser

Un premier sous-échantillon de 859 participants a contribué autant à la collecte de données phénotypiques qu'à la collecte de données génotypiques. Il s'agit de tous les participants ayant fourni du matériel génétique, soit par prélèvement sanguin ou par un échantillon de salive. Les données sont ensuite examinées dans le but de détecter les participants présentant des discordances entre leur phénotype sexuel et leurs données génotypiques. Également, deux individus possédaient les mêmes données génétiques. Il s'agit donc d'une erreur de laboratoire ou un échantillon

a été dupliqué par inadvertance. Ces individus sont donc exclus de l'analyse et on ne conserve qu'un seul participant.

Ensuite, l'équipe du Centre d'innovation McGill - Génome Québec qui a effectué le génotypage a évalué la performance des marqueurs, soit la capacité d'un marqueur à génotyper correctement un allèle. Certains marqueurs ne peuvent être génotypés correctement, des considérations techniques sont souvent en jeu ici. L'analyse portait originellement sur 120 polymorphismes soupçonnés d'être impliqués dans les mécanismes de la dépendance à la nicotine. Parmi cet ensemble de 120 polymorphismes, 12 ont été écartés pour des raisons techniques. Enfin, le taux de réponse est ensuite calculé. Les marqueurs restants présentent un taux de réponse d'environ 99,18% et forment la base des données génotypiques analysées. Un sous-ensemble de 66 polymorphismes localisés sur les gènes CHRN codant pour les récepteurs cholinergiques nicotiniques ont ensuite été utilisés dans nos analyses.

On s'attend à ce qu'un certain nombre d'échantillons ne puissent être génotypés, en raison de diverses raisons humaines et techniques. La moyenne du taux de réponse est de 97.7% pour les 66 polymorphismes analysés, avec une majorité de polymorphismes qui présentent un taux de réponse supérieur à 98%. Nous utilisons un point de coupure de 95%, pour éliminer les marqueurs dont le taux de réponse est trop bas, ce qui affecte la qualité des analyses génotypiques, ainsi que la confiance que l'on porte en celles-ci. Nous avons donc enlevé quatre marqueurs dont les résultats ne sont pas publiés. Les erreurs de reproductibilité de l'ADN dépendent de la capacité de la plateforme technologique à rapporter efficacement et invariablement le génotype d'un polymorphisme particulier. Certaines plateformes sont plus sensibles que d'autres plateformes similaires, de par leurs méthodes génotypiques ou leurs limitations techniques. Aucun marqueur ne présente un taux d'erreur de reproductibilité élevé. Également, Les données génotypiques du participant ont ensuite été contre-vérifiées pour confirmer que le sexe phénotypique du participant correspond à son identité sexuelle génotypique. Ensuite, cinq polymorphismes étaient

en déséquilibre d'Hardy-Weinberg, ils ne sont pas distribués aléatoirement dans notre échantillon, ils sont donc exclus du jeu de données.

#### 4.4. Questionnaires

Les instruments de mesure pour l'étude NDIT proviennent de questionnaires testés et utilisés par des équipes de recherche travaillant sur le tabagisme. Les principales questions ont été développées au début de l'étude. Le questionnaire a fait l'objet d'évaluations tout au long de l'étude, nous avons notamment ajouté des questions lors de la collecte de suivi. La dépendance à la nicotine et les symptômes associés font l'objet d'une quarantaine de questions. Les questions relatives aux symptômes subjectifs négatifs ont été posées à chacun des cycles de la période initiale. Nous pouvons donc extraire la plupart des variables à partir de l'ensemble de données le plus convenable.

Les questionnaires comportent des items visant à mesurer les effets des états de besoin (cravings), de la tolérance à la nicotine, des symptômes de sevrage et de l'initiation aux produits du tabac, entre autres. (Wileyto, O'Loughlin et al. 2009) Pour les besoins de la présente analyse, nous n'avons sélectionné que les variables qui mesurent des symptômes subjectifs associés aux premiers épisodes de tabagisme ainsi que les questions relatives à l'initiation à la nicotine et ses effets physiologiques et psychologiques. (Wileyto, O'Loughlin et al. 2009) Ces questions se rapportent à un ensemble de huit symptômes négatifs subjectifs: toussotements, sensation de brûlure dans la gorge, maux d'estomac, battements cardiaques, étourdissement, nausée et mal de tête. Les questionnaires des cycles 21 et 22 permettent également de recueillir des données sur la santé psychologique, l'anxiété, la prise de médicament et l'incidence de maladies telles que l'asthme ou les maladies métaboliques.

#### 4.5. Variables de l'étude

##### 4.5.1. Variable dépendante: Phénotype: Étourdissement ressenti lors de la première cigarette

Les participants ont répondu à la question suivante: «Les premières fois que tu as respiré profondément jusque dans tes poumons la fumée de cigarette, jusqu'à quel point as-tu ressenti les symptômes suivants?». Cette question est posée à chaque cycle de l'étude et permet de capter l'information sur le phénotype peu de temps après l'expérimentation. Les participants devaient répondre à cette question que lorsqu'ils affirmaient avoir respiré profondément la fumée de cigarette au moins à une occasion. Les valeurs de l'intensité de ces symptômes subjectifs négatifs ont été extraites lors du cycle où le participant affirme avoir inspiré de la fumée de cigarette. Les symptômes subjectifs négatifs quantifiés sont: toux, brûlement dans la gorge, mal de ventre, battements cardiaques rapides, étourdissements, mal de coeur, mal de tête. Les participants notent ensuite l'intensité du symptôme subjectif : «Pas du tout», «Un peu» ou «Beaucoup». La variable phénotypique de notre étude est une variable discrète, l'étourdissement ressenti à la première cigarette, et présente 3 niveaux. Les valeurs peuvent être 0, 1 ou 2, selon l'intensité d'étourdissement ressentie par le participant. La variable a ensuite été réduite à une variable binaire en combinant les valeurs 1 et 2, donc tous les participants ayant ressentis de l'étourdissement sont codés 1, alors que les autres se voient attribué la valeur 0. Le faible nombre de participants ayant répondu «beaucoup» nous force à combiner les deux catégories pour augmenter le nombre d'échantillon.

##### 4.5.2. Variables indépendantes

La variable génotypique est une valeur quantitative basée sur le nombre d'allèles mineurs présents dans le génome du participant. Les analyses effectuées dans le cadre de ce travail portent sur 61 polymorphismes localisés sur les gènes suivant: CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNB2, CHRNB3

et CHRNA4. Le tableau 1 présente une liste détaillée des polymorphismes génotypés pour cette analyse.

#### 4.5.3. Covariables

À notre connaissance, trois covariables pourraient expliquer une partie de la variance de la variable dépendante. Il est donc utile de contrôler sur ces variables, de manière à mieux rendre plus précises les estimations de l'association entre la variable génotypique et la variable phénotypique.

##### 4.5.3.1. Âge à la première cigarette

Les participants ont rapporté l'âge auquel ils ont expérimenté la cigarette pour la première fois. Cette information est capturée grâce à la question suivante: «Quel âge avais-tu lorsque tu as fumé une cigarette au complet (jusqu'au filtre ou près du filtre) pour la première fois?». La question a été posée à chaque cycle de l'étude. Les participants qui ont expérimenté avec la cigarette avant le début de l'étude ont rapporté leur réponse lors du questionnaire initial. Les participants qui ont expérimenté avec la cigarette au cours de l'étude ont rapporté leurs réponses lors du questionnaire suivant, soit au maximum trois mois après l'expérimentation.

##### 4.5.3.2. Sexe

Le sexe du participant est auto-rapporté par le participant. Nous avons extrait la valeur rapportée lors du cycle initial de l'étude, puisqu'il s'agit d'une variable constante dans le temps.

#### 4.5.4 Facteurs de confusion potentiels

##### 4.5.4.1 L'ethnicité

L'ethnicité du participant est auto-rapportée par le participant. Une question relative à l'ethnicité a été posée lors du cycle 21 La question suivante a été posée au participant : «Les gens qui vivent au Canada ont des origines culturelles et raciales

très variées. Êtes-vous...». Les réponses possibles sont: Blanc(he), Chinois(e), Sud-asiatique (Indien(ne) de l'Inde, Pakistanais(e), Sri Lankais(e)), Noir(e), Latino-Américain(e), Asiatique du Sud-Est (Cambodgien(ne), Indonésien(ne), Laotien(ne), Vietnamien(ne)), Arabe, Asiatique occidental(e) (Afghan(e), Iranien(e)) et Autres. Les valeurs sont ensuite dichotomisées en 2 nouvelles valeurs, blanc ou non-blanc, dans le but de capturer l'ethnicité des participants. Les participants ayant répondu "Blancs" se voient assigner une valeur 1, alors que les participants ayant rapportés une autre ethnicité, 0. Il s'agit d'un facteur de confusion car l'ethnicité a un impact sur la fréquence des polymorphiques et peut aussi être associé au phénotype.

#### 4.6. Les analyses statistiques

Le logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, Caroline du Nord, États-Unis) a été utilisé pour l'agrégation des données, la création des variables phénotypiques, ainsi que pour modeler nos variables en utilisant une régression logistique.

##### 4.6.1 Transformation des données

L'équation de régression logistique comporte quatre variables indépendantes, soit une variable génotypique, le nombre d'allèles mineurs, ainsi que les trois covariables. Nous avons utilisé 66 différentes valeurs génotypiques, soit une pour chaque polymorphisme étudié. Chaque polymorphisme est présent en deux copies. Nous avons alors utilisé un modèle additif en supposant que l'impact de chaque polymorphisme sur la variable dépendante est additif. Donc être porteur d'un seul allèle n'apporte pas le même changement phénotypique qu'être porteur de deux copies de l'allèle mineur. La variable indépendante génotypique est donc une valeur qui correspond au nombre d'allèles mineurs chez le participant. Le laboratoire nous a fourni le génotype de tous les participants. L'ensemble de données transmis par le laboratoire est composé de deux variables alléliques, donc deux variables pour chaque polymorphisme. Cette variable allélique peut avoir deux valeurs différentes selon s'il s'agit du nucléotide majeur ou mineur et une valeur nulle. Puisque

l'information livrée par le laboratoire n'est pas sous forme numérique, nous avons transformé les valeurs alphanumériques en valeurs numériques.

Premièrement, nous déterminons quel nucléotide fait office d'allèle mineur au sein de notre population. Pour ce faire, un simple calcul de fréquence allélique nous permet d'identifier l'allèle mineur au sein de notre population. Nous nous attendions à ce que l'allèle mineur de notre population soit le même que celui répertorié par le consortium HapMap. Nous avons donc calculé la fréquence d'allèles mineurs au sein de notre population pour les 66 polymorphismes. Puisque l'allèle mineur dans nos populations correspondait à l'allèle mineur rapporté dans la littérature, nous avons procédé à l'étape suivante. Deuxièmement, les deux variables alléliques alphanumériques sont transformées en valeurs numériques dichotomiques. Chaque participant se voit attribuer une valeur qui dépend du nombre d'allèles mineurs présents dans son génome. Lorsque la valeur correspond à l'allèle mineur, la valeur devient 1, s'il s'agit de l'allèle majeur, la valeur devient 0. Les participants peuvent être porteur d'aucun allèle mineur (homozygote sur l'allèle majeur), d'un allèle mineur (hétérozygote) ou deux allèles mineurs (homozygote sur l'allèle mineur). La dernière étape pour la création de la variable génotypique consiste à additionner les deux variables alléliques correspondant à chaque polymorphisme. Nous utilisons un modèle additif pour la variable génotypique, chaque allèle mineur présent chez le participant augmente la force de l'association. En bref, nous assumons que l'impact phénotypique des allèles mineurs diffère en fonction du nombre d'allèle mineur. Ainsi, la variable génotypique est calculée pour chaque polymorphisme et représente le nombre d'allèles mineurs présents dans le génome du participant. Les valeurs possibles sont 0, 1 ou 2, selon la présence de 0, 1 ou 2 allèles mineurs dans le génome du participant. Nous avons également fait les calculs pour deux autres modèles: dominant, où la présence d'un seul allèle ou de deux est codée 1 et aucun allèle mineur 0, et récessif, où 2 allèles mineurs sont nécessaires pour être codé 1 alors que posséder un ou zéro allèle mineur est codé 0.

Ensuite, nous avons extrait la variable dépendante. La première valeur non-nulle de cette variable est extraite et constitue donc notre variable dépendante. Les participants ayant expérimenté avec la cigarette avant le début de l'étude ont donc rapporté leurs symptômes rétrospectivement lors du cycle 1, les autres l'ont fait lors du cycle postérieur à l'expérimentation.

#### 4.6.3 Analyses statistiques

La procédure PROC LOGISTIC du logiciel SAS permet de réaliser une régression logistique multinomiale. Notre équation finale inclut le nombre d'allèles mineurs, trois covariables et l'étourdissement comme variable dépendante et porte sur 356 participants.

L'analyse statistique est en fait une série de 61 sous-analyses. Chaque équation vise à déterminer la présence d'une association significative entre un polymorphisme particulier et le phénotype d'intérêt. Le seuil de signification est établi à 0,05. Nous avons utilisé une approche par gènes candidats. Nos analyses ne font pas l'objet de corrections pour tests multiples. Une méthode sommaire de correction pour tests multiples consisterait à diviser à posteriori le seuil de signification, qui est ici de 0,05, par le nombre total de tests. Nous avons programmé 66 équations différentes, soit une pour chaque polymorphisme présent au départ dans notre ensemble de données. Lorsque le p-value pour la variable génotypique était moins grande que 0.05, nous avons utilisé le coefficient  $\beta$  pour déterminer le OR estimé. Les intervalles de confiance 95% sont également rapportés, fournissant ainsi le degré de précision de l'estimation de l'OR. Ce rapport de cote s'interprète comme la multiplication de l'odds d'avoir rapporté ressentir de l'étourdissement lorsque le participant porte un allèle mineur par rapport aux participants qui ne possède pas d'allèles mineurs.

**5. Article**

Article sous revue par Addictive Behaviors (première soumission en août 2012, resoumis en janvier 2013 après corrections)

## The association between CHRN genes and dizziness at first inhalation of cigarette smoke

Maxime Pedneault<sup>1</sup>

Aurélie Labbe, PhD<sup>2</sup>

Marie-Hélène Roy-Gagnon, PhD<sup>3</sup>

Nancy Low, MD, MSc<sup>4</sup>

Érika Dugas, Msc<sup>1</sup>

James C. Engert, PhD<sup>5</sup>

Jennifer O'Loughlin, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CRCHUM, Université de Montréal, Montreal, Canada

<sup>2</sup> Département d'épidémiologie, biostatistiques et santé au travail, Université McGill, Montréal, Canada

<sup>3</sup> CRHSJ, Université de Montréal, Montréal, Canada

<sup>4</sup> Département de psychiatrie, Université McGill, Montréal, Canada

<sup>5</sup>Départements de médecine et de génétique humaine, Université McGill, Montréal,  
Canada

Word count (main text only): 1939

Words in abstract: 217

Number of Tables: 2

Number of Figures: 0

**Abstract**

Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in multiple nicotinic receptor genes (*CHRN*) are associated with smoking. However few studies have examined the association between *CHRN* SNPs and subjective responses to smoking which may relate to sustained smoking, such as dizziness at first inhalation. The objective of this study was to investigate the association between 61 SNPs in eight *CHRN* genes (*CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA6*, *CHRNA7*, *CHRNB2*, *CHRNB3*, *CHRNB4*) and dizziness at first inhalation. Data were available in a longitudinal cohort investigation of 1293 students 12-13 years-old at baseline. Students completed self-report questionnaires at-school every 3 months for 5 years during secondary school, and a mailed self-report questionnaire three years later. DNA extracted from blood or saliva was genotyped for 61 *CHRN* SNPs selected using a gene tagging approach. Associations were modeled using logistic regression controlling for sex, race and age at first cigarette. The minor alleles of three SNPs in *CHRNA6* (rs7812298, rs2304297, rs7828365) were associated a decreased probability of dizziness (OR (95% CI)=0.54 (0.36, 0.81), 0.59 (0.40, 0.86) and 0.58 (0.36, 0.95, respectively), while one SNP in each of three other genes (rs3743077 (*CHRNA3*), rs755204 (*CHRNA4*), rs7178176 (*CHRNA7*)) was associated with an increased probability of dizziness (OR (95% CI)=1.40 (1.02, 1.90), 1.85 (1.05, 3.27) and 1.51 (1.06, 2.15), respectively). Thus, several SNPs located in *CHRN* genes are associated with dizziness at first inhalation, a smoking initiation phenotype that may relate to sustained smoking

**Keywords:** SNP; genetic association; cigarette initiation; nicotinic cholinergic receptors; nicotine; adolescent

## 1. Introduction

There is an important genetic component to smoking initiation, sustained smoking, and nicotine dependence (ND), (Amos, Spitz and Cinciripini, 2010; Munafò and Johnstone, 2008; Vink, Smit and de Geus, 2009) with heritability estimates ranging between 0.37-0.56 for initiation, and 0.46-0.84 for ND. (Benowitz, 2010; Li, 2003; Li, Cheng, Ma and Swan, 2003; Conner, Hellemann, Ritchie and Noble, 2010; Batra, Patkar, Berrettini, Weinstein and Leone, 2003) The wide range in heritability estimates may relate, at least in part, to “smoking initiation” and “ND” representing relatively broad constructs which likely combine numerous specific sub-phenotypes. Distinguishing between specific initiation and ND sub-phenotypes may help quantify the relative importance of specific genes during smoking onset.

Several reports suggest that smoking phenotypes related to early responses to smoking may predict later smoking and ND. DiFranza et al. (2004) reported that increased sensitivity to nicotine as manifested by relaxation, dizziness, or nausea at first exposure to nicotine, is a determinant of later ND. Further, Pomerleau et al. (2005) reported that smokers who felt a pleasurable buzz during early smoking smoked more cigarettes per day later in life than those who did not.

Nicotinic receptor genes (*CHRN*) code for receptor subunits of the nicotinic cholinergic receptors (nAChRs), which are heteromeric ligand-gated channels composed of multiple subunits that are a prime target for nicotine in the brain. (Mineur and Picciotto, 2008; Taly, Corringer, Guedin, Lestage and Changeux, 2009) Most nAChRs are highly expressed in the central nervous system (Changeux, 2009), mainly in the ventral tegmental area. (Changeux, 2010) The family of receptor subunits has 12 members including nine alpha (alpha 2-alpha 10) and three beta (beta 2-beta 4) subunits that are all present in the cerebral cortex. (Changeux, 2009; Schlaepfer et al., 2008; Mansvelder and McGehee, 2002) When nicotine binds to nAChRs, a conformation change results in an influx of cations, followed by polarization and opening of a voltage-dependent calcium channel (Mansvelder and McGehee, 2002) which results in liberation of neurotransmitters such as dopamine, and physiological changes in the brain. (Mineur and Picciotto, 2008; Taly, Corringer,

Guedin, Lestage and Changeux, 2009) nAChRs in the brain may be a pathway common to multiple smoking phenotypes (Wang et al., 2010). In previous research, they have been associated with increased dopamine transmission (Exley and Cragg, 2008; Mark, Shabani, Dobbs and Hansen, 2011) which is in turn associated with reward responsivity, increased concentration, relaxation and euphoria, all of which may play a role in the development of ND (Kalivas and Volkow, 2005).

Increasing evidence suggests that nicotinic receptor genes may be involved in both smoking initiation and ND. (Li, 2003; Mineur and Picciotto, 2008; Changeux, 2009; Benowitz, 2009) Sherva et al. (2008) reported that a SNP located in *CHRNA5* (rs16969968) is associated with a pleasant buzz during early smoking. Two SNPs (rs8023462, rs1948) located in the *CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4* gene cluster, were associated with earlier age at initiation (Schlaepfer et al, 2008), while two SNPs (rs4950, rs13280604) in the *CHRNA6/CHRNA3* cluster were associated with an early subjective response phenotype that included dizziness and feeling a buzz or nausea. (Zeiger et al., 2008) Participants carrying the minor alleles were more likely to report adverse subjective responses shortly after initiation.

The objective of this study was to assess if any of 61 tag SNPs which capture common genetic variation in *CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA6*, *CHRNA7*, *CHRNA2*, *CHRNA3* and *CHRNA4* are associated with self-reported dizziness at smoking initiation.

## **2. Method**

### **2.1 Setting**

The Nicotine Dependence in Teens (NDIT) Study is a prospective cohort investigation of the natural course of ND in adolescents. (O'Loughlin, Karp, Koulis, Paradis and DiFranza, 2009) A total of 1293 grade 7 students 12-13 years-old were recruited in 1999-2000 in ten Montreal-area secondary schools. Schools were selected to include French and English schools in urban, suburban, and rural areas, located in high, moderate and low income neighborhoods. The baseline response was 55%; non-participation related to potential participants being reluctant to participate in the blood sampling component of the study, and a province-wide labor dispute that resulted in some teachers not collecting consent forms.

### **2.2 Data Collection**

Baseline data were collected in classroom-administered self-report questionnaires. Follow-up questionnaires were administered at school every three months during the 10-month school year for five years, for a total of 20 cycles during secondary school. An additional cycle (cycle 21) took place 2-3 years after secondary school when participants were 20 years old on average.

Blood samples were collected when participants were in grade 9; 523 participants provided a usable blood sample. In cycle 21, Oragene DNA saliva kits (DNA Genotek Inc., Kanata, Canada) were mailed to participants who had not provided a usable blood sample in grade 9; 336 additional participants provided saliva so that a total of 859 participants (66% of 1293) provided DNA. DNA was extracted from the blood and saliva samples and sent to the Genome Quebec and McGill University Innovation Centre (Montreal, Canada) for genotyping.

Parents or guardians provided written consent at baseline, and participants provided informed consent post-secondary school. The study received institutional approval from the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal.

### 2.3 Study variables

Subjective negative responses to early smoking were assessed in each cycle by asking participants if they experienced dizziness (no, yes) the first few times they took cigarette smoke into their lungs. Covariates included sex, race (white, non-white), and age at first cigarette.

### 2.4 SNP selection

We used the greedy pairwise tagging approach (de Bakker et al., 2005) as implemented in the software Haploview (Barrett, Fry, Maller and Daly, 2005) to tag polymorphisms present in the HapMap CEU data. (The International HapMap Consortium, 2007) We captured SNPs with a minor allele frequency (MAF)  $>2.5\%$  but selected tag SNPs with  $MAF > 5\%$ . We used a linkage disequilibrium (LD) cutoff  $r^2 > 0.8$ , ensuring that each captured SNP is in strong LD with a tag SNP. We tagged polymorphisms from 10kb upstream to 10kb downstream in each candidate gene using genomic positions according to NCBI build 36. Sequenom iPLEX Gold (Sequenom Inc, San Diego, California) technology was used for genotyping. The SNP call rate threshold for inclusion was 95% and the sample call rate threshold was set at  $>95\%$ ; SNPs not attaining these criteria were dropped. Genotype reproducibility was  $>99.8\%$ . Five SNPs in Hardy-Weinberg disequilibrium were discarded.

### 2.5 Data analysis

Of 859 participants with DNA, 475 (55%) initiated smoking; 356 of 475 (75%) with complete data comprised the analytic sample. We assumed an additive model - genotype was coded 0, 1, or 2 by summing the number of minor alleles for a specific SNP. Secondary analyses with dominant and recessive models were also undertaken. LD calculations were obtained using Haploview 4.2. The association between the number of minor alleles for each of the 61 SNPs and dizziness on first

inhalation (no, yes) was modeled using logistic regression controlling for sex, race (white, non-white), and age at first cigarette. P-values are uncorrected nominal p-values. All analyses were conducted using SAS version 9.2 (SAS Institute, North Carolina).

### 3. Results

Approximately one-third of the sample was male; most were born in Canada and white; and 44% were French-speaking (Table 1). About two-thirds of the sample had smoked more than 100 cigarettes and the mean age at first cigarette was 13 years. One-third (31%) had mothers who smoked, and 28% had fathers who smoked. Approximately one-third of participants experienced dizziness at first inhalation.

Six of 61 SNPs were statistically significantly associated with dizziness at first inhalation in the additive models (Table 2). Specifically, carriers of the minor allele in three SNPs located in *CHRNA6* (rs2304297 (C), rs7812298 (A), rs7828365 (A)) were less likely to report dizziness at first inhalation than non-carriers. SNPs rs2304297 and rs7828365 were highly correlated ( $r^2=0.84$ ) and may therefore capture the same variation. SNP rs7828365, located 5' of the gene, exhibited less LD ( $r^2=0.56$  and 0.48 for rs7812298 and rs2304297, respectively).

Carriers of three additional SNPs located in *CHRNA3* (rs3743077; minor allele T), *CHRNA4* (rs755204; T) and *CHRNA7* (rs7178176; T) were more likely to report dizziness at first inhalation (Table 2).

Three of the six SNPs that were statistically significantly associated with dizziness in the additive models were also statistically significant in both the dominant and additive models (rs2304297 and rs7812298 on *CHRNA6*, rs755204 on *CHRNA4*; Supplementary Tables 1-2).

#### 4. Discussion

We detected associations between a smoking initiation phenotype - dizziness at first inhalation - and six SNPs located in or near *CHRN* genes.

Three *CHRNA6* SNPs were associated with a decreased probability of dizziness. Zeiger et al. (2008) reported a similar association in a study of 1056 adolescent daily smokers, except that *CHRNA6* SNP rs2304297 was associated with an increased probability of dizziness, pleasurable buzz, and relaxation at first cigarette. Measurement issues may explain the difference in the directionality of the association. In the Zeiger et al. (2008) study, dizziness was one of eight symptoms that were combined into a single indicator, which might have obscured the association with dizziness. Alternatively, the variant identified may not itself be associated with dizziness, but rather is in high LD with a variant that is associated with dizziness.

In our study, three additional SNPs on separate *CHRN* genes were positively associated with dizziness. *CHRNA3* is a component of the A5/A3/B4 cluster which is associated with ND, (Chen et al., 2009; Li, Xu, Lou, Payne, Niu and Ma, 2010; Etter et al, 2009) cessation, (Breitling et al., 2009A) and smoking (Etter et al, 2009). In a case-control study, the minor allele of *CHRNA3* (rs578776), (Stevens et al., 2008) as well as rs578776 and rs1051730 (Saccone et al., 2009) were associated with heavy smoking. This same gene cluster related to smoking quantity in a meta-analysis of smoking traits. (Liu et al., 2010) Moreover, the SNP rs578776 was associated with ND in the European subsample of a case-control study of Europeans and African Americans (Saccone et al., 2009). No reports to date have investigated dizziness in relation to *CHRNA3*. Therefore, we have added another phenotype to those already implicated with this gene.

To date, several SNPs in *CHRNA4* have been reported to be associated with dizziness,(Hoft, Stitzel, Hutchison and Ehringer, 2011) dizziness and euphoria, (Hoft, Stitzel, Hutchison and Ehringer, 2011) cessation, (Hutchison et al., 2007) and ND. (Breitling et al., 2009B) Further, in a family-based study, a haplotype of various SNPs

located on *CHRNA4* conferred a protective effect against vulnerability to ND in male smokers. (Feng et al., 2004) Our study adds an initiation phenotype to this list - carriers of the minor allele of SNP rs755204 had a higher likelihood of reporting dizziness at first inhalation.

In a North American study, one SNP located in *CHRNA7* was significantly associated with ND. (Philibert et al., 2009) A case-control study comparing nicotine-dependent and non-dependent smokers of European and African-American origin reported associations between multiple SNPs in *CHRNA7* and ND, but only in the African-American subsample. (Saccone et al., 2010) While *CHRNA7* has been associated with ND phenotypes, our study is the first to implicate dizziness.

Study limitations include the use of self-report data, which are subject to misclassification. While ethnicity was included in the multivariate models, residual population stratification may have contributed to bias in the estimates of the associations. We pooled data across baseline smokers and initiators during follow-up although the associations of interest may differ across these sub-groups.

In conclusion, the minor alleles of three SNPs on *CHRNA6* were associated with a decreased probability of dizziness at first inhalation. Three additional SNPs located on *CHRN* genes were associated with an increased probability of dizziness. These results support the hypothesis that *CHRN* genes are involved in smoking initiation and because dizziness may relate to later ND, they may also be implicated in sustained smoking.

## **5. Acknowledgements**

The NDIT Study is funded by the Canadian Cancer Society. JOL holds a Canada Research Chair in the Early Determinants of Adult Chronic Disease. NL holds a clinical research scholar award from the Fonds de Recherche du Québec – Santé. The authors thank the NDIT participants. We thank Katia Desbiens for expert technical assistance.

## 6. References

- Amos, C.I., Spitz, M.R. & Cinciripini, P. (2010). Chipping away at the genetics of smoking behavior. *Nat Genet.* 42, 366-8.
- Araud, T., Graw, S., Berger, R. et al. (2011). The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of  $\alpha 7^*nAChR$  function. *Biochemical pharmacology.* 82, 904-14.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J. & Daly, M.J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 21, 263-5.
- Batra, V., Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Weinstein, S.P. & Leone, F.T. (2003). The genetic determinants of smoking. *Chest.* 123, 1730-9.
- Benowitz, N.L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 49, 57-71.
- Benowitz, N.L. (2010). Nicotine addiction. *The New England journal of medicine.* 362, 2295-303.
- Breitling, L.P., Dahmen, N., Mittelstrass, K. et al. (2009A). Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 4 polymorphisms with nicotine dependence in 5500 Germans. *Pharmacogenomics Journal.* 9, 219-24.
- Breitling, L.P., Dahmen, N., Mittelstrass, K. et al. (2009B). Smoking cessation and variations in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha-5, alpha-3, and beta-4 genes. *Biological psychiatry.* 65, 691-5.
- Changeux, J.P. (2009). Nicotinic receptors and nicotine addiction. *Comptes Rendus Biologies.* 332, 421-5.
- Changeux, J.P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature reviews. Neuroscience.* 11, 389-401.

- Chen, X., Chen, J., Williamson, V.S. et al. (2009). Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics.* 150B, 926-33.
- Conner, B.T., Helleman, G.S., Ritchie, T.L. & Noble, E.P. (2010). Genetic, personality, and environmental predictors of drug use in adolescents. *Journal of Substance Abuse Treatment.* 38, 178-90.
- de Bakker et al. (2005). Efficiency and power in genetic association studies. *Nature Genetics.* 37: 1217-1223
- DiFranza, J.R., Savageau, J.A., Fletcher, K. et al. (2004). Recollections and repercussions of the first inhaled cigarette. *Addictive behaviors.* 29, 261-72.
- Etter, J.F., Hoda, J.C., Perroud, N. et al. (2009). Association of genes coding for the alpha-4, alpha-5, beta-2 and beta-3 subunits of nicotinic receptors with cigarette smoking and nicotine dependence. *Addictive behaviors.* 34, 772-5.
- Exley, R. & Cragg, S.J. (2008). Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *British journal of pharmacology.* 153 Suppl 1, S283-97.
- Feng, Y., Niu, T., Xing, H. et al. (2004). A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men. *American Journal of Human Genetics.* 75, 112-21.
- Hoft, N.R., Stitzel, J.A., Hutchison, K.E. & Ehringer, M.A. (2011). CHRNA4 promoter region: association with subjective effects to nicotine and gene expression differences. *Genes, brain, and behavior.* 10, 176-85.
- Hutchison, K.E., Allen, D.L., Filbey, F.M. et al. (2007). CHRNA4 and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome. *Archives of general psychiatry.* 64, 1078-86.
- The International HapMap Consortium. (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* Vol. 449 851-61.

- Kalivas, P.W. & Volkow, N.D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *American Journal of Psychiatry*. 162, 1403-13.
- Li, M.D. (2003). The genetics of smoking related behavior: a brief review. *American Journal of the Medical Sciences*. 326, 168-73.
- Li, M.D., Cheng, R., Ma, J.Z. & Swan, G.E. (2003). A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction*. 98, 23-31.
- Li, M.D., Xu, Q., Lou, X.Y., Payne, T.J., Niu, T. & Ma, J.Z. (2010). Association and interaction analysis of variants in CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster with nicotine dependence in African and European Americans. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*. 153B, 745-56.
- Liu, J.Z., Tozzi, F., Waterworth, D.M. et al. (2010). Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nature genetics*. 42, 436-40.
- Mansvelder, H.D. & McGehee, D.S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*. 53, 606-17.
- Mark, G.P., Shabani, S., Dobbs, L.K. & Hansen, S.T. (2011). Cholinergic modulation of mesolimbic dopamine function and reward. *Physiology and behavior*. 104, 76-81.
- Mineur, Y.S. & Picciotto, M.R. (2008). Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction. *Biochemical pharmacology*. 75, 323-33.
- Munafo, M.R. & Johnstone, E.C. (2008). Genes and cigarette smoking. *Addiction*. 103, 893-904.
- O'Loughlin, J., Karp, I., Koulis, T., Paradis, G. & Difranza, J. (2009). Determinants of first puff and daily cigarette smoking in adolescents. *American journal of epidemiology*. 170, 585-97.
- Philibert, R.A., Todorov, A., Andersen, A. et al. (2009). Examination of the nicotine dependence (NICSNP) consortium findings in the Iowa adoption studies population. *Nicotine & tobacco research*. 11, 286-92.

- Pomerleau, O.F., Pomerleau, C.S., Mehringer, A.M., Snedecor, S.M. & Cameron, O.G. (2005). Validation of retrospective reports of early experiences with smoking. *Addictive behaviors*. 30, 607-11.
- Saccone, N.L., Schwantes-An, T.H., Wang, J.C. et al. (2010). Multiple cholinergic nicotinic receptor genes affect nicotine dependence risk in African and European Americans. *Genes, brain, and behavior*. 9 (7), 741-50.
- Saccone, N.L., Wang, J.C., Breslau, N. et al. (2009). The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*. 69, 6848-56.
- Schlaepfer, I.R., Hoft, N.R., Collins, A.C. et al. (2008). The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biological psychiatry*. 63, 1039-46.
- Sherva, R., Wilhelmsen, K., Pomerleau, C.S. et al. (2008). Association of a single nucleotide polymorphism in neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 5 (CHRNA5) with smoking status and with 'pleasurable buzz' during early experimentation with smoking. *Addiction*. 103, 1544-52.
- Stevens, V.L., Bierut, L.J., Talbot, J.T. et al. (2008). Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 17, 3517-25
- Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P. & Changeux, J.P. (2008). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery*. 8, 733-50.
- Tapper, A.R., McKinney, S.L., Nashmi, R. et al. (2004). Nicotine activation of alpha4\* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*. 306, 1029-32.
- Vink, J.M., Smit, A.B., de Geus, E.J. et al. (2009). Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking. *American Journal of Human Genetics*. 84, 367-79.

Wang, J. & Li, M.D. (2010). Common and unique biological pathways associated with smoking initiation/progression, nicotine dependence, and smoking cessation.

*Neuropsychopharmacology*. 35, 702-19.

Zeiger, J.S., Haberstick, B.C., Schlaepfer, I. et al. (2008). The neuronal nicotinic receptor subunit genes (CHRNA6 and CHRNB3) are associated with subjective responses to tobacco. *Human molecular genetics*. 17, 724-34.

**Table 1. Selected characteristics of study participants. NDIT Study, 1999-2008.**

	Participants (n=356)
Male, %	35.2
White, %	84.8
French-speaking, %	43.8
Born in Canada, %	96.8
Lived with mother at baseline, %	95.3
Lived with father at baseline, %	81.4
Age (y) at first cigarette, mean (SD)	13.4 (1.4)
Smoked >100 cigarettes, %	63.8
Mother smokes, %	30.6
Father smokes, %	28.0
Dizziness at first inhalation, %	29.3

**Table 2. Odds ratio (OR) ratio and 95% confidence interval (CI) obtained from additive models of the association between *CHRN* SNPs and dizziness at first inhalation of cigarette smoke. NDI Study, 1999-2008**

Gene	SNP	Chr.	Position (genome build 37.3)	Minor allele frequency	Minor allele	Major allele	p-value	OR (95% CI)
<i>CHRNA3</i>	rs1051730	15	78894339	0.31	T	C	0.0570	0.71 (0.50, 1.01)
	rs12899226	15	78887438	0.05	C	A	0.2112	1.60 (0.77, 3.33)
	rs12904589	15	78897581	0.04	C	T	0.2185	1.64 (0.75, 3.63)
	rs3743077	15	78894896	0.43	T	C	<b>0.0359</b>	<b>1.39 (1.02, 1.90)</b>
	rs4887069	15	78909070	0.24	C	T	0.5197	0.89 (0.61, 1.28)
	rs578776	15	78888400	0.29	A	G	0.8771	0.97 (0.69, 1.37)
<i>CHRNA4</i>	rs1044396	20	61981134	0.47	T	T	0.9481	1.01 (0.76, 1.35)
	rs2093107	20	61993942	0.11	A	G	0.2220	0.70 (0.40, 1.24)
	rs3787138	20	61979224	0.13	C	T	0.3676	1.22 (0.79, 1.90)
	rs4522666	20	61974480	0.40	G	A	0.0596	0.74 (0.54, 1.01)
	rs4809538	20	61970176	0.26	A	G	0.8736	1.03 (0.73, 1.44)
	rs6011747	20	61964667	0.06	C	T	0.5828	0.84 (0.45, 1.56)
	rs6089899	20	61999308	0.44	C	T	0.6366	0.93 (0.69, 1.25)
	rs735501	20	62000202	0.16	C	T	0.1528	0.73 (0.48, 1.12)
	rs755203	20	61994264	0.47	C	T	0.6271	0.93 (0.69, 1.25)
	rs755204	20	61994165	0.06	T	C	<b>0.0345</b>	<b>1.85 (1.05, 3.27)</b>
	rs9680065	20	61967037	0.39	C	T	0.2316	0.83 (0.62, 1.12)
<i>CHRNA5</i>	rs11636732	15	78854923	0.05	G	T	0.3674	1.40 (0.67, 2.93)
	rs12903575	15	78881087	0.05	A	G	0.1568	1.71 (0.81, 3.61)
	rs16969968	15	78882925	0.30	A	G	0.0635	0.71 (0.50, 1.02)
	rs569207	15	78873119	0.23	A	G	0.8636	0.97 (0.67, 1.41)
<i>CHRNA6</i>	rs16891604	8	42618713	0.06	T	G	0.4842	1.30 (0.63, 2.67)
	rs17621710	8	42615560	0.10	T	C	0.2049	1.38 (0.84, 2.25)
	rs2304297	8	42608199	0.26	C	G	<b>0.0057</b>	<b>0.59 (0.40, 0.86)</b>
	rs7812298	8	42608579	0.23	A	G	<b>0.0027</b>	<b>0.54 (0.36, 0.81)</b>
	rs7828365	8	42629314	0.14	A	G	<b>0.0293</b>	<b>0.58 (0.36, 0.95)</b>
<i>CHRNA7</i>	rs10438342	15	32402046	0.35	T	C	0.5600	1.10 (0.80, 1.51)
	rs11071512	15	32345139	0.07	A	G	0.4745	0.79 (0.41, 1.52)
	rs11071530	15	32359972	0.10	T	C	0.3553	0.78 (0.46, 1.32)
	rs11633380	15	78877150	0.03	T	C	0.6263	0.80 (0.32, 1.97)
	rs11852956	15	32403330	0.22	C	T	0.2280	1.26 (0.87, 1.82)
	rs12438995	15	32405130	0.12	C	T	0.6714	0.90 (0.56, 1.46)
	rs12904458	15	32419788	0.47	G	A	0.3906	0.88 (0.65, 1.19)
	rs12906868	15	32444995	0.12	G	T	0.4700	0.83 (0.50, 1.38)
	rs16956223	15	32410783	0.14	T	C	0.6400	0.90 (0.57, 1.41)
	rs17604861	15	32403369	0.07	T	C	0.6443	0.86 (0.45, 1.64)
	rs2611603	15	32441532	0.34	C	A	0.6532	1.08 (0.78, 1.48)
	rs2611605	15	32441593	0.16	T	C	0.1810	1.31 (0.88, 1.96)
	rs4779565	15	32390070	0.39	T	G	0.7789	1.05 (0.76, 1.44)
	rs6494212	15	32385119	0.30	A	G	0.9847	1.00 (0.72, 1.40)
	rs7175581	15	32385467	0.42	T	C	0.5529	0.91 (0.67, 1.24)

	rs7178176	15	32443813	0.23	T	C	<b>0.0233</b>	<b>1.51 (1.06, 2.15)</b>
	rs8028396	15	32396721	0.40	T	C	0.9867	1.00 (0.73, 1.38)
	rs868437	15	32324277	0.30	G	A	0.6633	1.08 (0.76, 1.54)
	rs885071	15	32324576	0.20	A	C	0.4523	1.16 (0.79, 1.72)
<i>CHRNA2</i>	rs1127309	1	154561925	0.29	A	G	0.4206	0.88 (0.63, 1.21)
	rs2072659	1	154548521	0.08	C	G	0.6585	0.88 (0.51, 1.53)
	rs2072660	1	154548721	0.23	T	C	0.3031	0.83 (0.58, 1.18)
	rs3811450	1	154551032	0.05	T	C	0.5822	0.84 (0.45, 1.56)
	rs4845652	1	154538205	0.09	T	C	0.4220	0.79 (0.45, 1.40)
	rs9427092	1	154553722	0.20	C	T	0.3600	1.18 (0.83, 1.70)
	rs9427094	1	154557685	0.48	A	A	0.4566	0.89 (0.66, 1.20)
	rs9616	1	154555733	0.30	A	T	0.8560	0.97 (0.69, 1.37)
<i>CHRNA3</i>	rs6987323	8	42597232	0.06	G	C	0.8409	1.08 (0.51, 2.28)
	rs7012713	8	42592303	0.03	A	G	0.6232	1.21 (0.57, 2.56)
<i>CHRNA4</i>	rs11636605	15	78928878	0.21	T	C	0.1649	0.75 (0.50, 1.13)
	rs12914008	15	78923505	0.04	T	C	0.1491	1.81 (0.81, 4.06)
	rs17487223	15	78923987	0.32	T	C	0.5905	0.91 (0.65, 1.28)
	rs1948	15	78917399	0.35	A	G	0.4695	1.13 (0.82, 1.55)
	rs6495309	15	78915245	0.21	T	C	0.7713	0.95 (0.65, 1.38)
	rs950776	15	78926018	0.35	G	A	0.2036	1.23 (0.90, 1.68)

## 6. Discussion

### 6.1 Résumé et retour sur les résultats

Le tabagisme est un problème de santé publique qui débute très souvent lors de l'adolescence. Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques qui sous-tendent la dépendance à la nicotine permettra de mieux prévenir et traiter la dépendance à la nicotine.

L'adolescence est une période où de mauvaises habitudes de vie peuvent être établies ou rompues avant qu'elles ne soient plus fermement établies. Le tabagisme est un important facteur de risque pour la santé cardiovasculaire qui est souvent établie au cours de l'adolescence, sans oublier sa présence dans l'étiologie de la majorité des cancers du poumon. (Alberg, Brock et al. 2005; Chassin, Presson et al. 1996; DiFranza, Savageau et al. 2004; Levy, Biener et al. 2009) Donc il existe un réel besoin pour mettre en place des programmes de prévention et de cessation du tabagisme efficaces à l'attention de tous les groupes d'âge, mais particulièrement chez les adolescents. La recherche en épidémiologie génétique peut éventuellement permettre d'informer et de guider ces interventions de santé publique, de manière à les rendre plus efficaces et mieux ciblées. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les facteurs de risques, autant sociaux, que génétiques ou environnementaux, qui sous-tendent la consommation de tabac.

Ce mémoire de maîtrise a mis l'emphase sur les possibles associations entre plusieurs gènes codant les récepteurs nicotiniques cholinergiques présents dans le système nerveux central et l'étourdissement ressenti lors de la première inhalation de fumée de cigarette. Plus précisément, l'objectif premier était de déterminer si la présence d'allèles mineurs sur des polymorphismes localisés sur ou près des gènes codant les récepteurs cholinergiques nicotiniques est associée à une augmentation ou une diminution du risque de ressentir de l'étourdissement lors de la première cigarette. Puisque l'étourdissement et plusieurs autres symptômes subjectifs sont des prédicteurs indépendants de la dépendance à la cigarette, il est primordial d'avoir une meilleure compréhension de l'histoire naturelle du tabagisme. (DiFranza, Savageau et

al. 2004) En général, notre étude a recensé des associations significatives entre le fait d'être porteur d'un allèle mineur provenant de polymorphismes localisés sur ou à proximité des gènes CHRN et l'étourdissement ressenti lors de la première inhalation de fumée de cigarette dans une cohorte multiethnique d'étudiants montréalais. Plus particulièrement, trois polymorphismes localisés sur CHRNA6 ainsi que 3 autres localisés sur d'autres gènes CHRN sont associés à notre phénotype.

### 6.1.1 Retour sur chaque gène

Dans notre étude, nous avons relevé six polymorphismes associés avec l'étourdissement ressenti à la première cigarette. Ceux-ci sont localisés sur quatre gènes de la famille CHRN, soit trois polymorphiques localisés sur le gène CHRNA6 ou en périphérie, et trois autres sur CHRNA3, CHRNA4 et CHRNA7. Ces associations sont le résultat d'analyses séparées dans lesquelles la direction et la force de l'association entre le polymorphisme et le phénotype dichotomisé sont examinées à l'aide d'une régression logistique simple comportant qu'une seule variable génotypique à la fois. Les 3 associations liées à des polymorphismes localisés sur ou à proximité du gène CHRNA6 sont associées à un effet protecteur, donc un risque diminué de ressentir de l'étourdissement lors de la première cigarette. Par contre, la direction de nos résultats diffère de celle d'une étude publiée par une équipe qui a génotypé le même gène. En effet, un polymorphisme, rs2304927 a un effet protecteur dans notre échantillon et un effet néfaste dans leur échantillon. Les trois autres polymorphismes sont tous associés positivement avec l'étourdissement, leur coefficient de régression est positif, ce qui signifie que la présence d'un allèle mineur est associée à une augmentation du risque de ressentir de l'étourdissement lors de la première cigarette. Une méthode sommaire de correction pour tests multiples consiste à diviser à posteriori le seuil de signification établi par le nombre total de résultats statistiquement significatifs. Dans le cas présent, cette méthode nous indique que deux des six résultats significatifs atteignent ce nouveau seuil, ce qui bonifie notre confiance envers la force d'association de ces deux associations statistiques. Notre étude est l'une des rares études qui évaluent les associations avec l'étourdissement, le phénotype est moins précis dans la plupart des études.

### 6.1.1.1 CHRNA3

Nous avons détecté une association entre un polymorphisme sur ce gène et l'étourdissement. Les porteurs de l'allèle mineur ont plus de chances de rapporter avoir ressenti de l'étourdissement. Même si des associations avec ce polymorphisme ne sont pas rapportées dans la littérature sur le sujet, ce gène est associé à un effet protecteur contre une grande consommation de tabac dans une étude de Stevens et al (2008). Des phénotypes de dépendance à la nicotine sont également associés à d'autres polymorphismes sur ce gène dans des échantillons d'Américains d'origine européenne et africaine chez Saccone et al. (2009), alors que des associations dans deux groupes semblables ne survivent pas à des corrections pour tests multiples chez Li et al. (2010). Puisque CHRNA3 fait partie d'un groupe de gènes très proches sur le chromosome avec CHRNA5 et CHRNB4, il est possible que des polymorphismes localisés sur ce gène puissent avoir un effet fonctionnel sur les autres gènes du groupe. CHRNA5 contient un polymorphisme associé à l'étourdissement dans un groupe multiethnique principalement caucasien. (Sherva, Kranzler et al. 2010) Puisque les polymorphismes localisés dans certaines régions du génome sont en haut déséquilibre de liaison, un polymorphisme associé à l'étourdissement sur CHRNA3 peut être corrélé à un polymorphisme sur CHRNA5. De plus, les zones régulatrices de CHRNA3 et CHRNA5 se couvrent partiellement, ces deux gènes présentent également un taux de linkage plus élevé. Des analyses préliminaires utilisant l'étourdissement classé en trois degrés (aucun, un peu ou beaucoup) nous ont permis de détecter une association entre le même polymorphisme que l'étude de Sherva et al. (rs16969968), mais seulement avec le fait d'avoir ressenti un peu d'étourdissement face à aucun étourdissement. La seconde valeur phénotypique (beaucoup) ne présentait pas d'association significative. De plus, les analyses de Sherva et al. utilisent un phénotype dichotomique comme nos analyses primaires, où nous n'avons pas trouvé d'associations significatives. Ce signal disparaît dans notre échantillon, ce qui peut être causé par la dichotomisation des résultats. Également, un changement dans la directionnalité des associations peut être dû à l'identification d'un polymorphisme qui n'est pas le polymorphisme causal, mais qui est en fort

déséquilibre de liaison avec celui-ci. La structure populationnelle des mutations, comme la stratification des individus, peut créer des différences de directionnalité. Bref, ce gène fait partie d'un groupe de gènes associés à plusieurs phénotypes et en particulier à l'étourdissement.

#### 6.1.1.2 CHRNA4

Un polymorphisme localisé sur CHRNA4 est également associé à l'étourdissement dans notre échantillon. Ce gène a été associé avec l'étourdissement dans une étude cas-témoins de fumeurs réguliers par Hoft et al. (2011). L'approche Tag SNP utilisée par notre équipe de recherche inclut des polymorphismes précédemment relevés par la littérature sur le sujet ainsi que des polymorphismes choisis en fonction de leur couverture des mutations présentes sur ou près d'un gène. Le polymorphisme de notre étude, rs755204, est situé en périphérie du gène CHRNA4, et non exactement dans la région codante du génome. Cependant, les régions non-codantes peuvent être impliquées dans le mécanisme de l'expression phénotypique, une association entre un polymorphisme localisé en périphérie d'un gène et un phénotype est également digne d'intérêt. (Stankiewicz et Lupski 2010) Au final, nous ajoutons un deuxième polymorphisme au tableau des polymorphismes de CHRNA4 associés à l'étourdissement.

#### 6.1.1.3. CHRNA6

L'équipe de Zeiger et al. (2008) a détecté des associations entre un polymorphisme, rs2304297, et une catégorie de symptômes subjectifs positifs qui inclut l'étourdissement, dans une étude cas-témoin de fumeurs présentement ou anciennement réguliers. Alors que l'allèle mineur est associé à une augmentation du risque de ressentir des symptômes subjectifs positifs, ce risque de ressentir de l'étourdissement est diminué dans notre population. Cependant, leur étude utilise une mesure différente qui est en fait un agrégat de 23 symptômes qui ont ensuite été résumés dans 3 différents scores, négatifs, positifs ou anormaux. Cette agrégation de plusieurs symptômes en un seul score peut avoir dilué l'information donnée par l'étourdissement au profit de celle donnée par les autres symptômes inclus dans ce

groupe. Nous avons détecté au total trois associations entre des marqueurs génétiques uniques et l'étourdissement. Les associations relevées par nos analyses nous permettent de détecter un signal lié à ce gène. Bref, la présence de plus polymorphismes associés avec l'étourdissement sur ce gène en fait un gène prometteur pour des études fonctionnelles ou biologiques plus approfondies.

#### 6.1.1.5 CHRNA7

Ce gène présente également un polymorphisme qui est associé à une augmentation du risque de ressentir de l'étourdissement. Cependant, la littérature existante ne rapporte pas d'associations avec l'étourdissement. Il est cependant associé à la dépendance à la nicotine dans un sous-échantillon afro-américain dans l'étude de Sacconne et al. (2010)

Pour résumer, il est intéressant de noter que les polymorphismes présents sur CHRNA6 sont associés à une baisse du risque de ressentir de l'étourdissement, alors que les trois autres polymorphismes sont associés avec une hausse de ce même risque. Le phénotype des gènes est évidemment étroitement associé au génotype. Cependant, le phénotype est mitigé par une variété de paramètres génétiques, environnementaux et sociaux. Une baisse du risque de ressentir de l'étourdissement lors de la première cigarette pourrait être expliquée par une modification fonctionnelle du récepteur qui le rend moins sensible, une modification dans l'expression du récepteur ou même une inactivation complète du récepteur. (Benowitz 2010; Stankiewicz and Lupski 2010) En fait, ces études épidémiologiques décrivent l'état de la situation au niveau populationnel, mais des études génétiques, en biologie cellulaire et des modèles biologiques seront nécessaires avant de se prononcer sur la causalité de cette association. Cependant, il est judicieux d'utiliser ces informations pour identifier les récepteurs susceptibles d'être modifiés par un polymorphisme. Des études plus approfondies seront nécessaires pour mieux quantifier la directionnalité des associations ainsi que pour comprendre les mécanismes sous-jacents.

## 6.2 Analyses secondaires (MAF)

Plusieurs analyses secondaires ont été conduites dans le but d'analyser nos données de manière plus exhaustive. Premièrement, la distribution des fréquences d'allèles mineurs a été calculée pour chacun des 66 polymorphismes étudiés au départ. Nos valeurs de fréquence d'allèles mineurs pour chacun des polymorphismes sont semblables à celles répertoriées par le consortium International HapMap Project. Nous avons basé nos comparaisons sur l'ensemble de données CEPH (résidents de l'Utah originaires de l'Europe du Nord et de l'Ouest). L'abréviation CEU est utilisée pour différencier cet ensemble des trois autres principaux groupes répertoriés par le International HapMap Project, soit: les Yoruba d'Ibadan, Nigeria (YRI); les Japonais de Tokyo, Japon (JPT) et les Chinois Han de Beijing, Chine (CHB). Nous avons utilisé cet ensemble de données car il s'agit de celui qui ressemble le plus à notre échantillon, où 80,2 % des participants ayant fourni du matériel génétique ont révélé que leur bagage ethnique et culturel est "Blanc". (Tableau 5) Les fréquences d'allèles mineurs (MAF) sont semblables autant dans l'échantillon complet (tous les participants ayant fourni du matériel génétique) que dans l'échantillon restreint (les participants ayant été initiés au tabagisme).

Ensuite, une analyse d'haplotype n'a pas révélé d'haplotype significativement associé à l'étourdissement ressenti lors de la première cigarette. Un haplotype permet d'avoir une meilleure confiance envers la valeur prédictive de nos données, puisque l'on identifie ainsi une séquence de polymorphismes fortement corrélés qui sont associés à un phénotype. Identifier un haplotype permettrait de mieux quantifier la variabilité génétique au sein d'un gène et ainsi mieux identifier certains individus plus à risque, tout en diminuant le taux de faux positifs inhérent à l'analyse conjointe de centaines de polymorphismes. Notre analyse se concentre que sur trois polymorphismes, alors que les analyses d'haplotypes reposent maintenant, lorsque les devis le permettent, sur des dizaines de polymorphismes. Une analyse d'haplotype concernant 3 polymorphismes localisés sur ou à proximité de *CHRNA6* du chromosome 8 a été effectuée. Aucun haplotype n'est significativement associé avec l'étourdissement dans notre échantillon. Nos résultats sont donc des associations de

marqueurs simples, les allèles mineurs pour lesquels nous avons relevé une association avec le phénotype ne sont pas fortement corrélés entre eux.

Cette analyse d'haplotype a été effectuée en même temps que le calcul de déséquilibre de liaison entre ces mêmes trois polymorphismes. Ces trois polymorphismes sont en déséquilibre allélique, donc l'apparition d'un allèle mineur à une position est corrélée à l'apparition d'un allèle mineur à une autre position. Ces allèles sont donc corrélés si on examine les polymorphismes ensembles. Dans notre étude, les deux polymorphismes localisés en étroite proximité sur le gène *CHRNA6* (rs2304297 et rs7812298) présentent une plus forte corrélation ( $R^2$  élevé) que lorsqu'on calcule le  $R^2$  entre ces polymorphismes et le polymorphisme situé en amont 5' du gène (rs7828365). Dans le cas du gène *CHRNA6*, rs2304297 and rs7812298 sont fortement corrélés ( $R^2 = 0.84$ ). Le linkage pour rs7828365, qui est localisé en amont 5' de *CHRNA6*, et les 2 polymorphismes sur *CHRNA6*, rs7812298 et 2304297, est plus faible. ( $R^2 = 0.56$  et  $R^2 = 0.48$ , respectivement). Bref, les deux polymorphismes localisés sur *CHRNA6* sont fortement corrélés entre eux, alors qu'ils le sont moins avec le polymorphisme localisé en amont du gène.

Notre avons utilisé une procédure additive pour nos analyses, le nombre d'allèles mineurs présent dans le génome d'un individu peut être 0, 1 ou 2, puisqu'il y a deux copies de chaque chromosome. La valeur de la variable génotypique est donc 0, 1 ou 2. Les analyses secondaires consistaient en un second groupe d'analyses qui présume un comportement dominant pour le comportement phénotypique des allèles mineurs. En bref, la présence d'un seul allèle mineur apporte un changement phénotypique égal à la présence de deux allèles mineurs. Nos analyses secondaires révèlent un profil d'associations semblables à la procédure additive. Les polymorphismes associés à l'étourdissement sont significatifs dans les deux cas dans la plupart des cas.

La présence de plusieurs polymorphismes significativement associés au phénotype ajoute du poids et amène à réfléchir à de nouvelles avenues de recherche intéressantes. La procédure standard en épidémiologie génétique est de corriger les seuils de signification en fonction du nombre d'associations testées. Notre devis

d'étude est celui du gène candidat, nos analyses sont plus ciblées et n'impliquent pas des centaines de polymorphismes choisis aléatoirement. La procédure de Bonferroni est fréquemment utilisée pour corriger les analyses de ce type. Dans notre étude, les associations présentent des valeurs  $p$  qui s'approchent de 0,05. Ces associations ne survivent donc pas aux corrections pour tests multiples. Il s'agit d'associations de marqueurs simples (single marker associations), ces associations doivent faire l'objet d'analyses plus poussées, car le nombre élevé d'associations simples testées porte à croire que le taux de faux positifs peut être élevé. Nonobstant l'utilisation d'un devis d'étude de gènes candidats, la présence de dizaines de polymorphismes à analyser nous force à être prudent lors de l'interprétation des données.

### 6.3 Limites de l'étude

Cette étude comporte une limite potentielle liée à la précision et des sources potentielles de biais.

#### 6.3.1 Précision

La précision est l'absence d'erreurs aléatoires ou de variation aléatoire dans l'évaluation de l'estimé. Nous avons dû restreindre notre échantillon pour ne garder que 356 participants pour qui nous avons obtenu de l'information phénotypique et génotypique ainsi que sur les covariables inclus dans les modèles. Cela a pu affecter la précision des estimés d'association entre le nombre d'allèles mineurs et l'étourdissement et donc, la possibilité de détecter des associations d'intérêt. Même si nous avons exclu les polymorphismes présentant une MAF de moins de 5%, un certain nombre de polymorphismes étudiés avaient une MAF que très légèrement supérieure à 5%.

#### 6.3.2 Biais potentiel

##### 6.3.2.1 Biais de sélection

Le biais de sélection découle de différences systématiques dans les caractéristiques de ceux qui participent à l'étude en comparaison de ceux qui ne

participent pas. (Last, 2008) *Dans une étude de cohorte prospective, ce biais pourrait apparaître lorsque le groupe de participants exposés n'est pas comparable au groupe non-exposé ou lorsque le taux de perte au suivi est différent entre les deux groupes.* Dans cet étude, sur un total de 475 participants éligible pour inclusion (qui ont fourni du matériel génétique et répondu à au moins une reprise à la question concernant les symptômes subjectifs négatifs), 119 ont été exclus de l'analyse pour cause de données manquantes, principalement en ce qui concerne l'ethnicité ou l'âge à la première cigarette, soit deux covariables utilisés dans l'analyse primaire. Nous avons comparé les caractéristiques des 356 participants retenus à ceux qui ont été exclus de l'échantillon (n=119) (Tableau en annexe 12). Une proportion plus grande des participants exclus de l'échantillon était de sexe masculin, non-Blancs, utilise le français à la maison et à ne rapporte pas d'étourdissement lors de l'initiation au tabac. Un biais de sélection est possible si les estimates d'intérêts diffèrent dans le groupe exclus.

Parmi les sujets sélectionnés au départ, le biais de sélection dans une étude de cohorte est moins susceptible de se produire par rapport aux études cas-témoins ou transversales. En théorie, les participants à l'étude (exposés ou non exposés) sont sélectionnés avant que l'issue n'apparaisse. Puisque l'issue n'a pas encore eu lieu chez les sujets initialement choisis, il n'y a généralement pas de possibilité qu'un échantillonnage disproportionné par rapport à l'exposition et la maladie ne se produise. Parce que l'issue, par définition, n'a pas encore eu lieu, il n'est pas possible de surévalué ou sous-évalué l'échantillonnage d'une des quatre cellules du tableau de contingence 2 par 2. La possibilité qu'il existe un biais de sélection dans notre étude est réduite.

Dans l'étude présente, nous avons défini une sous-cohorte, qui a été construite à l'aide de plusieurs étapes. Nous avons déterminé qu'une proportion plus grande des participants exclus de l'échantillon est de sexe masculin, non-Blancs, utilise le français à la maison et ne rapporte pas d'étourdissement lors de l'initiation au tabac.

La validité externe découle de la générabilité des données, soit la confiance que l'on porte à nos données de recherche lorsque appliquées au contexte populationnel. Il est utile de se demander si notre échantillon représente bien la population québécoise en général. Il est peut probable que la langue parlée puisse modifier la relation entre les gènes et l'étourdissement. Cependant, le fait d'être non-Blancs pourrait avoir un effet sur l'issue. L'origine ethnique est un facteur que l'on doit contrôler lors des études d'associations génétiques, puisque la fréquence d'allèle mineur (qui découle de notre variable dépendante) varie souvent en fonction du groupe ethnique. Dans notre analyse, nous avons donc inclut une covariable se rapportant à l'origine ethnique auto-rapportée par les participants. Dans notre étude, nous avons cherché à minimiser l'impact de l'ethnicité sur la validité externe de notre étude.

#### 6.3.2.2 Biais d'information

Notre étude est possiblement limitée par des erreurs de classifications dues à l'utilisation de questionnaires auto-rapportés. Par exemple, Griesler et al. (2008) rapporte que les participants plus jeunes, membres d'une minorité ethnique, moins actifs dans des comportements antisociaux et qui ont un environnement familial non-fumeurs sont plus portés à sous-rapporter leur consommation de cigarette lorsque le questionnaire est rempli à la maison. (Griesler, Kandel et al. 2008) Cependant, les erreurs de classifications dans le phénotype de notre étude sont probablement non-différentielles, ce qu'auraient atténué les associations d'intérêt vers l'hypothèse nulle.

Il est possible que des erreurs de génotypage entraînent des erreurs de classification de la variable indépendante. Mais les erreurs génotypiques sont typiquement basses, puisque les plateformes technologiques sont maintenant mieux outillées pour génotyper le génome humain. Tous les marqueurs de notre étude présentaient un taux de réponse des marqueurs supérieur à 98%. Dans le cas de cette étude génotypique, une erreur de classification de l'exposition, par exemple lors d'une mauvaise identification de l'allèle mineur, aurait pour effet de diminuer la force d'association dans notre échantillon. Un biais dans la mesure de l'exposition (le

génotype) et qui résulte en une mesure inexacte entre les groupes de comparaison est donc peu probable. Un tel biais d'information dans la classification de l'exposition résulterait en une tendance vers la nulle, diminuant ainsi la confiance que l'on accorde à nos résultats.

De plus, une mauvaise classification de l'exposition au début de l'étude pourrait être la source d'un biais d'information dans une étude de cohorte. Cependant, puisque les variables relatives à l'issue (l'étourdissement) n'ont pas encore été récoltées lors de l'initiation de la cohorte, il est peu probable qu'une erreur de classification de l'exposition soit une cause de biais. Dans notre étude, le fait de savoir l'issue d'un participant n'a pas d'impact sur la collecte des données se rapportant à l'exposition. Également, le génotype n'est pas une variable qui varie dans le temps. Si la variation de l'exposition est variable dans le temps, nous devons tenir compte de cette situation lors de l'analyse, par exemple en utilisant un seuil d'exposition ou une autre variable qui tient compte de la variabilité de l'exposition dans le temps. Dans notre analyse, nous n'avons donc pas à nous inquiéter de l'effet d'une exposition variable dans le temps, puisque le génotype ne varie pas dans le temps.

Un autre type de biais d'information se rapporte aux erreurs de rappel dans les variables auto-rapportées, plus spécifiquement que la variable de l'issue. Les questionnaires étaient remplis par les participants tous les trois mois, donc les adolescents ont évalué leurs symptômes négatifs subjectifs peu de temps après leur première exposition à la cigarette. Cependant, les participants qui ont essayé la cigarette avant le début de l'étude, soit 237 jeunes sur un total de 702 fumeurs dans l'échantillon total, ont rapporté leurs symptômes dans la cadre de la collecte de données initiale. Le délai entre l'exposition et le questionnaire peut être plus long que trois mois. Ces participants ont pour la plupart essayé la cigarette à l'âge de 12 ans, dans l'année qui a précédé la cueillette initiale en secondaire. L'exactitude du rappel est vraisemblablement plus élevée chez ceux qui ont initié la cigarette durant l'étude, car les participants sont plus âgés, l'intervalle de temps entre l'initiation et la collecte

est de moins de trois mois et les participants savent que des questions se rapportant aux symptômes subjectifs sont incluses dans le questionnaire. Par contre, la plupart des initiateurs précoces ont essayé la cigarette vers l'âge de 12 ans selon nos analyses primaires. Les erreurs de classifications dans les covariables ont peut contribuer à un contrôle imparfait de ces variables dans l'analyse. Également, un biais d'information non-différentiel dans la classification des covariables ou des variables de confusion résulterait en une tendance vers la nulle, donc une sous-estimation de la force de l'association.

### 6.3.2.3 Biais de confusion

Dans le but de réduire la confusion qui peut découler de la « stratification des populations », nous avons inclus l'origine ethnique dans l'analyse multivarié. L'influence du profil ethnique ne peut pas être ignorée lorsqu'on entreprend une analyse génotypique telle que la nôtre. Comme en fait foi le projet HapMap, les membres de communautés ethniques peuvent présenter des profils génétiques de polymorphismes mineurs très variables. Puisque notre étude comporte une variable ethnique, nous avons donc contrôlé notre analyse à l'aide de cette information. Cependant, le nombre de participants qui se définissent par une identité ethnique autre que "Blancs" est faible, nous n'avons pas pu effectuer des analyses stratifiées en fonction de l'ethnicité.

Même si le genre et l'âge à la première cigarette ne soient pas probablement des facteurs de confusion, (c'est-à-dire des variables qui sont associées à la fois à l'exposition et à l'issue), nous les avons inclut notre analyse pour augmenter la précision parce qu'ils sont lies au variable d'issu. Finalement, les erreurs de classifications dans les covariables ont peut contribuer à un contrôle imparfait de ces variables dans l'analyse (*residual confounding*). Dans le cas des covariables, cette confusion résiduelle pourrait expliquer en partie ou en totalité l'association apparente. En effet, les erreurs de classifications dans les covariables cause un ajustement imparfait, ce qui peut masquer la vrai relation et sous-estimé ou sur-estimé la force de l'association entre l'exposition et l'issue.

## 6.4 Perspective en santé publique

### 6.4.1 Directions futures

La recherche en épidémiologie génétique peut apporter de nouveaux défis sur le sujet du tabagisme, tout en nous permettant de mieux répondre aux problèmes occasionnés par cette dépendance. Les politiques publiques relatives aux questions génétiques et à l'utilisation de données provenant de dépistage génétique constituent un champ de recherche relativement récent. (Kaye, Boddington et al. 2010) Pour s'adapter à la nouvelle réalité d'un monde où la génétique vient bouleverser les standards biologiques et sociaux, il est nécessaire de se pencher sur la question et d'étudier les conséquences de ces nouvelles technologies.

### 6.4.2 Implications et politiques publiques de santé publique

Les politiques publiques de santé sont susceptibles d'être conçues à l'aide de données provenant des études génétiques. (Stewart 2010) La génomique et les avancées apportées par l'épidémiologie génétique font l'objet de recherche par les spécialistes des politiques publiques et on ne peut plus ignorer l'apport du dépistage génétique dans nos méthodes de dépistage et de traitement. Un des enjeux majeurs au centre de cette discussion est l'utilisation de tests génétiques offerts directement aux consommateurs et surtout l'apport de l'information génétique personnalisé sur la capacité à changer les habitudes de vie néfastes tel que le tabagisme. (Haga 2010; McBride, Koehly et al. 2010; Stewart 2010) Est-ce qu'un test génétique pourrait bientôt déterminer notre susceptibilité à devenir dépendant à la nicotine ou permettrait-il de déterminer si les outils pharmacologiques peuvent nous aider à cesser de fumer? Ces produits fournissent des informations aux consommateurs, sans s'assurer que ceux-ci ont les connaissances et la littératie de santé (health literacy) nécessaire pour les interpréter correctement. (Haga 2010) Par exemple, un fumeur pourrait perdre la volonté d'arrêter de fumer si un dépistage génétique révèle une forte proportion d'échecs chez les individus présentant un génotype semblable au sien. Cependant, la recherche sur la génétique de la dépendance nous rappelle que le pouvoir prédictif d'un seul allèle est infime et que l'utilisation d'un grand nombre

d'allèles ne permet pas d'améliorer ce pouvoir prédictif. (Changeux 2009; Li 2003; Munafo and Johnstone 2008; Rhee, Hewitt et al. 2003) Ensuite, la littérature nous informe que pour l'instant, la littératie et les connaissances relatives à l'influence des facteurs génétiques sur la dépendance et la cessation tabagique sont très basses. Les patients en clinique de médecine familiale n'ont que peu d'intérêt à recevoir du conseil génétique et sont peu nombreux à vouloir y recourir, même si la plupart des patients sont disposés à recevoir de l'information sur le sujet. (Park, Kleimann et al. 2011; Quaak, Smerecnik et al. 2012) Les fumeurs semblent ambivalents sur la question du dépistage génétique. Une étude nous rapporte que l'intention d'utiliser cet outil est corrélée avec la connaissance des dangers de la dépendance, alors que la peur de connaître les résultats du test est inversement corrélée avec l'intention de recourir au dépistage. Les individus les plus susceptibles de bénéficier de cette mesure sont donc moins enclins à y recourir. (Smerecnik, Quaak et al. 2011) De plus, les cliniciens eux-mêmes font part de leur réticence à utiliser le conseil génétique comme outil de cessation tabagique, citant par le fait même leur manque de formation sur le sujet, la mauvaise utilisation potentielle des résultats et le manque de ressources pour intégrer le conseil génétique dans leur environnement de pratique clinique. (Schnoll et Shields 2011)

Les combinaisons alléliques prédictives ne sont que rarement prévalentes dans la population. (Gartner, Barendregt et al. 2009; Stewart 2010) Un dépistage massif est donc nécessaire pour identifier les quelques individus à risque. (Gordis 2009) Comme le dépistage n'est pas éthiquement justifié lorsqu'un traitement efficace n'est pas disponible, un dépistage génétique n'est pas la meilleure avenue. (Haga 2010) L'élaboration de politiques publiques en génétique du tabagisme en est à ses débuts et est appelée à prendre de plus en plus de place dans les débats et les discussions autour du tabagisme. (Haga 2010; Hall, Gartner et al. 2008; Stewart 2010)

#### 6.4.3 Perspective de recherches futures

La recherche en épidémiologie génétique s'intéresse aux déterminants génétiques des états de santé au sein des populations. (Kaprio 2000; Kaprio 2009)

Cependant, ces recherches peuvent avoir une incidence sur le dépistage et le traitement de pathologies chez les individus. La santé publique génomique met l'accent sur une perspective orientée vers une médecine personnalisée à l'individu. (Stewart 2010) Pourtant, les stratégies d'évaluation des technologies et les systèmes de santé s'appuieront sur une stratégie populationnelle. (Gordis 2009)

Les applications de la génomique en santé publique sont appelées à devenir plus présentes dans les prochaines années. (Haga 2010; Stewart 2010) Les techniques de dépistage génétique sont bénéfiques et leur utilisation dans la cadre de la prévention de certaines pathologies est bien établie. (Feero, Guttmacher et al. 2010) Le dépistage de pathologies causant un fardeau important et ayant un traitement convenable, tel que la phénylcétonurie, est un exemple de situation où la recherche en épidémiologie génétique peut se traduire vers une pratique de santé publique responsable et efficace. (Therrell et Adams 2007; Fernhoff 2009) Néanmoins, l'identification d'un facteur de risque génétique pour une pathologie multifactorielle n'est pas des plus appropriée. (Therrell et Adams 2007; Fernhoff 2009) En effet, le pouvoir prédictif d'un seul allèle n'est pas important et n'est pas utile pour la prévention des pathologies. (Dattani 2009; Gartner, Barendregt et al. 2009) L'application des résultats de la recherche doit s'accompagner de règles précises, sans lesquelles une approche généraliste et malhabile n'est pas sans dangers. (Haga 2010; Williams 2010)

Plusieurs articles soulèvent la question de l'accessibilité des tests de dépistage génétiques chez certaines populations vulnérables. Le coût de ces tests demeure prohibitif pour la majorité de la population, seule une faible minorité peut se permettre de dépenser quelques centaines de dollars sur un test visant à identifier les facteurs de risque du tabagisme. Compte tenu de la complexité des mécanismes de la dépendance à la nicotine, l'utilité d'un simple test basé sur la détermination du génotype des gènes CHRN n'est pas immédiatement apparente. Les associations révélées par la littérature sont de faible force, ils expriment une faible association entre l'étourdissement et les polymorphismes. Chaque polymorphisme n'est qu'une infime pièce dans le puzzle génétique que sont les interactions gènes-environnement.

Certaines études ont cependant évalué des haplotypes de risque, soit une combinaison formée de plusieurs polymorphismes. Ces haplotypes forment peut-être une réponse technique au problème que pose le manque de puissance associé aux polymorphismes simples. Cependant, une série de polymorphismes suspectés doivent être analysés dans le but de déterminer des corrélations d'allèles mineurs. Cela nécessite une compréhension minimale des gènes en action et des outils de génotypage complexes, alors qu'une telle entreprise n'aurait pas été envisagée il y a moins de dix ans.

## 7. Conclusion

Dans le cadre de cette recherche, l'étourdissement ressenti lors de la première cigarette au sein d'une cohorte prospective de jeunes adolescents montréalais a fait l'objet d'analyses en fonction de polymorphismes localisés sur ou près des gènes de la famille CHRN. Notre étude a l'avantage d'être prospective, les participants ont rapporté leurs symptômes peu de temps après l'initiation au tabac, ce qui augmente la validité de nos données sur l'étourdissement. Sur une possibilité de 66 polymorphismes analysés, six ont démontré une association statistiquement significative avec le phénotype à l'étude. Les résultats sont calculés en fonction d'une quantification plus précise de l'étourdissement que ce qui a été précédemment rapporté dans la littérature sur le sujet. Les analyses préliminaires ont également rapporté des associations significatives entre l'étourdissement et plusieurs polymorphismes localisés sur les gènes CHRN. Nous avons ensuite dichotomisé les valeurs de l'étourdissement pour en arriver aux analyses présentées ici. Ces résultats tendent à démontrer l'implication des gènes CHRN dans la cascade d'évènements associés avec l'étourdissement. Comme nous savons que les récepteurs cholinergiques nicotiques sont présents dans le système nerveux central et qu'ils sont sensibles à la nicotine, il est utile de connaître les polymorphismes associés à ce phénotype dans le but de mieux diriger les recherches futures.

## 8. Références

- Aarden, E., I. Van Hoyweghen, et al. (2011). "The paradox of public health genomics: definition and diagnosis of familial hypercholesterolaemia in three European countries." Scand J Public Health 39(6): 634-639.
- Akl, E. A., S. K. Gunukula, et al. (2011). "The prevalence of waterpipe tobacco smoking among the general and specific populations: a systematic review." BMC Public Health 11: 244.
- Alberg, A. J., M. V. Brock, et al. (2005). "Epidemiology of lung cancer: looking to the future." J Clin Oncol 23(14): 3175-3185.
- Alberts, B. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Anderson, D. C., R. L. Yolton, et al. (1995). "The dizzy patient: a review of etiology, differential diagnosis, and management." J Am Optom Assoc 66(9): 545-558.
- Asimit, J. and E. Zeggini (2010). "Rare variant association analysis methods for complex traits." Annu Rev Genet 44: 293-308.
- Association, A. P. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, text revision: DSM-IV-TR, (4th ed.). Washington, American Psychiatric Association.
- Ausems, M., I. Mesters, et al. (2009). "Smoking among Dutch elementary schoolchildren: gender-specific predictors." Health Educ Res 24(5): 818-828.
- Bacanu SA, Nelson MR, Whittaker JC. Comparison of statistical tests for association between rare variants and binary traits. PLoS One. 2012;7(8):e42530. doi: 10.1371/journal.pone.0042530. Epub 2012 Aug 9.
- Bakker et al. (2005) Efficiency and power in genetic association studies. Nature Genetics. 37: 1217-1223.
- Bancej, C., J. O'Loughlin, et al. (2007). "Smoking cessation attempts among adolescent smokers: a systematic review of prevalence studies." Tob Control 16(6): e8.
- Barrett, J. C., B. Fry, et al. (2005). "Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps." Bioinformatics 21(2): 263-265.

- Batra, V., A. A. Patkar, et al. (2003). "The genetic determinants of smoking." Chest 123(5): 1730-1739.
- Benowitz, N. L. (2009). "Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics." Annu Rev Pharmacol Toxicol 49: 57-71.
- Benowitz, N. L. (2010). "Nicotine addiction." N Engl J Med 362(24): 2295-2303.
- Berrettini, W., X. Yuan, et al. (2008). "Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking." Mol Psychiatry 13(4): 368-373.
- Bierut, L. J., P. A. Madden, et al. (2007). "Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence." Hum Mol Genet 16(1): 24-35.
- Breitling, L. P., N. Dahmen, et al. (2009). "Smoking cessation and variations in nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha-5, alpha-3, and beta-4 genes." Biol Psychiatry 65(8): 691-695.
- Breitling, L. P., N. Dahmen, et al. (2009). "Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 4 polymorphisms with nicotine dependence in 5500 Germans." Pharmacogenomics J 9(4): 219-224.
- Broms, U., J. Wedenoja, et al. (2012). "Analysis of Detailed Phenotype Profiles Reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 Gene Cluster Association With Several Nicotine Dependence Traits." Nicotine Tob Res.
- Calafell, F. and N. Malats (2003). "Basic molecular genetics for epidemiologists." J Epidemiol Community Health 57(6): 398-400.
- Carlson, B. (2008). "SNPs—A Shortcut to Personalized Medicine." BioMarket Trends 28(12).
- Changeux, J. P. (2009). "Nicotinic receptors and nicotine addiction." C R Biol 332(5): 421-425.
- Changeux, J. P. (2010). "Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice." Nat Rev Neurosci 11(6): 389-401.
- Chassin, L., C. C. Presson, et al. (1996). "The natural history of cigarette smoking from adolescence to adulthood: demographic predictors of continuity and change." Health Psychol 15(6): 478-484.

- Chen, X., J. Chen, et al. (2009). "Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B(7): 926-933.
- Chu, C. J., Y. C. Yang, et al. (2011). "Association of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-4 polymorphisms with smoking behaviors in Chinese male smokers." Chin Med J (Engl) 124(11): 1634-1638.
- Conner, B. T., G. S. Helleman, et al. (2010). "Genetic, personality, and environmental predictors of drug use in adolescents." J Subst Abuse Treat 38(2): 178-190.
- Consortium, T. I. H. (2007). "A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs." Nature 449(7164): 851-861.
- Conti, D. V., W. Lee, et al. (2008). "Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit gene implicated in a systems-based candidate gene study of smoking cessation." Hum Mol Genet 17(18): 2834-2848.
- Crawford, D. C., D. T. Akey, et al. (2005). "The patterns of natural variation in human genes." Annu Rev Genomics Hum Genet 6: 287-312.
- Crepaldi, L. and A. Riccio (2009). "Chromatin learns to behave." Epigenetics 4(1): 23-26.
- Cutting, G. R. (2010). "Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis." Ann N Y Acad Sci 1214: 57-69.
- Dar, R. and H. Frenk (2010). "Can one puff really make an adolescent addicted to nicotine? A critical review of the literature." Harm Reduct J 7: 28.
- Dattani, M. T. (2009). "The candidate gene approach to the diagnosis of monogenic disorders." Horm Res 71 Suppl 2: 14-21.
- De Luca, V., A. H. Wong, et al. (2004). "Evidence of association between smoking and alpha7 nicotinic receptor subunit gene in schizophrenia patients." Neuropsychopharmacology 29(8): 1522-1526.
- DiFranza, J. R., J. A. Savageau, et al. (2004). "Recollections and repercussions of the first inhaled cigarette." Addict Behav 29(2): 261-272.

- DiFranza, J. R., R. J. Wellman, et al. (2006). "Tobacco promotion and the initiation of tobacco use: assessing the evidence for causality." *Pediatrics* 117(6): e1237-1248.
- Doll, R., R. Peto, et al. (2005). "Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors." *Br J Cancer* 92(3): 426-429.
- Dwyer, J. B., S. C. McQuown, et al. (2009). "The dynamic effects of nicotine on the developing brain." *Pharmacol Ther* 122(2): 125-139.
- Ehringer, M. A., H. V. Clegg, et al. (2007). "Association of the neuronal nicotinic receptor beta2 subunit gene (CHRNA2) with subjective responses to alcohol and nicotine." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(5): 596-604.
- Ehringer, M. A., M. B. McQueen, et al. (2010). "Association of CHRNA genes with "dizziness" to tobacco." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(2): 600-609.
- Etter, J. F., J. C. Hoda, et al. (2009). "Association of genes coding for the alpha-4, alpha-5, beta-2 and beta-3 subunits of nicotinic receptors with cigarette smoking and nicotine dependence." *Addict Behav* 34(9): 772-775.
- Evers, S. E. and M. D. Hooper (1995). "Dietary intake and anthropometric status of 7 to 9 year old children in economically disadvantaged communities in Ontario." *J Am Coll Nutr* 14(6): 595-603.
- Fagerstrom, K. O. (1978). "Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment." *Addict Behav* 3(3-4): 235-241.
- Feero, W. G., A. E. Guttmacher, et al. (2010). "Genomic medicine--an updated primer." *N Engl J Med* 362(21): 2001-2011.
- Feng, Y., T. Niu, et al. (2004). "A common haplotype of the nicotine acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene is associated with vulnerability to nicotine addiction in men." *Am J Hum Genet* 75(1): 112-121.
- Ferketich, A. K., A. G. Wee, et al. (2007). "A measure of nicotine dependence for smokeless tobacco users." *Addict Behav* 32(9): 1970-1975.

- Fernhoff, P. M. (2009). "Newborn screening for genetic disorders." Pediatr Clin North Am 56(3): 505-513, Table of Contents.
- Fertrin, K. Y. and F. F. Costa (2010). "Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment." Expert Rev Hematol 3(4): 443-458.
- Gartner, C. E., J. J. Barendregt, et al. (2009). "Multiple genetic tests for susceptibility to smoking do not outperform simple family history." Addiction 104(1): 118-126.
- Gault, J., J. Hopkins, et al. (2003). "Comparison of polymorphisms in the alpha7 nicotinic receptor gene and its partial duplication in schizophrenic and control subjects." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 123B(1): 39-49.
- Gillen, A. E. and A. Harris (2012). "Transcriptional regulation of CFTR gene expression." Front Biosci (Elite Ed) 4: 587-592.
- Gordis, L. (2009). Epidemiology. Philadelphia, Saunders.
- Gorwood, P., Y. Le Strat, et al. (2012). "Genetics of dopamine receptors and drug addiction." Hum Genet.
- Gotti, C., F. Clementi, et al. (2009). "Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors." Biochem Pharmacol 78(7): 703-711.
- Grady, S. R., R. M. Drenan, et al. (2010). "Structural differences determine the relative selectivity of nicotinic compounds for native alpha 4 beta 2\*-, alpha 6 beta 2\*-, alpha 3 beta 4\*- and alpha 7-nicotine acetylcholine receptors." Neuropharmacology 58(7): 1054-1066.
- Griesler, P. C., D. B. Kandel, et al. (2008). "ADOLESCENTS' INCONSISTENCY IN SELF-REPORTED SMOKING: A COMPARISON OF REPORTS IN SCHOOL AND IN HOUSEHOLD SETTINGS." Public Opin Q 72(2): 260-290.
- Grove, W. M., E. D. Eckert, et al. (1990). "Heritability of substance abuse and antisocial behavior: a study of monozygotic twins reared apart." Biol Psychiatry 27(12): 1293-1304.

- Haberstick, B. C., D. Timberlake, et al. (2007). "Genes, time to first cigarette and nicotine dependence in a general population sample of young adults." Addiction 102(4): 655-665.
- Haga, S. B. (2010). Genome Policy Considerations for Genomic Medicine. Essentials of Genomic and Personalized Medicine. H. W. Geoffrey Ginsburg, Elsevier.
- Hall, W. D., C. E. Gartner, et al. (2008). "The genetics of nicotine addiction liability: ethical and social policy implications." Addiction 103(3): 350-359.
- Haller, G., T. Druley, et al. (2012). "Rare missense variants in CHRNA4 are associated with reduced risk of nicotine dependence." Hum Mol Genet 21(3): 647-655.
- Han, S., B. Z. Yang, et al. (2011). "Association of CHRNA4 polymorphisms with smoking behavior in two populations." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 156B(4): 421-429.
- Hanewinkel, R., B. Isensee, et al. (2011). "Cigarette advertising and teen smoking initiation." Pediatrics 127(2): e271-278.
- Hartz, S. M. and L. J. Bierut (2010). "Genetics of addictions." Psychiatr Clin North Am 33(1): 107-124.
- Heitjan, D. F., M. Guo, et al. (2008). "Identification of pharmacogenetic markers in smoking cessation therapy." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(6): 712-719.
- Hoft, N. R., R. P. Corley, et al. (2009). "Genetic association of the CHRNA6 and CHRNA3 genes with tobacco dependence in a nationally representative sample." Neuropsychopharmacology 34(3): 698-706.
- Hunt, R., Z. E. Sauna, et al. (2009). "Silent (synonymous) SNPs: should we care about them?" Methods Mol Biol 578: 23-39.
- Hutchison, K. E., D. L. Allen, et al. (2007). "CHRNA4 and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome." Arch Gen Psychiatry 64(9): 1078-1086.

- Iwahashi, K. and J. Aoki (2009). "A review of smoking behavior and smokers evidence (chemical modification, inducing nicotine metabolism, and individual variations by genotype: dopaminergic function and personality traits)." Drug Chem Toxicol 32(4): 301-306.
- Javaras, K. N., J. I. Hudson, et al. (2010). "Fitting ACE structural equation models to case-control family data." Genet Epidemiol 34(3): 238-245.
- Jostins, L. and J. C. Barrett (2011). "Genetic risk prediction in complex disease." Hum Mol Genet 20(R2): R182-188.
- Kaprio, J. (2000). "Science, medicine, and the future. Genetic epidemiology." BMJ 320(7244): 1257-1259.
- Kaprio, J. (2009). "Genetic epidemiology of smoking behavior and nicotine dependence." COPD 6(4): 304-306.
- Karp, I., J. O'Loughlin, et al. (2006). "Risk factors for tobacco dependence in adolescent smokers." Tob Control 15(3): 199-204.
- Kaye, J., P. Boddington, et al. (2010). "Ethical implications of the use of whole genome methods in medical research." Eur J Hum Genet 18(4): 398-403.
- Kelley, A. E. (2002). "Nicotinic receptors: addiction's smoking gun?" Nat Med 8(5): 447-449.
- Khoury, M. J. (1999). "Human genome epidemiology: translating advances in human genetics into population-based data for medicine and public health." Genet Med 1(3): 71-73.
- Kingsley, C. B. (2011). "Identification of causal sequence variants of disease in the next generation sequencing era." Methods Mol Biol 700: 37-46.
- LaFramboise, T. (2009). "Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances." Nucleic Acids Res 37(13): 4181-4193.
- Last, J. (2008). Dictionary of Epidemiology Oxford University Press.
- Laucht, M., K. Becker, et al. (2008). "Genetic variation in dopamine pathways differentially associated with smoking progression in adolescence." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 47(6): 673-681.

- Levy, D. E., L. Biener, et al. (2009). "The natural history of light smokers: a population-based cohort study." Nicotine Tob Res 11(2): 156-163.
- Li, M. D. (2003). "The genetics of smoking related behavior: a brief review." Am J Med Sci 326(4): 168-173.
- Li, M. D., R. Cheng, et al. (2003). "A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins." Addiction 98(1): 23-31.
- Li, M. D., Q. Xu, et al. (2010). "Association and interaction analysis of variants in CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster with nicotine dependence in African and European Americans." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B(3): 745-756.
- Lips, E. H., V. Gaborieau, et al. (2010). "Association between a 15q25 gene variant, smoking quantity and tobacco-related cancers among 17 000 individuals." Int J Epidemiol 39(2): 563-577.
- Liu, J. Z., F. Tozzi, et al. (2010). "Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity." Nat Genet 42(5): 436-440.
- Liyanage, K. E., J. R. Burnett, et al. (2011). "Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution." Crit Rev Clin Lab Sci 48(1): 1-18.
- Lueders, K. K., S. Hu, et al. (2002). "Genetic and functional analysis of single nucleotide polymorphisms in the beta2-neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene (CHRNA2)." Nicotine Tob Res 4(1): 115-125.
- Malats, N. and F. Calafell (2003). "Basic glossary on genetic epidemiology." J Epidemiol Community Health 57(7): 480-482.
- Manchia, M., E. Viggiano, et al. (2010). "Smoking in adult attention-deficit/hyperactivity disorder: interaction between 15q13 nicotinic genes and Temperament Character Inventory scores." World J Biol Psychiatry 11(2 Pt 2): 506-510.
- Mannino, D. M. (2009). "Why won't our patients stop smoking? The power of nicotine addiction." Diabetes Care 32 Suppl 2: S426-428.

- Manske, S., Ahmed, R., Wong, K., Youth Smoking Survey Collaborative (2009). "Enquête sur le tabagisme chez les jeunes 2004-2005 - Comparaisons Québec-Canada." INSPQ: 4.
- Mansvelder, H. D., M. De Rover, et al. (2003). "Cholinergic modulation of dopaminergic reward areas: upstream and downstream targets of nicotine addiction." Eur J Pharmacol 480(1-3): 117-123.
- Mansvelder, H. D. and D. S. McGehee (2002). "Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction." J Neurobiol 53(4): 606-617.
- McBride, C. M., L. M. Koehly, et al. (2010). "The behavioral response to personalized genetic information: will genetic risk profiles motivate individuals and families to choose more healthful behaviors?" Annu Rev Public Health 31: 89-103.
- McQuown, S. C. and M. A. Wood (2010). "Epigenetic regulation in substance use disorders." Curr Psychiatry Rep 12(2): 145-153.
- Mineur, Y. S. and M. R. Picciotto (2008). "Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction." Biochem Pharmacol 75(1): 323-333.
- Mooney, M. E. and M. Sofuoglu (2006). "Bupropion for the treatment of nicotine withdrawal and craving." Expert Rev Neurother 6(7): 965-981.
- Morrell, H. E., A. V. Song, et al. (2011). "Earlier Age of Smoking Initiation May Not Predict Heavier Cigarette Consumption in Later Adolescence." Prev Sci.
- Munafo, M. R. and E. C. Johnstone (2008). "Genes and cigarette smoking." Addiction 103(6): 893-904.
- Neale, B. M. (2010). "Introduction to linkage disequilibrium, the HapMap, and imputation." Cold Spring Harb Protoc 2010(3): pdb top74.
- Nestler, E. J. (2005). "Is there a common molecular pathway for addiction?" Nat Neurosci 8(11): 1445-1449.
- Nunez-Smith, M., E. Wolf, et al. (2010). "Media exposure and tobacco, illicit drugs, and alcohol use among children and adolescents: a systematic review." Subst Abus 31(3): 174-192.

- O'Loughlin, J., I. Karp, et al. (2009). "Determinants of first puff and daily cigarette smoking in adolescents." Am J Epidemiol 170(5): 585-597.
- Ott, J., Y. Kamatani, et al. (2011). "Family-based designs for genome-wide association studies." Nat Rev Genet 12(7): 465-474.
- Panagiotou, O. A., E. Evangelou, et al. (2010). "Genome-wide significant associations for variants with minor allele frequency of 5% or less--an overview: A HuGE review." Am J Epidemiol 172(8): 869-889.
- Park, E. R., S. Kleimann, et al. (2011). "Black and White adults' perspectives on the genetics of nicotine addiction susceptibility." Addict Behav 36(7): 769-772.
- Payette, Y., Nguyen, C. T. (2009). "Enquête sur le tabagisme chez les jeunes 2004-2005 - Comparaisons Québec-Canada." INSPQ: 12.
- Paynter, J. and R. Edwards (2009). "The impact of tobacco promotion at the point of sale: a systematic review." Nicotine Tob Res 11(1): 25-35.
- Perkins, K. A., C. Lerman, et al. (2009). "Nicotinic acetylcholine receptor beta2 subunit (CHRNA2) gene and short-term ability to quit smoking in response to nicotine patch." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18(10): 2608-2612.
- Peto, R., A. D. Lopez, et al. (1996). "Mortality from smoking worldwide." Br Med Bull 52(1): 12-21.
- Pomerleau, O. F., C. S. Pomerleau, et al. (2005). "Validation of retrospective reports of early experiences with smoking." Addict Behav 30(3): 607-611.
- Portugal, G. S. and T. J. Gould (2008). "Genetic variability in nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: converging evidence from human and animal research." Behav Brain Res 193(1): 1-16.
- Quaak, M., C. Smerecnik, et al. (2012). "Knowledge, attitudes and preferences regarding genetic testing for smoking cessation. A cross-sectional survey among Dutch smokers." BMJ Open 2: e000321.
- Ray, R., N. Mitra, et al. (2010). "Convergent evidence that choline acetyltransferase gene variation is associated with prospective smoking cessation and nicotine dependence." Neuropsychopharmacology 35(6): 1374-1382.

- Ray, R., R. A. Schnoll, et al. (2009). "Nicotine dependence: biology, behavior, and treatment." Annu Rev Med 60: 247-260.
- Renthal, W. and E. J. Nestler (2008). "Epigenetic mechanisms in drug addiction." Trends Mol Med 14(8): 341-350.
- Rhee, S. H., J. K. Hewitt, et al. (2003). "Genetic and environmental influences on substance initiation, use, and problem use in adolescents." Arch Gen Psychiatry 60(12): 1256-1264.
- Rucktooa, P., A. B. Smit, et al. (2009). "Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures." Biochem Pharmacol 78(7): 777-787.
- Saccone, N. L., S. F. Saccone, et al. (2009). "Multiple distinct risk loci for nicotine dependence identified by dense coverage of the complete family of nicotinic receptor subunit (CHRN) genes." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150B(4): 453-466.
- Saccone, N. L., T. H. Schwantes-An, et al. (2010). "Multiple cholinergic nicotinic receptor genes affect nicotine dependence risk in African and European Americans." Genes Brain Behav.
- Saccone, N. L., J. C. Wang, et al. (2009). "The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans." Cancer Res 69(17): 6848-6856.
- Saccone, S. F., A. L. Hinrichs, et al. (2007). "Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs." Hum Mol Genet 16(1): 36-49.
- Schlaepfer, I. R., N. R. Hoft, et al. (2008). "The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults." Biol Psychiatry 63(11): 1039-1046.
- Schlaepfer, I. R., N. R. Hoft, et al. (2008). "The genetic components of alcohol and nicotine co-addiction: from genes to behavior." Curr Drug Abuse Rev 1(2): 124-134.

- Schnoll, R. A. and A. E. Shields (2011). "Physician barriers to incorporating pharmacogenetic treatment strategies for nicotine dependence into clinical practice." Clin Pharmacol Ther 89(3): 345-347.
- Sherva, R., H. R. Kranzler, et al. (2010). "Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes." Neuropsychopharmacology 35(9): 1921-1931.
- Sherva, R., K. Wilhelmson, et al. (2008). "Association of a single nucleotide polymorphism in neuronal acetylcholine receptor subunit alpha 5 (CHRNA5) with smoking status and with 'pleasurable buzz' during early experimentation with smoking." Addiction 103(9): 1544-1552.
- Shiffman, S., A. Waters, et al. (2004). "The nicotine dependence syndrome scale: a multidimensional measure of nicotine dependence." Nicotine Tob Res 6(2): 327-348.
- Shin, J., S. R. Kayser, et al. (2009). "Pharmacogenetics: from discovery to patient care." Am J Health Syst Pharm 66(7): 625-637.
- Sloane, P. D., R. R. Coeytaux, et al. (2001). "Dizziness: state of the science." Ann Intern Med 134(9 Pt 2): 823-832.
- Small, E., H. P. Shah, et al. (2010). "Tobacco smoke exposure induces nicotine dependence in rats." Psychopharmacology (Berl) 208(1): 143-158.
- Smerecnik, C., M. Quaak, et al. (2011). "Are smokers interested in genetic testing for smoking addiction? A socio-cognitive approach." Psychol Health 26(8): 1099-1112.
- Stankiewicz, P. and J. R. Lupski (2010). "Structural variation in the human genome and its role in disease." Annu Rev Med 61: 437-455.
- Steinberg, M. H. (2008). "Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches." ScientificWorldJournal 8: 1295-1324.
- Stephens, S. H., A. Franks, et al. (2012). "Multiple genes in the 15q13-q14 chromosomal region are associated with schizophrenia." Psychiatr Genet 22(1): 1-14.

- Stevens, V. L., L. J. Bierut, et al. (2008). "Nicotinic receptor gene variants influence susceptibility to heavy smoking." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17(12): 3517-3525.
- Stewart, A., Gwinn, M., Zimmern, R., Khoury, M. (2010). Public Health Genomics. Essentials of Genomic and Personalized Medicine M. D. Geoffrey S. Ginsburg, Ph.D., and Huntington F. Willard, Ph.D., Elsevier.
- Stice, E. and A. Dagher (2010). "Genetic variation in dopaminergic reward in humans." Forum Nutr 63: 176-185.
- Swan, G. E. and C. N. Lessov-Schlaggar (2009). "Tobacco addiction and pharmacogenetics of nicotine metabolism." J Neurogenet 23(3): 262-271.
- Tefferi, A. (2006). "Genomics basics: DNA structure, gene expression, cloning, genetic mapping, and molecular tests." Semin Cardiothorac Vasc Anesth 10(4): 282-290.
- Thanabalasingham, G. and K. R. Owen (2011). "Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY)." BMJ 343: d6044.
- Therrell, B. L. and J. Adams (2007). "Newborn screening in North America." J Inherit Metab Dis 30(4): 447-465.
- Vink, J. M., A. B. Smit, et al. (2009). "Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking." Am J Hum Genet 84(3): 367-379.
- Voineskos, S., V. De Luca, et al. (2007). "Association of alpha4beta2 nicotinic receptor and heavy smoking in schizophrenia." J Psychiatry Neurosci 32(6): 412-416.
- Wanat, M. J., I. Willuhn, et al. (2009). "Phasic dopamine release in appetitive behaviors and drug addiction." Curr Drug Abuse Rev 2(2): 195-213.
- Warren, C. W., J. Lee, et al. (2009). "Evolution of the Global Tobacco Surveillance System (GTSS) 1998-2008." Glob Health Promot 16(2 Suppl): 4-37.
- Wei, J., C. Chu, et al. (2012). "Association study of 45 candidate genes in nicotine dependence in Han Chinese." Addict Behav.

- Wellman, R. J., D. B. Sugarman, et al. (2006). "The extent to which tobacco marketing and tobacco use in films contribute to children's use of tobacco: a meta-analysis." Arch Pediatr Adolesc Med 160(12): 1285-1296.
- Wileyto, P., J. O'Loughlin, et al. (2009). "Distinguishing risk factors for the onset of cravings, withdrawal symptoms and tolerance in novice adolescent smokers." Tob Control 18(5): 387-392.
- Williams, R. (2010). "Genomics in our own hands." Lancet Neurol 9(7): 656-657.
- WHO (2009). WHO report on the global tobacco epidemic, 2009: Implementing smoke-free environments. Genève, WHO Press.
- WHO (2010). Fact sheet N°339: Tobacco. WHO. Genève, WHO Press.
- Williams, R. (2010). "Genomics in our own hands." Lancet Neurol 9(7): 656-657.
- Wipfli, H. and J. M. Samet (2009). "Global economic and health benefits of tobacco control: part 1." Clin Pharmacol Ther 86(3): 263-271.
- Xu, J., M. T. Pato, et al. (2001). "Evidence for linkage disequilibrium between the alpha 7-nicotinic receptor gene (CHRNA7) locus and schizophrenia in Azorean families." Am J Med Genet 105(8): 669-674.
- Yanbaeva, D. G., M. A. Dentener, et al. (2007). "Systemic effects of smoking." Chest 131(5): 1557-1566.
- YSS (2009). Youth Smoking Survey. StatCan. Ottawa.
- Zammit, S., G. Spurlock, et al. (2007). "Genotype effects of CHRNA7, CNR1 and COMT in schizophrenia: interactions with tobacco and cannabis use." Br J Psychiatry 191: 402-407.
- Zeiger, J. S., B. C. Haberstick, et al. (2008). "The neuronal nicotinic receptor subunit genes (CHRNA6 and CHRNB3) are associated with subjective responses to tobacco." Hum Mol Genet 17(5): 724-734.

**Annexes**

Annexe 1: Détails des études épidémiologiques recensées

Tableau 3. Références bibliographie au sujet des associations entre le tabagisme et les polymorphismes.

Auteurs	Devis de recherche	Taille d'échantillon n	Variable dépendante	Mesure de l'effet	Valeur p
<b>CHRNA2</b>					
Conti, Lee et al. 2008	Essai double-aveugle avec contrôle par placebo sur la cessation tabagique	412	Cessation et à 6 mois	OR = 0,4 et 0,31	0,01 et 0,0002
Perkins, Lerman et al. 2009	étude de cohorte avec cross-over	156	Réponse à la patch de nicotine envers la cessation	OR = 2,04	0,05
Ehringer, Clegg et al. 2007	transversale de patients dépendants aux drogues	1068	réponse positive subjective à la nicotine	LRT = 5.250	0.022
Lueders, Hu et al. 2002	transversale	743	status de fumeur ou quantité de nicotine consommée	---	---
Etter, Hoda et al. 2009	transversale	277	Dépendance à la nicotine	---	---
<b>CHRNA3</b>					
Hoft, Corley et al. 2009	étude de cohorte avec cross-over	1051	nombre d'essais de cessation	Chi-carré	0,01 et 0,0002
Zeiger, Haberstick et al. 2008	transversale	1524	Réponses positives, adverses et négatives à la nicotine pour rs4950	LRT = 12.25 / 4.88 / 8.13	0,001 / 0,02 / 0,004
Ehringer, McQueen et al. 2010	étude cas-témoin	1600	étourdissement	Chi-carré	=- 0.01
Bierut, Madden et al. 2007	étude cas-témoin	1929	Dépendance à la nicotine	Chi-carré	0,0000654

Etter, Hoda et al. 2009	transversale	277	Dépendance à la nicotine	---	---
<b>CHRNA6</b>					
Zeiger, Haberstick et al. 2008	transversale	1524	Réponses positives, adverses et négatives à la nicotine pour rs2304297	LRT = 8,97	0,003
Hoft, Corley et al. 2009	étude de cohorte avec cross-over	1051	nombre d'essais de cessation	Chi-carré	0,0044
Ehringer, McQueen et al. 2010	étude cas-témoin	1600	étourdissement	---	---
<b>CHRNA5</b>					
Lips, Gaborieau et al. 2010	transversale	17300	quantité de cigarettes	1,13	95% IC = 0,96-1,34
Stevens, Bierut et al. 2008	transversale	3000	Grands fumeurs vs. Fumeurs légers	OR = 1,45	≤ 0,001
Sherva, Wilhelmsen et al. 2008	étude cas-témoin	435	étourdissement lors de la première cigarette	OR = 1,6	0,01
Heitjan, Guo et al. 2008	Essai double-aveugle avec contrôle par placebo sur la cessation tabagique	436	Abstinent à la fin du traitement	LRT = 0,2	0,019
Liu, Tozzi et al. 2010	transversale	41150	quantité de cigarettes fumées	Chi-carré	9,45 x 10(-19)
Saccone, Wang et al. 2009	étude cas-témoin	2772	Dépendance à la nicotine	OR = 1.42	4,49 x 10(-8)

Berrettini, Yuan et al. 2008	transversale	7500	Risque d'être un grand fumeur	Chi-carré	≤ 0,001
Saccone, Hinrichs et al. 2007	étude cas-témoïn	1929	Dépendance à la nicotine	Chi-carré	6.4 x 10(-4)
Chen, Chen et al. 2009	transversale	815	association avec le score FTND	OR = 0,116	0.0068
<b>CHRNA7</b>					
Zammit, Spurlock et al. 2007	étude cas-témoïn avec patients schizophrènes	659	usage de produits du tabac	OR = 0.89	95% CI 0.53-1.48
Manchia, Viggiano et al. 2010	étude cas-témoïn avec patients souffrant de TDA/H	90	Status de fumeur	---	---
Saccone, Schwantes-An et al. 2010	transversale	2772	Dépendance à la nicotine	OR = 1,12	0,072
Stephens, Franks et al. 2012	étude cas-témoïn	468	Status de fumeur	inconnu	inconnu
<b>CHRNA3</b>					
Chen, Chen et al. 2009	transversale	815	association avec le score FTND	OR = 0,139	0,0237
Bierut et al. 2008	transversale	1929	Dépendance à la nicotine	OR = 1,63	9,71E-05
Mooney and Sofuoglu 2006	transversale	inconnu	Risque d'être un grand fumeur	inconnu	inconnu

Saccone, Wang et al. 2009	étude cas-témoïn	2772	Dépendance à la nicotine	OR = 0,67	0,006386
Schlaepfer, Hoft et al. 2008	transversale	1075	âge à la première cigarette / âge initiation au tabagisme	Chi-carré	0,017 / 0,014
<b>CHRNA4</b>					
Li, Xu et al. 2010	transversale	1366	association avec le score FTND	---	---
Stevens, Bierut et al. 2008	transversale	3000	Grands fumeurs vs. Fumeurs légers	OR = 1,33 / 0,72 / 0,72 / 0,73	Tous P = -0,001
Breitling, Dahmen et al. 2009	transversale	1446	cessation tabagique	OR = 1,3	= -0,05
Sherva, Kranzler et al. 2010	Transversale avec unités familiales	1858	Dépendance à la nicotine	---	---
Haller, Druley et al. 2012	transversale	2765	Dépendance à la nicotine (afro-américain et européen)	OR = 0,31 / 0,69	0,0025 / 0,023
Saccone, Saccone et al. 2009	transversale	1929	Dépendance à la nicotine	OR = 1,28	3,274E-04
Schlaepfer, Hoft et al. 2008	transversale	1075	âge à la première cigarette / âge initiation au tabagisme	Chi-carré	0,024 / 0,0242
Broms, Wedenoja et al. 2012	étude de cohorte de jumeaux	1428	association avec Nicotine Dependence Syndrome Scale	Chi-carré	Tous P ≤ 0,001

**CHRNA4**

Breitling, Dahmen et al. 2009	transversale	1446	cessation tabagique	OR = 1,3	≤ 0,05
Voineskos, De Luca et al. 2007	transversale de patients schizophrénique	241	nombre de cigarette par jour	Chi-carré	0,02
Ehringer, Clegg et al. 2007	transversale de patients dépendants aux drogues	1068	réponse positive subjective à la nicotine	---	---
Wei, Chu et al. 2012	transversale	270	association avec le score FTND	Chi-carré	≤ 0,001
Etter, Hoda et al. 2009	transversale	277	Dépendance à la nicotine	---	---
Hutchison, Allen et al. 2007	transversale	316	association avec le score FTND	OR = 0,26 / 0,28	0,02 / 0,05
Saccone, Saccone et al. 2009	transversale	1929	Dépendance à la nicotine	---	---
Saccone, Schwantes-An et al. 2010	transversale	2772	Dépendance à la nicotine	OR = 1,30 – 1,38	≤ 0,01
Feng, Niu et al. 2004	transversale	901	Vulnérabilité à la dépendance à la nicotine	---	---
Chu, Yang et al. 2011	étude cas-témoïn	936	association avec le score FTND	Chi-carré	≤ 0,03
Han, Yang et al. 2011	transversale	3039	association avec le score FTND	Chi-carré	≤ 0,001

**Annexe 2: Questionnaire sur les phénotypes d'initiation au tabac**

29. Quel âge avais-tu lorsque tu as respiré profondément jusque dans tes poumons plus d'une bouffée de cigarette ?

J'avais  ans  
inscris l'âge

OU

Je ne me souviens pas

30. Les PREMIÈRES FOIS que tu as respiré profondément jusque dans tes poumons la fumée de cigarette, jusqu'à quel point as-tu ressenti les symptômes suivants... ?

	Pas du tout	Un peu	Beaucoup
Toux	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Brûlement dans la gorge	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Mal de ventre	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Battements cardiaques rapides	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Étourdissements	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Mal de cœur	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Mal de tête	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
Autre(s) → Nomme-le(s)			
a) _____	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>
b) _____	<input type="checkbox"/> <sub>1</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>2</sub>	<input type="checkbox"/> <sub>3</sub>

31. Dirais-tu que tu es une personne qui a essayé de fumer la cigarette, mais qui a cessé de fumer complètement et (probablement) pour toujours ?

<sub>1</sub> Non

<sub>2</sub> Oui

<sub>7</sub> Je ne sais pas

**Annexe 3: Polymorphismes génotypés et retenus pour analyses**

Tableau 4. Liste des polymorphismes localisés sur ou en périphérie des gènes CHRN. Polymorphismes en équilibre Hardy-Weinberg seulement.

CHRNA3	CHRNA4	CHRNA5	CHRNA6	CHRNA7	CHRNB2	CHRNB3	CHRNB4
rs1051730	rs1044396	rs11636732	rs16891604	rs10438342	rs1127309	rs6987323	rs11636605
rs12899226	rs2093107	rs12903575	rs17621710	rs11071512	rs2072659	rs7012713	rs12914008
rs12904589	rs3787138	rs16969968	rs2304297*	rs11071530	rs2072660		rs17487223
rs3743077*	rs4522666	rs569207	rs7812298*	rs11633380	rs3811450		rs1948
rs4887069	rs4809538		rs7828365*	rs11852956	rs4845652		rs6495309
rs578776	rs6011747			rs12438995	rs9427092		rs950776
	rs6089899			rs12904458	rs9427094		
	rs735501			rs12906868	rs9616		
	rs755203			rs16956223			
	rs755204*			rs17604861			
	rs9680065			rs2611603			
				rs2611605			
				rs4779565			
				rs6494212			
				rs7175581			
				s7178176*			
				rs8028396			
				rs868437			
				rs885071			

\*  $p < 0.05$

**Annexe 4: Statistiques descriptives de l'échantillon**

Tableau 5. Comparaison des participants exclus de l'échantillon final en fonction de ceux inclut dans notre échantillon final.

Variable	n=119	n=356	valeur p**
<b>Genre</b>			
Masculin, %	53,9	35,2	<b>0.000</b>
<b>Origine culturelle et ethnique</b>			
Blanc, %	77,3	84,8	<b>0.004</b>
<b>Â à l'initiation</b>			
âge moyen (SD)	13.4 (1.4)	13.2 (1.2)	0.150
<b>Langue utilisée à la maison</b>			
français, %	59,1	48,2	<b>0.007</b>
<b>Pays de naissance</b>			
Canada, %	96,5	96,8	0.549
<b>Vit avec la mère au début de l'étude</b>			
%	97,4	95,2	0.249
Si oui, fume-t-il ?, %	26,1	30,6	0.357

<b>Vit avec le père au début de l'étude</b>					
	, %	95,6	81,5	0,112	
	Si oui, fume-t-il ?, %	30	33.1	0,391	
	pas du tout, %				
<b>Étourdissement lors de la première expérimentation avec la cigarette</b>		71	60,7	<b>0,033</b>	
	un peu, %	24,2	27		
	beaucoup, %	4,8	12,4		

\*pourcentage de réponses valides, exclus les valeurs manquantes  
 \*\*test d'échantillon t indépendant pour les variables continues, chi-carré  
 pour les comparaison de proportions

**Annexe 5: OR et intervalle de confiance pour les associations entre le génotype et le  
phénotype**

Tableau 6. Rapport de cotes (OR) et intervalle de confiance 95% pour les associations entre l'étourdissement à la première inhalation de cigarette et des polymorphismes localisés sur les gènes CHRN. Régression logistique multinomiale ajustée pour le genre, l'ethnicité et l'âge à la première cigarette. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2007.

Gène	Polymorphisme	Allèle mineur	OR (95% IC)	Valeur p
<i>CHRNA3</i>	rs3743077	T	1.40 (1.02, 1.90)	0.0359
<i>CHRNA4</i>	rs755204	T	1.85 (1.05, 3.27)	0.0345
<i>CHRNA6</i>	rs7812298	A	0.54 (0.36, 0.81)	0.0027
<i>CHRNA6</i>	rs2304297	C	0.59 (0.40, 0.86)	0.0057
<i>CHRNA7</i>	rs7178176	T	1.51 (1.06, 2.15)	0.0233
<i>CHRNA6</i>	rs7828365	A	0.58 (0.36, 0.95)	0.0293

Note: La catégorie de référence se compose de participants n'ayant rapportés aucuns symptômes lors de la première inhalation de fumée de cigarette.

**Annexe 6: Analyses préliminaires et associations entre le génotype et différents degrés du phénotype**

**Tableau 7.** Analyses préliminaires des associations entre un polymorphisme et le degré d'étourdissement ressenti, testé par degré d'intensité du phénotype ("un peu" contre "aucun", "beaucoup" contre "aucun") et en fonction de la population à l'étude

Gène	SNP	Participants ayant été initié durant l'étude (n=273)		Participants déjà initiés au début de l'étude (n=202)		Tous les participants (n=475)		Participants ayant été initié durant l'étude (n=273)		Participants déjà initiés au début de l'étude (n=202)		Tous les participants (n=475)	
		OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value	OR	P-value
CHRNA3	rs1051730	0.7249	0.920	<b>0,0051</b>	<b>0,347</b>	0,0715	0,69	1.0000	1.000	<b>0,0498</b>	<b>0,435</b>	0,2918	0,748
	rs3743077	0.2847	1.248	<b>0,023</b>	<b>2,031</b>	<b>0,0295</b>	<b>1,476</b>	0.2238	1.544	0,6536	1,167	0.3758	1.234
CHRNA4	rs755204	<b>0,0094</b>	<b>2,719</b>	0,6114	1,279	<b>0,0127</b>	<b>2,171</b>	0.7267	1.304	0,8297	0,875	0.7361	1.175
CHRNA5	rs16969968	0.6863	0.909	<b>0,0051</b>	<b>0,347</b>	0,0736	0,69	0.9278	1.037	<b>0,0498</b>	<b>0,435</b>	0,3298	0,764
CHRNA6	rs7812298	0.4726	0.832	<b>0,0139</b>	<b>0,333</b>	<b>0,0188</b>	<b>0,585</b>	0.1097	0.417	0,2583	0,592	<b>0,0177</b>	<b>0,454</b>
CHRNA7	rs2304297	0.7047	0.912	<b>0,0218</b>	<b>0,403</b>	<b>0,0428</b>	<b>0,647</b>	0.0730	0.375	0,2356	0,614	<b>0,0153</b>	<b>0,464</b>
	rs8028396	0.1604	1.356	<b>0,0349</b>	<b>0,496</b>	0.8214	1.042	0.5272	0.783	0,3058	0,69	0.7344	0.919
	rs12438995	<b>0,0250</b>	<b>0,398</b>	0,2995	1,609	0,5176	0,833	0.9047	1.067	0,6703	1,262	0,8648	1,063
CHRNA2	rs16956223	<b>0,0309</b>	<b>0,428</b>	0,3755	1,454	0,6579	0,891	0.9802	0.987	0,8981	0,936	0,8051	0,916
	rs2072659	0.4517	1.307	<b>0,0078</b>	<b>0,201</b>	0.8525	0.944	0.6310	0.696	0,0849	0,348	0.5243	0.746
CHRNA3	rs3811450	0.1182	1.916	<b>0,0142</b>	<b>0,192</b>	0.7881	0.911	0.6561	1.392	<b>0,045</b>	<b>0,201</b>	0.4819	0.683
	rs4950	0.9188	1.024	0,1372	0,606	0,3327	0,826	0.2353	0.562	<b>0,0379</b>	<b>0,377</b>	<b>0,0096</b>	<b>0,417</b>
	rs7017612	0.9593	1.013	<b>0,0111</b>	<b>0,347</b>	0.1444	0.724	0.6533	0.812	<b>0,0491</b>	<b>0,399</b>	0.0760	0.557

Régression logistique polytomique, 3 covariables (genre, ethnicité et âge à la première cigarette)

**Annexe 7: Fréquences d'allèles mineurs dans la population à l'étude**

Tableau 8. Allèles mineurs et majeurs des polymorphismes sur CHRN dans la population HapMap CEU et notre population

Marqueu r	Allèle majeur	Allèle mineur	MAF HapMap CEU	MAF échantillon complet	MAF échantillon restreint
rs10109429	C	T	0,05	0,08	0,06
rs10438342	C	T	0,30	0,36	0,35
rs1044396	T	C	0,42	0,50	0,47
rs1051730	C	T	0,39	0,31	0,31
rs11071512	G	A	0,06	0,07	0,06
rs11071530	C	T	0,11	0,12	0,10
rs1127309	G	A	0,32	0,30	0,29
rs11633380	C	T	0,03	0,03	0,03
rs11636605	C	T	0,18	0,23	0,21
rs11636732	T	G	0,05	0,04	0,05
rs11852956	T	C	0,18	0,22	0,22
rs12438995	T	C	0,12	0,13	0,12
rs12899226	A	C	0,04	0,04	0,05
rs12903575	G	A	0,05	0,04	0,05
rs12904458	A	G	0,48	0,48	0,47
rs12904589	T	C	0,03	0,04	0,04
rs12906868	T	G	0,15	0,12	0,12
rs12914008	C	T	0,03	0,04	0,04
rs16891604	G	T	0,06	0,05	0,06
rs16956223	C	T	0,16	0,14	0,13
rs16969968	G	A	0,39	0,31	0,30
rs17487223	C	T	0,43	0,32	0,31
rs17604861	C	T	0,05	0,06	0,06
rs17621710	C	T	0,10	0,11	0,09
rs1948	G	A	0,33	0,35	0,35
rs2072659	G	C	0,06	0,09	0,08
rs2072660	C	T	0,24	0,25	0,23
rs2093107	G	A	0,08	0,10	0,11
rs2304297	G	C	0,25	0,26	0,26
rs2611603	A	C	0,38	0,35	0,34
rs2611604	G	A	0,10	0,10	0,10
rs2611605	C	T	0,24	0,16	0,16
rs3743077	C	T	0,41	0,40	0,43
rs3787138	T	C	0,09	0,15	0,13
rs3811450	C	T	0,07	0,06	0,05
rs4522666	A	G	0,38	0,42	0,40
rs4779565	G	T	0,43	0,40	0,39
rs4809538	G	A	0,25	0,26	0,26
rs4845652	C	T	0,09	0,09	0,09
rs4887069	T	C	0,21	0,28	0,24
rs4950	T	C	0,23	0,26	0,25
rs4954	T	C	0,03	0,06	0,04
rs569207	G	A	0,20	0,25	0,22
rs578776	G	A	0,25	0,32	0,29

<b>rs6011747</b>	T	C	0,04	0,06	0,05
<b>rs6089899</b>	T	C	0,38	0,46	0,44
<b>rs6494212</b>	G	A	0,31	0,29	0,30
<b>rs6495309</b>	C	T	0,19	0,24	0,22
<b>rs6987323</b>	C	G	0,03	0,06	0,06
<b>rs7012713</b>	G	A	0,07	0,03	0,03
<b>rs7017612</b>	T	G	0,18	0,20	0,19
<b>rs7175581</b>	C	T	0,41	0,43	0,42
<b>rs7178176</b>	C	T	0,22	0,22	0,23
<b>rs735501</b>	T	C	0,14	0,15	0,16
<b>rs755203</b>	T	C	0,40	0,49	0,47
<b>rs755204</b>	C	T	0,03	0,07	0,06
<b>rs7812298</b>	G	A	0,21	0,23	0,23
<b>rs7828365</b>	G	A	0,14	0,13	0,14
<b>rs8028396</b>	C	T	0,41	0,40	0,40
<b>rs868437</b>	A	G	0,27	0,32	0,30
<b>rs885071</b>	C	A	0,19	0,20	0,20
<b>rs9427092</b>	T	C	0,17	0,20	0,20
<b>rs9427094</b>	A	G	0,45	0,48	0,49
<b>rs950776</b>	A	G	0,35	0,34	0,35
<b>rs9616</b>	T	A	0,27	0,28	0,69
<b>rs9680065</b>	T	C	0,36	0,39	0,61

---

**Annexe 8: Association entre les polymorphismes et le phénotype, modèle dominant et récessif**





	rs9427092	1	154553722	0.20	C	T	0.2092	1.332	0.851	2.085
	rs9427094	1	154557685	0.48	A	A	0.7231	0.914	0.555	1.505
	rs9616	1	154555733	0.30	A	T	0.6696	0.910	0.589	1.406
<i>CHRNA3</i>	rs6987323	8	42597232	0.06	G	C	0.8409	1.079	0.512	2.278
	rs7012713	8	42592303	0.03	A	G	0.3568	1.484	0.641	3.439
<i>CHRNA4</i>	rs11636605	15	78928878	0.21	T	C	0.2190	0.749	0.473	1.187
	rs12914008	15	78923505	0.04	T	C	0.1491	1.812	0.808	4.061
	rs17487223	15	78923987	0.32	T	C	0.2877	0.791	0.514	1.218
	rs1948	15	78917399	0.35	A	G	0.8463	1.044	0.673	1.621
	rs6495309	15	78915245	0.21	T	C	0.4916	0.857	0.551	1.331
	rs950776	15	78926018	0.35	G	A	0.2410	1.301	0.838	2.019

Abbreviations : Chr. , chromosomeMAF, minor allele frequency; Min, minor allele; OR, odds ratio for each additional copy of the minor allele; P indicates the P-value

Table 10. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) for the associations between selected SNPs in CHRN genes and dizziness at first inhalation of cigarette smoke. Recessive model. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2005

Gene	SNP	Chr.	Position (37.3)	MAF	Minor allele	Major allele	P	OR	CI95 low	CI95 High
CHRNA3	rs1051730	15	78894339	0.31	T	C	0.3602	1.431	0.664	3.083
	rs12899226	15	78887438	0.05	C	A	-	-	-	-
	rs12904589	15	78897581	0.04	C	T	-	-	-	-
	rs3743077	15	78894896	0.43	T	C	0.8221	1.065	0.616	1.839
	rs4887069	15	78909070	0.24	C	T	0.8650	1.080	0.445	2.624
	rs578776	15	78888400	0.29	A	G	0.8751	1.062	0.503	2.240
	rs1044396	20	61981134	0.47	C	T	0.8641	1.044	0.635	1.718
	rs2093107	20	61993942	0.11	A	G	0.9232	1.094	0.177	6.740
	rs3787138	20	61979224	0.13	C	T	<b>0.0466</b>	<b>5.061</b>	1.024	>20.00
	rs4522666	20	61974480	0.40	G	A	0.8890	0.957	0.515	1.777
CHRNA4	rs4809538	20	61970176	0.26	A	G	0.5297	1.343	0.535	3.371
	rs6011747	20	61964667	0.06	C	T	0.7659	1.528	0.094	>20.00
	rs6089899	20	61999308	0.44	C	T	0.4256	1.234	0.736	2.069
	rs735501	20	62000202	0.16	C	T	0.3872	1.897	0.444	8.101
	rs755203	20	61994264	0.47	C	T	0.5644	1.162	0.698	1.933
	rs755204	20	61994165	0.06	T	C	0.9841	>20.00	0.001	>20.00
	rs9680065	20	61967037	0.39	C	T	0.9844	0.994	0.538	1.836
	rs11636732	15	78854923	0.05	G	T	-	-	-	-
	rs12903575	15	78881087	0.05	A	G	-	-	-	-
	rs16969968	15	78882925	0.30	A	G	0.3602	1.431	0.664	3.083
CHRNA5	rs569207	15	78873119	0.23	A	G	0.8520	1.100	0.405	2.983
	rs16891604	8	42618713	0.06	T	G	0.7896	1.461	0.090	>20.00
	rs17621710	8	42615560	0.10	T	C	0.9874	0.001	0.001	>20.00
	rs2304297	8	42608199	0.26	C	G	0.1240	0.444	0.158	1.249
	rs7812298	8	42608579	0.23	A	G	0.2394	0.498	0.156	1.591
	rs7828365	8	42629314	0.14	A	G	0.1726	0.227	0.027	1.912
	rs10438342	15	32402046	0.35	T	C	0.8604	1.060	0.554	2.026
	rs11071512	15	32345139	0.07	A	G	0.9865	0.001	0.001	>20.00
	rs11071530	15	32359972	0.10	T	C	0.5054	0.461	0.047	4.497
	rs11633380	15	78877150	0.03	T	C	-	-	-	-
CHRNA6	rs16891604	8	42618713	0.06	T	G	0.9874	0.001	0.001	>20.00
	rs17621710	8	42615560	0.10	T	C	0.9874	0.001	0.001	>20.00
	rs2304297	8	42608199	0.26	C	G	0.1240	0.444	0.158	1.249
	rs7812298	8	42608579	0.23	A	G	0.2394	0.498	0.156	1.591
	rs7828365	8	42629314	0.14	A	G	0.1726	0.227	0.027	1.912
	rs10438342	15	32402046	0.35	T	C	0.8604	1.060	0.554	2.026
	rs11071512	15	32345139	0.07	A	G	0.9865	0.001	0.001	>20.00
	rs11071530	15	32359972	0.10	T	C	0.5054	0.461	0.047	4.497
	rs11633380	15	78877150	0.03	T	C	-	-	-	-
	CHRNA7	rs16891604	8	42618713	0.06	T	G	0.9874	0.001	0.001
rs17621710		8	42615560	0.10	T	C	0.9874	0.001	0.001	>20.00
rs2304297		8	42608199	0.26	C	G	0.1240	0.444	0.158	1.249
rs7812298		8	42608579	0.23	A	G	0.2394	0.498	0.156	1.591
rs7828365		8	42629314	0.14	A	G	0.1726	0.227	0.027	1.912
rs10438342		15	32402046	0.35	T	C	0.8604	1.060	0.554	2.026
rs11071512		15	32345139	0.07	A	G	0.9865	0.001	0.001	>20.00
rs11071530		15	32359972	0.10	T	C	0.5054	0.461	0.047	4.497
rs11633380		15	78877150	0.03	T	C	-	-	-	-

	rs11852956	15	32403330	0.22	C	T	<b>0.0391</b>	<b>2.942</b>	1.055	8.200
	rs12438995	15	32405130	0.12	C	T	0.9875	0.001	0.001	>20.00
	rs12904458	15	32419788	0.47	G	A	0.4271	0.807	0.475	1.371
	rs12906868	15	32444995	0.12	G	T	-	-	-	-
	rs16956223	15	32410783	0.14	T	C	0.3817	0.372	0.041	3.405
	rs17604861	15	32403369	0.07	T	C	0.9851	10.00	0.001	10.00
	rs2611603	15	32441532	0.34	C	A	0.7015	0.881	0.461	1.684
	rs2611605	15	32441593	0.16	T	C	0.8106	0.872	0.284	2.679
	rs4779565	15	32390070	0.39	T	G	0.0744	1.729	0.947	3.155
	rs6494212	15	32385119	0.30	A	G	<b>0.0317</b>	<b>2.343</b>	1.078	5.093
	rs7175581	15	32385467	0.42	T	C	0.2203	0.689	0.380	1.250
	rs7178176	15	32443813	0.23	T	C	0.7479	1.182	0.426	3.278
	rs8028396	15	32396721	0.40	T	C	0.5505	0.823	0.434	1.561
	rs868437	15	32324277	0.30	G	A	0.1412	0.545	0.243	1.223
	rs885071	15	32324576	0.20	A	C	0.9331	0.952	0.302	2.997
<b>CHRNA2</b>	rs1127309	1	154561925	0.29	A	G	0.8555	0.937	0.465	1.887
	rs2072659	1	154548521	0.08	C	G	0.8133	1.399	0.086	>20.00
	rs2072660	1	154548721	0.23	T	C	0.7937	0.885	0.353	2.215
	rs3811450	1	154551032	0.05	T	C	0.8102	0.744	0.066	8.341
	rs4845652	1	154538205	0.09	T	C	-	-	-	-
	rs9427092	1	154553722	0.20	C	T	0.1365	2.245	0.774	6.510
	rs9427094	1	154557685	0.48	G	A	0.6606	0.898	0.556	1.451
	rs9616	1	154555733	0.30	A	T	0.8346	1.094	0.470	2.549
<b>CHRNA3</b>	rs6987323	8	42597232	0.06	G	C	-	-	-	-
	rs7012713	8	42592303	0.03	A	G	0.8251	1.370	0.084	>20.00
	rs11636605	15	78928878	0.21	T	C	0.5451	0.715	0.241	2.121
	rs12914008	15	78923505	0.04	T	C	-	-	-	-
	rs17487223	15	78923987	0.32	T	C	0.3337	1.431	0.692	2.962
	rs1948	15	78917399	0.35	A	G	0.6322	1.174	0.608	2.267
	rs6495309	15	78915245	0.21	T	C	0.6829	1.237	0.446	3.433
	rs950776	15	78926018	0.35	G	A	0.5459	1.227	0.632	2.383

Abbreviations : MAF, minor allele frequency; Min, minor allele; OR, odds ratio for each additional copy of the minor allele; P indicates the P-value

**Annexe 9: OR par géotypes**

Tableau 11. Rapport de cotes (OR) et intervalle de confiance 95% pour les associations entre l'étourdissement à la première inhalation de cigarette et des polymorphismes localisés sur les gènes CHRN. Comparaison aa vs. AA et Aa vs. AA. Régression logistique multinomiale ajustée pour le genre, l'ethnicité et l'âge à la première cigarette. Nicotine Dependence in Teens Study 1999-2007.

Gène	Polymorphisme	Allèle mineur	Homozygote rare vs. Homozygote commun OR (95% IC)	Valeur p	Hétézygote vs. Homozygote commun OR (95% IC)	Valeur p
<i>CHRNA3</i>	rs3743077	T	0,55 (0.29, 1,05)	0,067	0,64 (0.39, 1,06)	0,078
<i>CHRNA4</i>	rs755204	T	0,33 (0.03, 3.70)	0,349	0,53 (0.28, 0.00)	0,051
<i>CHRNA6</i>	rs7812298	A	<b>6.78 (1.49, 30.81)</b>	<b>0,003</b>	<b>1.61 (1.00, 2.56)</b>	<b>0,045</b>
<i>CHRNA6</i>	rs2304297	C	<b>4.08 (1.32, 12.64)</b>	<b>0,007</b>	1.52 (0.96, 2.41)	0,075
<i>CHRNA7</i>	rs7178176	T	<b>0.37 (0.15, 0.95)</b>	<b>0,035</b>	0.73 (0.46, 1.16)	0,18
<i>CHRNA6</i>	rs7828365	A	--	--	1.45 (0.85, 2.47)	0,17

Note: La catégorie de référence se compose de participants n'ayant rapportés aucun symptômes lors de la première inhalation de fumée de cigarette.

**Annexe 10 : Comparaison des caractéristiques de bases des 356 participants de l'échantillon final contre les participants de l'échantillon complet.**

Tableau 12. Comparaison des participants dans l'échantillon final contre ceux de l'échantillon complet. NDIT.

Variable	n=356	n=937	valeur p**
<b>Genre</b>			
Masculin, %	35,2	53,2	0.000
<b>Origine culturelle et ethnique</b>			
Blanc, %	84,8	75,2	0.000
<b>Âge à l'initiation</b>			
âge moyen (SD)	13.4 (1.4)	13.2 (1.2)	0.150
<b>Langue utilisée à la maison</b>			
français, %	43,8	50,6	0.000
<b>Pays de naissance</b>			
Canada, %	96,8	90,6	0.000
<b>Déjà fumé &gt; 100</b>			
%	63,8	16,6	0.000
<b>Vit avec la mère au début de l'étude</b>			
%	95,3	96,4	0,421
Si oui, fume-t-il ?, %	30,6	23	0,012
<b>Vit avec le père au début de l'étude</b>			
, %	81,4	83	0,291
Si oui, fume-t-il ?, %	28	22,4	0,065
<b>Étourdissement lors de la première expérimentation avec la cigarette</b>			
pas du tout, %	60,7	60,4	0,472
un peu, %	27	29,8	
beaucoup, %	12,4	9,9	

\*pourcentage de réponses valides, exclus les valeurs manquantes

\*\*test d'échantillon t indépendant pour les variables continues, chi-carré pour les comparaisons de proportions

**Annexe 11 : Comparaison des participants exclus de l'échantillon final et ceux inclus dans l'échantillon final.**

Tableau 13. Comparaison des caractéristiques des participants inclus et exclus de l'échantillon analytique.

	Inclus (n=356)	Exclus (n=119)	valeur p**
Masculin, %	35,2	53,9	0.000
Blanc, %	84,8	77,3	0.004
Age à l'initiation, moyen (SD)	13.2 (1.2)	13.4 (1.4)	0.150
Français, %	48,2	59,1	0.007
Ne au Canada, %	96,8	96,5	0.549
Vit avec la mère, %	95,2	97,4	0,249
Mère fume, %	30,6	26,1	0,357
Vit avec le père, %	81,5	95,6	0,112
Père fume, %	33,1	30,0	0,391
Étourdissement avec première cigarette, %			0,033
pas du tout,	60,7	71,0	
un peu	27,0	24,2	
beaucoup	12,4	4,8	

\*les pourcentages excluent les valeurs manquantes

\*\*test d'échantillon t indépendant pour les variables continues, chi-carré pour les comparaisons de proportions