

Thèse de doctorat préparée au laboratoire des maladies dermatologiques du
Centre National de Génotypage dans le cadre de l'École Doctorale SITE EVRY
de l'université d'Evry-Val d'Essonne

Thèse N°
2008EVRY0034

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR en sciences

Spécialité : **Biologie cellulaire et moléculaire**

Présentée et soutenue publiquement

par

Tiphaine Oudot

le 13 janvier 2009

Titre:

**Recherche de gènes de prédisposition à une maladie à hérédité
complexe: le psoriasis**

Directeur de thèse: **Dr. Judith Fischer**

Jury:

Docteur. Florence Demenais,	Présidente du jury
Professeur. Martine Bagot,	Rapporteur
Docteur. Nadem Soufir,	Rapporteur
Docteur. Elisabeth Petit-Teixeira,	Examineur
Professeur. Bernard Prum,	Examineur
Professeur. Jean-François Zagury,	Examineur

Résumé

Le psoriasis est une maladie complexe inflammatoire et chronique de la peau, due à une forte composante génétique et des facteurs environnementaux. Seule l'implication d'un locus majeur de prédisposition au psoriasis au niveau du chromosome 6p21, nommé *PSORS1*, a été démontrée dans diverses populations lors d'études de liaison et d'association. Ce locus ne serait responsable que de 30 à 50% de la part génétique. L'objectif de ma thèse était donc d'identifier les autres facteurs génétiques, en particulier dans un échantillon d'une population d'origine française. Pour identifier les loci, une étude de liaison a été réalisée, découvrant des régions potentielles en 12q, 14q, 16p, 20p, en plus de celle en 6p. Deux loci en 6p et 20p ont surtout été étudiés, amenant à la caractérisation de deux gènes, *HLA-C* et *ADAM33*. En parallèle, une stratégie de "gènes candidats" a été appliquée, conduisant à suspecter un rôle probable pour les gènes *FLG*, *TGM5*, *CARD15* et *CYLD* et à confirmer celui de *SLC12A8* dans l'étiologie du psoriasis.

Mot-clefs

psoriasis, polymorphismes, liaison, association, déséquilibre de liaison

Abstract

The psoriasis is a complex chronic inflammatory skin disease due to a strong genetic component as well as environmental factors. The only major locus for psoriasis susceptibility implicated to date, named *PSORS1* on chromosome 6p21, has been demonstrated in various populations in linkage and association studies. It could nevertheless be responsible for up to 50% of the genetic contribution to the disease. The aim of my thesis was thus to identify the other genetic factors, in particular in the French population. To identify the loci, a linkage study was carried out, showing possible regions on 12q, 14q, 16p, 20p, in addition to that on 6p. Two loci on 6p and 20p were studied in more detail, revealing the contribution of the two genes, *HLA-C* and *ADAM33*. In parallel, a "candidate gene" strategy was undertaken, exposing a probable role of *FLG*, *TGM5*, *CARD15* and *CYLD* genes and a confirmed role of *SLC12A8* gene in the etiology of psoriasis.

Keywords

psoriasis, polymorphisms, linkage, association, linkage disequilibrium

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier ma directrice de thèse, Dr Judith Fischer, de m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ces années de thèse et de m'avoir donnée la possibilité de travailler sur ce sujet selon différents axes de recherche, m'amenant ainsi à acquérir de nombreuses connaissances et compétences utiles pour mon futur professionnel.

Je voudrais également remercier les rapporteurs et les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement et affectueusement toutes celles et tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'aboutissement de ce manuscrit :

Mes anciennes collègues, mais surtout amies, Caroline et Florence, pour leur disponibilité, leur aide quotidienne, leur présence et leur sens de l'écoute à tous les niveaux (boulot, vie privée..) ! Etant une grande pipelette, j'espère que ces années n'ont pas été trop dures pour vous !! Vous le savez, j'espère vous "embêter" encore pendant des années et voir vos bout'chous grandir !!!

Mon ancienne collaboratrice sur ce sujet, Fabienne, pour son amitié et pour son énorme soutien et aide autant sur le plan scientifique que sur le plan privé. Ton appui m'est toujours précieux et je ne l'oublie pas ! Merci également à Antoinette !

Mes nombreux collègues du CNG ou du G2, pour leur gentillesse, leur soutien ou leur aide ponctuelle ou continue, encore à ce jour. Un grand merci à Sophie pour son aide scientifique, à Steven pour nos discussions devant les résultats par SNPlex, à Benoit pour ses conseils sur la vie, à Christophe pour m'avoir pardonnée de l'avoir battu, à Jean-Guy pour son soutien et nos trajets dans le train, aux filles de l'équipe de Fumi pour leurs écoutes, à Sylvie pour les pauses thés à la menthe avec Maher et Redouane, à Robert pour ses conseils, à Olivier et Benoit pour leurs nombreuses aides informatiques, à Christian R. pour ses conseils, à

Simon H. et Mickaël G. pour m'avoir consacré du temps et, tous ceux ou celles qui se sont maintenant embarqués dans un autre navire comme Stéphanie, Carole, Claire, Thomas, Patrick, Nelly, Gwendoline, Maher, Hafida, Diane, Laetitia.. Merci également à Roubila de m'avoir embarquée dans ses instants de motivation et à Vitor pour son soutien et pour nos discussions autour d'un café ou thé. Merci à vous deux, mes co-danseurs aux Génofolies!!

Mes coéquipiers des Doctoriales 2005. Christina, Lorène, Isabelle, Delphine, Ons, Walid, Etienne, Xavier, Charles, Benoit, Benjamin, nous ne sommes plus tous dans le même bateau, chacun suivant sa route mais je n'oublierai pas nos longues fiestas ou diners autour d'excellents plats. Ce rendez-vous entre docto-rants m'a permis entre autres de me faire une véritable amie, Coralie! Un énorme merci pour ton aide et ta présence lors des moments difficiles!! Bref, pour ton amitié qui, j'espère, durera encore longtemps! Tu es aussi toujours la bienvenue pour nous préparer un succulent repas à la maison!

Mes amies de longues dates, Céline et Maud, pour leur gentillesse, leur appui et leur amitié. Céline, que puis-je rajouter à nos 15 ans d'amitié! J'adore nos longues discussions lors de nos promenades dans le parc ou dans le quartier ou devant un McDo!! Maud, et oui ça fait maintenant 8 ans que l'on se connaît! Merci de m'avoir comprise et soutenue il y a un an et demi et j'espère fêter encore de nombreuses fois avec toi nos joies au champagne et ce sera quand tu veux pour un prochain voyage au bout du monde!!

Ma famille, plus particulièrement à mes parents et leurs amis pour leur suivi et surtout pour leur patience durant ces dernières années. Merci Maman d'avoir été là dans les moments difficiles et d'avoir fait de nombreux compromis, surtout sur le rangement. Promis! Je rangerai avant mon départ!! Merci Papa de m'avoir entraînée quelques jours chaque année dans des endroits superbes pour me détendre et de m'avoir gardé une place dans ton étude. Je remercie d'ailleurs toutes les personnes de l'étude qui m'ont chaleureusement acceptée. Je vous remercie aussi pour votre soutien financier, me facilitant ainsi à gérer en partie cette dernière année. Merci à Alain pour son aide et pardon pour les caprices d'un fan de pizza! Un grand merci à Jean-François pour son aide et sa disponibilité dans les derniers moments!

Mon compagnon, Anouar, pour son amour, sa présence, sa patience et son soutien quotidien pendant ces trois ans. Ces deux dernières années ont été très compliquées et chargées en émotions, j'espère que les prochaines le seront mais de manière différente, plus sereinement.

Je ne peux pas énumérer l'ensemble des qualités que mes plus proches ont eu

à mon égard lors des derniers moments car la liste serait trop longue. Juste merci de votre patience et de m'avoir supportée !! Et promis, je compte être plus sereine et disponible prochainement.

Et enfin, à mes deux amours, Flocon et maintenant Saphyr, qui ont énormément contribué, par leur présence et leur amour, à mon équilibre dans les moments difficiles !! Flocon, tu me manques !

Table des matières

Table des matières	1
1 INTRODUCTION	5
1 LES MALADIES HUMAINES	5
2 LES STRATEGIES D'ETUDE D'UNE "MALADIE COMPLEXE"	11
2.1 Les stratégies préliminaires des études génétiques	11
2.1.1 Mise en évidence d'une composante familiale . . .	11
2.1.2 Mise en évidence d'une composante génétique . . .	13
2.2 Les stratégies d'étude	15
2.2.1 Différentes approches possibles	15
2.2.2 Marqueurs utilisés	17
2.2.3 Méthodes utilisées	21
3 EXEMPLE D'UNE MALADIE A HEREDITE COMPLEXE : LE PSORIASIS	35
3.1 Les données épidémiologiques	36
3.2 Les symptômes cliniques	36
3.2.1 Différents sous-types	36
3.2.2 Symptômes associés	39
3.3 L'organe atteint, la peau	39
3.4 La pathogenèse du psoriasis	41
3.4.1 Kératinocytes	42
3.4.2 Angiogenèse	42
3.4.3 Cellules immunitaires	43
3.4.4 Interactions cellulaires	43
3.5 Les différents traitements	48
3.5.1 Traitements locaux	50
3.5.2 Photothérapie	51
3.5.3 Traitement systémique	53
3.5.4 Traitement avec des agents biologiques	53

3.6	La génétique du psoriasis	56
3.6.1	Caractère "Multifactoriel"	56
3.6.2	Composante génétique	57
3.6.3	Identification des gènes	59
3.6.4	Modèles animaux	75
4	OBJECTIF DE LA THESE	79
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	81
1	LES FAMILLES	81
2	ANALYSE DE LIAISON	83
2.1	Génotypage des microsatellites	83
2.1.1	Contexte	83
2.1.2	Principe	86
2.1.3	Technique	86
2.1.4	Contrôle de qualité	87
2.2	Méthodes des analyses de liaison	90
2.2.1	Analyses paramétriques	90
2.2.2	Analyses non paramétriques	91
3	ANALYSE D'ASSOCIATION	93
3.1	Principe des études d'association	93
3.2	Séquençage	95
3.2.1	Contexte sur le locus HLA-C	95
3.2.2	Principe	97
3.2.3	Technique	97
3.3	Génotypage par la méthode Taqman	101
3.3.1	Contexte	101
3.3.2	Principe	103
3.3.3	Technique	105
3.4	Génotypage par la méthode SNPlex	105
3.4.1	Contexte sur les gènes candidats	105
3.4.2	Principe	108
3.4.3	Technique	109
3.5	Contrôle qualité général	111
3.6	Méthodes des analyses d'association	112
3.6.1	Test d'association basé sur les familles : FBAT (<i>Family-based association test</i>)	112
3.6.2	Test d'association basé sur les modèles logistiques à effets mixtes (LNMs : <i>Logistic-Normal Models</i>)	114
3.6.3	Analyse après stratification des familles selon le locus <i>PSORS1</i>	115
3	RESULTATS ET DISCUSSION	117

1	ANALYSE DE LIAISON : IDENTIFICATION DE LOCI	117
1.1	Première étude : Présentation de l'article 1	117
1.1.1	Introduction	117
1.1.2	Conclusion	129
1.2	Approfondissement de l'étude	129
1.2.1	Introduction	129
1.2.2	Résultats	131
1.2.3	Conclusion	136
2	ANALYSE D'ASSOCIATION : ETUDE DE DEUX REGIONS MAJEURES	139
2.1	Locus HLA en 6p : association avec l'allèle HLA- <i>Cw6</i>	139
2.1.1	Association indirecte	139
2.1.2	Association directe	141
2.2	Locus 20p : association avec le gène <i>ADAM33</i>	143
2.2.1	Présentation de l'article 2 : <i>ADAM33</i> , un nouveau gène candidat de prédisposition au psoriasis	143
2.2.2	Conclusion	159
3	ANALYSE D'ASSOCIATION : ETUDE DE GENES CANDIDATS	160
3.1	Introduction (Article 3, manuscrit soumis)	160
3.2	Résultats	163
3.2.1	Protéines intervenant dans l'immunité et dans l'in- flammation	163
3.2.2	Protéines intervenant dans les mécanismes de la peau	201
3.3	Conclusion	227
4	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	233
	Appendices	237
	Bibliographie	287
	Table des figures	321
	Liste des tableaux	323

Chapitre 1

INTRODUCTION

1 LES MALADIES HUMAINES

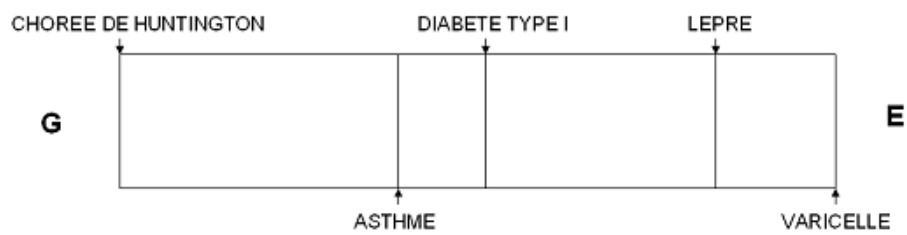
Les impacts sociaux et économiques des maladies humaines sont considérables dans tous les pays. L'identification des facteurs responsables de ces maladies devrait permettre de mettre au point des méthodes de diagnostic et des thérapies nécessaires pour guérir, prévenir ou limiter la gravité des symptômes. L'enjeu est donc important.

Les maladies humaines se distinguent selon la part respective des facteurs environnementaux et des facteurs héréditaires qui sont à leur origine. Certaines pathologies sont "purement d'origine environnementale" ou "avec un faible rôle de la composante génétique" comme les blessures ou les maladies infectieuses/bactériennes. D'autres maladies, dont la transmission suit les lois de Mendel, sont "purement d'origine génétique". Deux exemples de maladies mendéliennes sont la chorée de Huntington et la dystrophie musculaire de Duchenne. Deux d'origine environnementale sont la variole et la grippe. Entre ces deux extrêmes, se situent d'autres maladies qui sont dépendantes des deux composantes à des degrés divers (environnement et hérédité). Cela concerne les maladies communes telles que l'obésité ou le diabète. Schématiquement, toute maladie peut se situer sur un diagramme tel que celui présenté dans la figure 1.1 [Feingold et al., 1998]. Cependant, cette classification n'est pas si évidente car dans certains cas de maladies mendéliennes, certains facteurs environnementaux influencent l'âge d'apparition de la maladie ou la gravité des symptômes. A l'inverse dans les maladies infectieuses, l'existence par exemple d'un récepteur cellulaire à un virus va conditionner la sensibilité de la cellule à ce virus.

Au cours des trente dernières années, les avancées technologiques en biologie moléculaire et en génétique humaine ont favorisé l'augmentation rapide des

FIG. 1.1: Action conjointe de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux dans le déterminisme de quelques maladies

Le pôle génétique et le pôle environnemental se trouvent à gauche (G) et à droite (E) respectivement. (Adapté du livre : [Feingold et al., 1998])

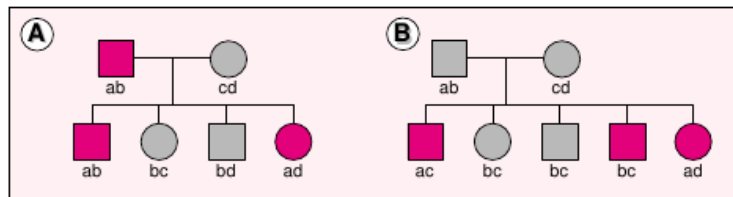


connaissances sur le vivant. Ce savoir a entre autres permis une meilleure compréhension de l'étiologie de nombreuses maladies humaines, amenant ainsi, pour certaines, à des possibilités de traitements voire à une guérison. Par exemple, le traitement ou la prévention efficace contre certaines maladies infectieuses est possible grâce au développement de l'hygiène, à la prise d'antibiotiques ou de vaccins. Les outils de la biologie moléculaire ont surtout été appliqués pour comprendre les maladies d'origine génétique.

Ces maladies, dues à des anomalies du génome, sont habituellement classées en quatre grands groupes :

- les maladies héréditaires à transmission mendélienne : ce sont des maladies rares dues à des mutations affectant un seul gène à la fois (d'où le terme monogénique), responsables de l'apparition du phénotype. Ces maladies sont nombreuses (>6500) et souvent très handicapantes, évolutives et mortelles. Les plus fréquentes d'entre elles ont une incidence faible comme la mucoviscidose (1/3000). Plusieurs modes de transmission sont décrits en fonction des chromosomes impliqués (autosomale ou lié à X) et du nombre de chromosomes mutés qui est nécessaire pour développer la maladie (à caractère "dominant" (une seule copie mutée du gène suffit) ou "récessif" (deux copies mutées du gène, une transmise par le père et l'autre par la mère)). Il y a donc des maladies autosomiques récessives (la mucoviscidose dans laquelle le gène *CFTR* est muté), autosomiques dominantes (la maladie de Huntington dans laquelle le gène *HTT* est muté), récessives liées à X (la myopathie de Duchenne, gène *DMD*) et dominantes liées à X (le rachitisme vitamine D-résistant, gène *PHEX*).
- les maladies mitochondriales dont l'hérédité est maternelle. Elles s'appliquent à des gènes de l'ADN des organites produisant l'énergie au coeur des cellules, les mitochondries. Puisque seuls les ovocytes apportent les mitochondries de l'embryon en gestation, seules les femmes sont à même de transmettre les particularités des mitochondries à leurs enfants.
- les maladies avec aberration chromosomique dues à des réarrangements chromosomiques (modification dans la structure et le nombre des chromosomes), héréditaires ou non (accidentelles).
L'existence d'anomalies de nombre (aneuploïdie) est plus fréquente. Deux possibilités fréquentes sont :
 - l'hypodiploïdie (<46, souvent 45 chromosomes) dont la plus courante est la monosomie (un chromosome au lieu de deux). La monosomie peut concerner un des chromosomes autosomes (c'est une aberration chromosomique létale), ou un des chromosomes sexuels (exemple : le syndrome

FIG. 1.2: **Maladie mendélienne et agrégation familiale dues à des facteurs de risque**
A. Transmission autosomique dominante d'une mutation rare (allèle a)
B. Ségrégation d'un facteur de risque (allèle a), le père transmetteur n'est pas atteint (pénétrance incomplète), le fils ayant un génotype bc est atteint (phénocopie). (D'après [Campion, 2001])



de Turner).

- L'hyperdiploïdie (>46 chromosomes (de 47 à 49) dont la plus courante est la trisomie (trois chromosomes au lieu de deux). Elle peut concerner un ou plusieurs chromosomes autosomes (trisomie 21, 18, 13 et 15) ou un des chromosomes sexuels (exemple : syndrome de Klinefelter (47, YXX), trisomie X (47, XXX) et aussi 47, XYY). La plus fréquente reste la trisomie 21 responsable du mongolisme, due à la présence de trois chromosomes 21. La fréquence est d'une naissance sur 700, atteignant même 1 sur 60 lorsque l'âge maternel dépasse 40 ans.

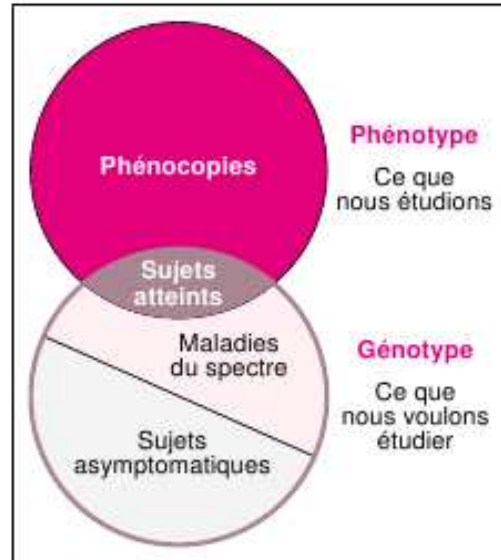
Les anomalies de structure peuvent affecter un seul chromosome ou plusieurs chromosomes. Les principales anomalies de structure touchant un seul chromosome sont la délétion (caractérisée par une double rupture d'un chromosome avec perte d'un fragment, par exemple la délétion 15q11-q13 associée au syndrome de Prader-Willi), une duplication (segment présent en double exemplaire), l'inversion (retournement à 180° d'un segment). Dans le cas où plusieurs chromosomes sont impliqués, les translocations dues à l'échange d'un segment chromosomique avec un autre sont les plus fréquentes comme par exemple les trisomies 21 par translocation du chromosome 21 sur les chromosomes 14 et 22.

- Et enfin, les maladies multifactorielles qui sont causées par l'altération de plusieurs gènes, dont la répartition chez les apparentés ne suit pas les lois de Mendel, et sont influencées par des facteurs environnementaux. Ces maladies sont très fréquentes et touchent de nombreuses populations. Citons notamment le cancer, le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle.

Maladies complexes

Les maladies communes telles que le diabète de type 1 et 2, les maladies cardiovasculaires ou les maladies auto-immunes ont tendance à présenter une agrégation familiale. Elles ont même parfois un mode de transmission héréditaire en apparence monogénique dans certaines familles mais dans la grande majorité des cas, la répartition de la maladie chez les descendants d'un sujet atteint ne suit pas les lois de Mendel. Elles sont causées par une interaction entre une composante génétique multigénique et des facteurs du milieu, d'où leur nom de maladies multifactorielles ou de maladies à hérédité complexe. Cette complexité n'entraîne donc pas une corrélation directe entre le génotype et le phénotype, comme observée pour les maladies monogéniques (Figure 1.2) [Campion, 2001]. Les gènes impliqués dans ces maladies complexes sont dits gènes de prédisposition car chacun des variants de ces gènes, considérés isolément, n'est ni indispensable ni suffisant pour entraîner la maladie. Contrairement aux trois autres groupes précédemment décrits où la mutation causale de la maladie est délétère, les allèles impliqués

FIG. 1.3: Non-concordance entre phénotype et génotype dans le cas d'un facteur de risque génétique (D'après [Campion, 2001])



TAB. 1.1: Exemples de quelques maladies multifactorielles où le facteur de risque génétique a été confirmé (D'après [Campion, 2001])

Maladie	Gènes
Maladie d'Alzheimer	Apolipoprotéine E
Hypertension artérielle	Angiotensinogène
Diabète insulino-dépendant	- Insuline - HLA
Diabète non-insulino dépendant	Calpaïne 10
Emphysème	α 1 antitrypsine
Thrombose veineuse	Facteur V Leiden
Hypertriglycéridémie	Lipoprotéine lipase
Sclérose en plaques	HLA
Polyarthrite rhumatoïde	HLA
Spondylarthrite ankylosante	HLA
Maladie cœliaque	HLA

dans ce type de maladie sont souvent des polymorphismes qui confèrent, dans un contexte génétique et environnemental particulier, une prédisposition accrue à la maladie. En outre, un même allèle peut être un facteur de prédisposition à une maladie et de résistance à une autre. Et, même au sein d'une généalogie, la co-ségrégation entre le génotype et la maladie est loin d'être parfaite. Sans tenir compte de mécanismes particuliers de transmission tels que le mécanisme d'empreinte parentale et/ou le phénomène d'anticipation, cette complexité observée peut être en partie due à l'implication de nombreux gènes dans la maladie, à la présence de phénotopies (des individus atteints mais non porteurs des génotypes "à risque") et à l'existence d'une pénétrance incomplète des gènes (des individus sains mais porteurs des génotypes "à risque") (Figure 1.3) [Campion, 2001]. En conséquence, dans ce type de maladie, la correspondance génotype/phénotype est, pour un gène donné, très complexe, rendant l'identification des gènes impliqués difficile. Malgré les nombreuses connaissances en biologie et en génétique humaine, peu de facteurs de risque génétique pour ces maladies ont pu être identifiés, comparativement au grand nombre de gènes trouvés mutés dans les maladies mendéliennes (Tableau 1.1). En date de début novembre 2008, plus de 2700 gènes ont été identifiés sur les plus de 6500 maladies génétiques répertoriées (www.ncbi.nlm.nih.gov/omim).

2 LES DIFFERENTES STRATEGIES LORS DE L'ETUDE D'UNE "MALADIE COMPLEXE"

Etant donné la complexité des maladies multifactorielles, trois questions sont essentielles pour permettre leurs études : 1) La maladie est-elle familiale ? 2) Cette tendance familiale est-elle due à des facteurs génétiques ? Si oui, quel est le mode de transmission de la pathologie ? 3) Quels sont les gènes impliqués ? Ainsi, afin de répondre à ces questions, il convient d'adopter des stratégies d'analyse adéquates.

2.1 Les stratégies préliminaires des études génétiques

2.1.1 Mise en évidence d'une composante familiale

Etudes d'agrégation familiale

Pour démontrer l'existence d'une prédisposition familiale à une maladie, on étudie la prévalence de la maladie chez les différents membres de la famille. Par exemple, la prévalence de la maladie chez les apparentés du premier degré des personnes atteintes (parents, frères, soeurs ou enfants) doit être supérieure à celle chez les apparentés du premier degré de témoins sains ou à celle de la population générale [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005]. L'agrégation familiale est souvent mesurée par le risque relatif "familial", appelé λ_s ("s" pour

TAB. 1.2: Fréquence de quelques maladies inflammatoires et auto-immunes dans la population générale et chez les germains de premier degré du probant ainsi que les valeurs du risque relatif (λ_s)

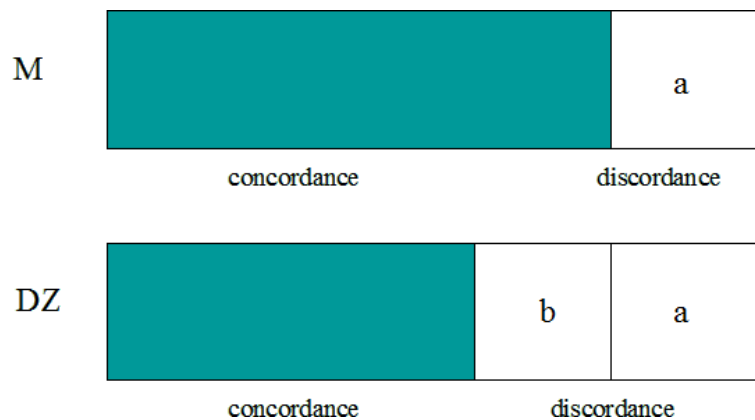
Disease : maladie, Population frequency : fréquence dans la population, Sibling risk : risque chez les germains, λ_s : risque relatif "familial", MHC λ_s : risque relatif du complexe majeur d'histocompatibilité, RA : polyarthrite rhumatoïde, GD : maladie de Graves-Basedow, T1D : diabète de type 1, AS : spondylarthrite ankylosante, MS : sclérose en plaques, UC : colite ulcéraire, SLE : lupus érythémateux systémique, CD : maladie de Crohn, CeD : maladie coeliaque, PBC : cirrhose biliaire primitive. (D'après [Bowcock, 2005])

Disease	Population frequency	Sibling risk	λ_s	MHC λ_s
Psoriasis	2.8	16	6	1.4
RA	0.8	8	10	1.6
GD	1.0	7.5	12	NA
T1D	0.4	6	15	2.4
AS	0.13	7	54	4.2
MS	0.1	2	20–40	2.4
UC	0.1	1.2	12	8.3
SLE	0.1	2	20	NA
CD	0.06	1.2	20	1.3
Narcolepsy	0.06	1	12	NA
CeD	0.05	3	60	5.2
PBC	0.008	0.8	100	NA
Vitiligo	0.4%	6%	24	NA

FIG. 1.4: Concordance et discordance du phénotype chez des jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ)

Il y a concordance du phénotype lorsque les deux membres d'une paire de jumeaux sont atteints et discordance du phénotype lorsqu'un seul est atteint. La case notée "a" correspond à des différences de milieu, la case notée "b" tient aux différences de génotypes entre jumeaux DZ.

(Adapté du livre : [Feingold et al., 1998])



sibling, c'est-à-dire frères ou soeurs). Il définit le rapport de la prévalence de la maladie chez les apparentés du premier degré sur la prévalence de la maladie dans la population générale (ou chez les apparentés des témoins). Cette valeur de λ_s représente le risque pour un individu ayant un germain atteint de développer la maladie. Lorsque la valeur de λ_s est égale à 1, il n'existe aucune agrégation familiale. Pour la majorité des maladies mendéliennes, λ_s varie entre 100 à 500 comme pour la mucoviscidose [Feingold et al., 1998]. Pour les maladies complexes, il varie surtout entre 10 et 50. Certains exemples de maladies auto-immunes sont décrits dans le tableau 1.2. Différents paramètres λ peuvent être calculés pour différents degrés de parenté (deuxième degré (oncles, tantes ou grands-parents) ou troisième degré (cousins germains)). Si la fréquence de la maladie est étudiée chez les apparentés du deuxième degré, elle sera certes plus faible mais sera toujours supérieure à celle observée dans la population générale. En revanche, cette agrégation familiale reflète les effets conjoints des facteurs génétiques et environnementaux communs aux membres d'une même famille. L'action de facteurs du milieu familial commun (hérédité socioculturelle) peut parfois être confondue à celle d'une hérédité biologique. Si la ressemblance familiale est supposée n'être que d'origine génétique, la valeur du risque relatif est un indicateur de la part génétique d'un trait.

Afin de confirmer si cette tendance familiale est due à l'existence de facteurs génétiques, une des méthodes les plus utilisées est l'étude des jumeaux monozygotes et dizygotes.

2.1.2 Mise en évidence d'une composante génétique

Etudes des jumeaux

Pour confirmer l'existence d'une prédisposition génétique, le taux de concordance d'une maladie chez les jumeaux monozygotes (MZ) doit être supérieur au taux de concordance de la maladie chez les jumeaux dizygotes (DZ) [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005]. Le taux de concordance est le rapport entre le nombre de paires de jumeaux où les deux jumeaux sont atteints et le nombre total de paires. Ainsi, toute discordance entre des jumeaux MZ qui sont génétiquement identiques est d'origine environnementale, à l'exception de certains cas tels que les mutations somatiques post-zygotiques. Toute discordance entre les jumeaux DZ qui partagent en moyenne la moitié de leur patrimoine génétique peut être d'origine génétique et/ou environnementale. Le principe de ces études est de supposer que les facteurs environnementaux interviennent de la même manière sur les deux types de jumeaux (Figure 1.4). Ainsi, la différence du taux de concordance observée entre les types de jumeaux est d'origine génétique. Si le taux de concordance entre les jumeaux MZ est égal au taux de concordance entre les jumeaux DZ, le fait d'avoir 50% ou 100% des gènes en commun n'in-

tervient pas sur l'incidence de la maladie. Il n'y a donc pas de facteur causal génétique. En revanche, plus la différence entre les deux taux de concordance est élevée, plus la part génétique est importante dans la maladie.

Études d'enfants adoptés

Un autre type d'études, les études d'enfants adoptés, peut être aussi envisagé, bien que plus difficile à réaliser [Feingold et al., 1998, Feingold, 2005]. L'adoption entraîne la séparation des enfants de leurs parents biologiques et leur intégration dans un autre milieu environnemental. Elle dissocie ainsi la composante génétique de la composante environnementale familiale. Une des enquêtes possibles consiste à comparer la fréquence de la maladie chez les parents biologiques et les parents adoptants, selon que l'enfant adopté est malade ou non.

Si ces différentes études ont permis de suggérer l'intervention de facteurs génétiques, la présence de ces facteurs peut être testée de façon plus formelle par des analyses de ségrégation.

Analyse de ségrégation

L'analyse de ségrégation, ou analyse de transmission familiale d'un phénotype donné (trait qualitatif (maladie) ou quantitatif) permet d'estimer les corrélations familiales pour ce phénotype (mode de transmission, pénétrance, fréquence allélique) et cherche à mettre en évidence l'effet d'un gène transmis de façon mendélienne (classiquement appelé gène majeur ou à effet fort) parmi l'ensemble des facteurs génétiques et environnementaux impliqués [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005]. Le principe général de cette méthode est donc de déterminer, par des tests statistiques, le mode de transmission expliquant le mieux les distributions familiales observées du phénotype étudié. Différents modèles de transmission familiale ont été décrits et incluent l'influence, conjointement ou non, de facteurs environnementaux et génétiques dans les différentes hypothèses concernant le mode de transmission du phénotype (autosomique ou lié au chromosome X, dominant ou récessif). Le modèle le mieux adapté à l'étude des maladies multifactorielles est le modèle régressif (Bonney, 1986), qui est fondé sur l'effet d'un gène majeur et de corrélations familiales résiduelles, liées à des facteurs génétiques et/ou environnementaux [Bonney, 1986, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005].

Cette analyse reste néanmoins compliquée dans le cas de maladies multifactorielles en raison de l'existence d'une hétérogénéité phénotypique et génétique. L'hétérogénéité phénotypique est l'observation qu'une même maladie peut se présenter sous différentes formes cliniques. La pénétrance incomplète et l'expressivité variable décrivent ce fait. Elle s'explique en partie par l'hétérogénéité allélique ou génique. L'hétérogénéité allélique correspond au cas où des mutations différentes

d'un même gène sont la cause de la même maladie. Dans certains cas, différentes mutations d'un même gène sont à l'origine de formes cliniques ou de maladies différentes. Par exemple, des mutations différentes du gène de la bêta-globine sont la cause de la drépanocytose et de la bêta-thalassémie. L'hétérogénéité génique ou non allélique est le fait que des mutations de gènes différents peuvent être la cause de la même maladie. Par exemple, l'hypercholestérolémie familiale est due entre autres à des mutations des gènes codant le récepteur des LDL (*LDLR*) ou de son ligand l'apolipoprotéine B-100 (*APOB*). Cependant, d'autres facteurs souvent mal connus interviennent, des gènes modificateurs qui modulent le phénotype, et des facteurs du milieu. Ainsi, une même maladie peut être due à divers gènes et à des interactions génétiques et environnementales différentes.

Si dans les maladies multifactorielles, un nombre limité de déficits est transmis de façon mendélienne, connus et inconnus des cliniciens, il est important de les identifier pour permettre la découverte de gènes majeurs dans le déterminisme du phénotype (trait). En effet, dans certaines familles, une analyse de ségrégation montre que la "maladie complexe" a un mode héréditaire de type monogénique. Cela a permis de localiser et d'identifier des gènes majeurs de prédisposition tels que *BRCA2* pour le cancer du sein [Wooster et al., 1995]. Le cas d'étude le plus optimum reste l'étude de familles provenant d'une population isolée où le nombre de mutations fondatrices est limité. L'autre moyen est de décomposer le phénotype complexe (cancer, allergie), souvent dû à l'influence de facteurs génétiques différents, en diverses composantes, appelées sous-phénotypes, plus homogènes (par exemple, sévérité et âge de début de la maladie ou concentration de métabolites particuliers). Ces sous-phénotypes plus ciblés peuvent être dus chacun à un gène majeur. La prise en compte de l'âge précoce de début du cancer du sein dans une étude classique de liaison dans des familles a permis par exemple l'identification du gène *BRCA1* [Hall et al., 1990].

Ceci montre l'importance de détailler correctement le phénotype pour obtenir des échantillons d'étude homogènes, favorisant ainsi la détection des différents facteurs de risque.

2.2 Les stratégies d'étude

2.2.1 Différentes approches possibles

Dans la majorité des cas, on vise à localiser les régions génomiques impliquées dans les différents phénotypes sans faire au préalable d'analyse de ségrégation. L'existence de cartes génétiques à haute résolution avec des marqueurs polymorphes (microsatellites, SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)...) couvrant la quasi-totalité du génome rend possible, à l'heure actuelle, l'identification des gènes impliqués dans les maladies multifactorielles. En effet, le clonage positionnel des facteurs de prédisposition, c'est-à-dire leur localisation à un endroit précis

du génome et leur identification, sans connaissance *a priori* de leur fonction biochimique, fait appel à deux approches prenant en compte l'information apportée par ces marqueurs. Largement utilisée pour l'étude des maladies mendéliennes, la première approche est l'étude de liaison génétique (ou "*linkage*") fondée sur la co-ségrégation de la maladie et des allèles à un locus marqueur (les microsatellites) au sein de généalogies. La deuxième approche est l'étude d'association fondée sur l'existence d'associations préférentielles entre les allèles du gène de prédisposition (pas encore identifié) et les allèles de marqueurs (SNPs) chez les individus (par suite d'un phénomène de déséquilibre de liaison (DL) ou plus exactement déséquilibre gamétique). Ces analyses permettent d'identifier les marqueurs liés et/ou associés à la maladie. Elles sont effectuées par un criblage systématique du génome (ou "*whole genome scan*") ou peuvent être orientées vers des régions ou gènes candidats ("cartographie fine" ou "stratégie gène-candidat"). Le criblage systématique du génome est une exploration globale sans *a priori* sur la localisation des régions du génome pouvant contenir un ou des gènes de prédisposition à la maladie. Dans le cas des maladies multifactorielles où l'étiologie est souvent inconnue, cette approche permet d'identifier des régions candidates qui n'auraient pas été analysées en raison de l'absence de gènes candidats potentiels. Une autre approche est de cibler l'étude vers des régions candidates, permettant ainsi une cartographie fine de la région jusqu'à atteindre un intervalle minimal et de restreindre, par conséquent, au maximum le nombre de gènes candidats éventuels à tester (d'une dizaine jusqu'à une centaine) sur les 22 000 gènes du génome humain. Ce sont des régions plus ou moins grandes contenant plusieurs gènes dont la fonction suggère un rôle dans le processus physiopathologique ou des régions déjà décrites comme loci de prédisposition à la maladie étudiée. Pour ce faire, des marqueurs polymorphes multialléliques (microsatellites) ou bialléliques (SNPs) répartis tout au long du génome ou concentrés dans les régions candidates sont étudiés. La dernière approche vise à confirmer ou à exclure des gènes connus, qui pourraient, de par leur fonction dans une voie métabolique particulière ou de par leur localisation génomique dans une région d'intérêt, être impliqués dans la physiopathologie de la maladie, en étudiant des variations (dont les SNPs) présents dans les gènes. Le choix du gène dépend des connaissances génétiques et physiopathologiques sur la maladie étudiée. Sur le plan génétique, pour certaines maladies complexes, un mode de transmission héréditaire quasi-monogénique est observé dans certaines familles, pouvant parfois mener à la découverte d'un gène majeur, qui sera alors re-tester en tant que gène candidat chez d'autres patients. De plus, la connaissance sur la physiopathologie de la maladie, et par conséquent sur les différents mécanismes ou voies métaboliques qui pourraient être impliqués dans l'étiologie de la maladie, peut faciliter le choix des gènes candidats. Par exemple, dans le cas d'une maladie inflammatoire, les premiers gènes candidats à tester seront les gènes liés à l'inflammation, d'autant plus qu'ils sont présents dans des

loci de prédisposition connus à cette maladie.

2.2.2 Marqueurs utilisés

L'identification des gènes responsables des maladies génétiques, telles que les maladies multifactorielles, par ces différentes approches a été rendue possible grâce à la connaissance de la position de différents marqueurs moléculaires. Les progrès récents en biologie moléculaire et le séquençage de nombreux génomes dont celui de l'homme ont conduit à caractériser des polymorphismes de l'ADN en nombre sans cesse croissant. Ces polymorphismes sont des variations de fragments d'ADN plus ou moins longs, utilisées comme des marqueurs moléculaires. Ils ont remplacés progressivement des marqueurs peu stables et adéquats dans ce type d'étude tels que les marqueurs morphologiques ou les marqueurs biochimiques. Ces marqueurs servent entre autres de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre dans une étude de liaison.

Ainsi, un marqueur moléculaire idéal doit être :

- *Déterminé* : le marqueur a une position précise et unique dans le génome.
- *Polymorphe* : c'est-à-dire qu'il doit exister de nombreux allèles (multiallélique) pour un marqueur (plusieurs variants à un locus donné) permettant ainsi de détecter les différences entre individus même apparentés.
- *Codominant* : les différentes formes du marqueur doivent être détectées et permettre la distinction entre les porteurs hétérozygotes et homozygotes. L'individu hétérozygote montre donc simultanément le génotype combiné des deux parents homozygotes.
- *Distribué régulièrement le long du génome* : plus la couverture du génome en marqueurs est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation de la région à approfondir.
- *Non sujet aux influences environnementales* : la révélation du génotype d'un marqueur doit être indépendante de l'environnement dans lequel l'individu vit ou son stade de développement.
- *Non épistatique* : le génotype à un marqueur est indépendant du génotype à d'autres locus.
- *Neutre* : c'est-à-dire que les différents allèles ne doivent pas avoir d'effet sur l'individu.
- *Economique* : facile, rapide et peu coûteux à détecter sur un grand nombre d'individus.
- *Reproductible dans toute expérience de laboratoire.*

Parmi les marqueurs génétiques, deux types sont largement utilisés en routine dans les études génétiques pour leurs avantages respectifs : les microsatellites et les SNPs.

Microsatellites

Les microsatellites sont des motifs courts d'un petit nombre de nucléotides (en moyenne de 2 à 4), répétés en tandem en nombre variable ("n" fois). Les valeurs de "n" peuvent aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Le polymorphisme associé à ce type de marqueurs repose sur la variation du nombre d'unités de répétition ("n") constituant le microsatellite. Bien que plus denses aux niveaux télomériques, ils sont assez fréquents et uniformément répartis (environ 1 tous les 50 kb) sur l'ensemble du génome. Environ 6.5×10^5 microsatellites sont dispersés dans le génome humain [Brown, 2002]. Les marqueurs les plus couramment utilisés sont les microsatellites dus à des répétitions du dinucléotide CA, généralement localisés dans les introns ou dans des séquences intergéniques. Ces microsatellites sont hautement polymorphes par la variation du nombre de répétitions et de ce fait très informatifs. Ceci serait dû à un phénomène de glissement de l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. De plus, ils sont facilement détectables par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et reproductibles. La technique PCR permet d'augmenter la quantité d'un fragment d'ADN choisi au sein du génome d'un échantillon. Ceci se fait à l'aide d'amorces spécifiques de part et d'autre du fragment sélectionné, permettant son amplification. Dans le cas des microsatellites, le motif et la variation de la répétition ne sont pas spécifiques d'un locus particulier. En revanche, les régions flanquantes le sont, définissant ainsi un locus unique. Ainsi, l'amplification de l'ensemble (microsatellites+régions flanquantes) à l'aide d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes, suivie de la séparation selon leur taille des amplifiats par électrophorèse permet de mettre en évidence les variations de longueur suivant les allèles présents d'un même microsatellite étudié. Cette technique, simple d'utilisation en routine dans le laboratoire et robuste, nécessite néanmoins de connaître, synthétiser et tester les amorces bordant le microsatellite. Cependant, ces marqueurs sont fréquemment utilisés car plus de 2000 microsatellites hautement polymorphes ont été ordonnés de manière précise (en moyenne, 1 tous les 1.6 cM) [Dib et al., 1996]. La disponibilité de cette cartographie génétique de haute résolution ainsi que le haut degré de polymorphisme des microsatellites sont fortement appréciés dans les études de liaison génétique globales ou fines, pour la cartographie de gènes impliqués dans une pathologie.

SNPs

Les SNPs sont des variations bi-alléliques d'un seul nucléotide dans la séquence d'ADN pour lesquels les différents allèles existent dans la population générale à une fréquence supérieure à 0.01. Ils constituent la majorité du polymorphisme génique (90% du polymorphisme du génome humain) [Brookes, 1999]. Plus récemment, la majorité du polymorphisme a été montrée être génomique ("*Copy Number Variant*" ou CNV). En plus des variations bi-alléliques dues à des substi-

tutions, le terme est également employé pour des insertions et des délétions d'une seule base. Les fréquences des différentes combinaisons de SNPs possibles dans le génome ne sont pas les mêmes. En effet, les SNPs impliquant une transition de C en T sont les plus fréquents, constituant les 2/3 des SNPs [Brookes, 1999]. Comparés aux marqueurs microsatellites, les SNPs présentent l'avantage d'une répartition plus homogène dans tout le génome et d'être excessivement nombreux. Plusieurs consortiums ont été mis en place depuis 1999 tels que le SNP Consortium (TSC), le "International Human Genome Project Consortium" (HGP) et plus récemment le "International HapMap Consortium" pour identifier l'ensemble des SNPs existant dans le génome et ainsi, créer des cartes génétiques de haute densité, facilement accessibles *via* des bases de données publiques telles que le NCBI ("National Center for Biological Information") ou HapMap [Consortium, 2003]. On dénombre approximativement 3 millions de SNPs communs (fréquence de l'allèle mineure > 20%), c'est-à-dire en moyenne un tous les 1 kb au sein du génome (Tableau 1.3, [Kruglyak and Nickerson, 2001]). Au total, on estime à 10 millions le nombre de SNPs chez l'Homme. Néanmoins, des différences "région-spécifique" sur la répartition de ces SNPs au sein du génome existent. Ils sont plus fréquents dans les régions non codantes (les régions 5', 3' UTR et les introns) que dans les régions codantes. Sans compter les différences entre les régions codantes de gènes, les SNPs dit "synonymes", qui n'entraînent pas un changement d'acides aminés, sont plus communs que les SNPs "non synonymes" (faux-sens) (Tableau 1.4, [Cargill et al., 1999]). Dans près de 50% des cas, la fréquence de l'allèle minoritaire dépasse 5%, indiquant que ces allèles n'exercent pas d'effet délétère fortement contre-sélectionné.

Le faible taux de mutations par génération (10^{-8}) des SNPs, les rendant ainsi stables, ainsi que leur abondance à travers le génome humain permet leur utilisation dans différentes applications comme l'étude du déséquilibre de liaison ou celle d'haplotype au sein de régions (projet HapMap, décrit ultérieurement) ou l'étude de la diversité génétique des populations humaines ou des espèces, permettant ainsi de suivre l'évolution des espèces. Cependant, étant donné que la plupart de ces marqueurs (> 80%) sont communs à toutes les populations humaines mais avec des fréquences alléliques différentes, ces marqueurs ont été particulièrement intéressants pour l'identification des facteurs génétiques des maladies complexes par analyse d'association. Ils sont utilisés lors d'étude de gènes ou de régions candidats et/ou du génome entier, surtout depuis la connaissance de la séquence complète du génome humain et de l'existence de nombreuses méthodes de génotypage à haut débit et à moindre coût telles que le "TaqMan" ou les "puces à ADN" (Affymetrix ou Illumina). -

TAB. 1.3: **Fréquence des SNPs présents dans la population humaine**
(D'après [Kruglyak and Nickerson, 2001])

Minimal allele frequency	Expected SNP number (millions)	Expected SNP frequency (bp)
1%	11.0	290
5%	7.1	450
10%	5.3	600
20%	3.3	960
30%	2.0	1,570
40%	0.97	3,280

TAB. 1.4: **Nombre de SNPs présents à l'intérieur ou proches des régions codantes**
(D'après [Haines and Pericak-Vance, 2006])

Classification selon la fonction	Nombre de SNPs
Région du gène	397 161
Synonymes	48 277
Non synonymes (faux-sens)	60 763
Région non traduite	619 857
Intron	3 289 086
Site d'épissage	950

2.2.3 Méthodes utilisées

Comme décrit précédemment, différentes stratégies sont possibles lors d'études génétiques. Elles dépendent des dispositifs expérimentaux mis à la disposition du chercheur ainsi qu'à son objectif final. Les études classiques sont d'abord les études familiales. Elles consistent à recruter le maximum de sujets provenant de grandes familles sur plusieurs générations. Il existe aussi d'autres études familiales, à type de "trios", qui comportent le recrutement de sujets non apparentés atteints de la maladie et de leurs deux parents biologiques ou à type de "paires de germains" ("*sib-pairs*"), avec le recrutement de frères et/ou soeurs, atteints de la maladie, avec ou sans leurs parents. Enfin, il existe les études de population (ou études cas-témoins) qui impliquent de recruter un grand nombre de sujets non apparentés atteints d'une même maladie et un nombre au moins équivalent de sujets témoins, soigneusement appariés à chaque cas pour différents facteurs dont l'origine ethnique.

Différentes méthodes sont utilisées pour mettre en évidence les gènes impliqués dans les maladies génétiques. Les études de liaison (paramétrique ou non paramétrique) sont basées sur l'étude de familles pour identifier un lien physique entre un marqueur et la maladie (co-ségrégation). Les études d'association sont réalisables, à partir de familles ou de populations pour identifier une association allélique entre un marqueur et la maladie.

Analyses de liaison

Analyse de liaison paramétrique ou méthode des lod-scores

Le but des analyses de liaison (paramétriques ou non paramétriques) est de localiser les régions contenant les gènes responsables du trait ou de la maladie sur le génome au moyen d'observations sur des individus reliés. La méthode des lod-scores est basée sur la co-ségrégation, au cours des générations, des allèles de marqueurs polymorphes avec le locus responsable de la maladie (ou du trait), dans une ou un échantillon de familles [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Campion, 2001]. Cette co-ségrégation est due à l'existence d'une liaison génétique entre ces deux loci (gène-marqueur). Deux loci (marqueur-marqueur/gène-marqueur) sont dits "liés" s'ils sont suffisamment proches l'un de l'autre sur le même chromosome pour être cohérités dans plus de 50% des cas. Cette liaison est dépendante d'un événement biologique de la méiose qui casse la co-ségrégation, la recombinaison intra-chromosomique ("*crossing-over*"). Deux loci sont rarement disjoints par un événement de recombinaison si la distance physique entre les deux loci est suffisamment faible. L'analyse de liaison repose donc sur la fraction de recombinaison θ (la probabilité de recombinaison entre deux loci à la méiose) qui est fonction de la distance entre les loci. Cette distance est exprimée en unité de recombinaison ou centiMorgan : 1 cM correspond à une fréquence

de recombinaison de 1% entre les deux loci. Si $\theta=0$, les deux loci sont co-hérités dans 100% des cas (liaison parfaite). La distance génétique entre les deux loci est alors de 0 cM. Si $\theta=0.5$, les deux loci sont génétiquement indépendants en termes de ségrégation. Les deux loci se situent soit sur deux chromosomes différents soit sont à une distance suffisamment grande sur le même chromosome (>50 cM). L'analyse de liaison repose sur le logarithme du rapport de vraisemblance entre deux hypothèses (l'hypothèse à tester *versus* l'hypothèse nulle). Le degré de la liaison génétique, exprimée en lod score (Z) par Morton (1955), est obtenue par le logarithme décimal du rapport entre la vraisemblance de liaison (l'hypothèse alternative) entre le marqueur (position connue) et le gène de la maladie (position inconnue) pour une distance génétique donnée, représentée par le taux de recombinaison θ ($0 \leq \theta \leq 0.5$) et l'hypothèse d'indépendance génétique entre ce marqueur et le gène recherché (hypothèse nulle, $\theta=0.5$) : $Z(\theta) = \log_{10}[L(\theta)/L(0.5)]$ [Morton, 1955]. L'analyse de liaison teste la vraisemblance d'une liaison génétique pour diverses valeurs de recombinaison θ voisines de zéro et pour un marqueur donné. Le lod score varie donc suivant la valeur de θ considérée. Plus le lod score est élevé, plus la probabilité de la liaison entre le marqueur et le gène causal est grande et inversement. Classiquement, l'hypothèse d'indépendance est rejetée avec un score $Z(\theta)$ supérieur à 3 (correspondant à $P=10^{-4}$). Il y a alors liaison génétique (ou "linkage" en anglais) entre le marqueur et la maladie. L'hypothèse de liaison est rejetée si $Z(\theta) < -2$. Cela signifie qu'il y a une preuve que des événements de recombinaison ont eu lieu entre le marqueur et le locus maladie. Pour un lod score entre ces deux valeurs, on ne peut pas conclure ni à une liaison ni à une exclusion, il faut analyser d'autres familles. Dans le cas de stratégie "*genome-wide scan*", le seuil monte à 3.3 pour conclure à une liaison avec une valeur de P de 0.05 [Lander and Kruglyak, 1995].

L'objectif final de l'analyse est d'estimer la fraction de recombinaison (ou la position chromosomique (cM)) entre chaque marqueur et le locus de la maladie (analyse bi-point) ou la position du locus de la maladie relative à une carte fixe des marqueurs où l'on suppose que l'endroit de chaque marqueur est connu (analyse multipoint). L'analyse multipoint peut être plus puissante car l'informativité d'un marqueur peut être améliorée en le considérant simultanément avec les marqueurs voisins. Elle permet aussi d'avoir une estimation de la localisation du locus "maladie" et de se protéger contre les résultats aberrants obtenus pour un marqueur. Cependant, elle reste sensible à la présence d'erreurs de génotypage et elle requiert un ordre correct des marqueurs ainsi que de la distance entre les marqueurs. La meilleure estimation (le maximum de vraisemblance) de θ ou de la position est celle qui maximise la fonction du lod score : le lod score maximum. De plus, même si cette analyse est basée sur l'existence d'un locus majeur à l'origine du trait, elle peut également prendre en compte l'hétérogénéité génétique à l'aide du paramètre α qui répartit les familles en familles liées et non liées au marqueur considéré. Le

lod score est alors maximisé en fonction des paramètres θ et α (la proportion de familles liées au locus étudié). Ce lod score, intitulé "HLOD" (*heterogeneity LOD*) est défini comme étant : $HLOD(\alpha, \theta) = \log_{10}[L(\alpha, \theta)/L(\alpha=1, \theta=0.5)]$.

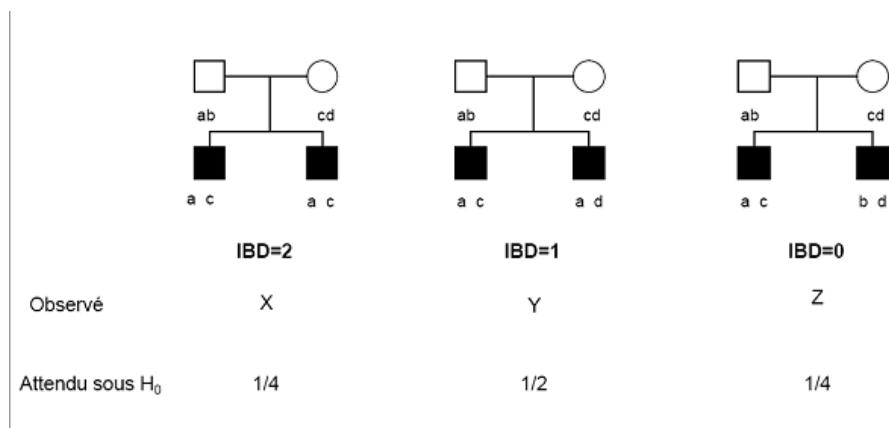
Les analyses de liaison paramétrées sont réalisées avec différents programmes comme Linkage [Lathrop et al., 1984], GeneHunter [Kruglyak et al., 1996], Merlin [Abecasis et al., 2002], Simwalk2 [Sobel and Lange, 1996], qui utilisent divers algorithmes (Elston-Stewart, Lander-Green, chaînes de Markov Monte Carlo) pour permettre d'étudier de nombreux marqueurs dans des familles de toutes tailles.

Cette méthode est très puissante surtout lors de son application à l'étude de plusieurs grandes généalogies où un même gène majeur, quels que soient les allèles impliqués, est à l'origine de la maladie. En effet, dans les études de liaison génétique, l'existence d'une hétérogénéité allélique n'affecte pas l'analyse car toutes les familles (avec différentes mutations) montreront une liaison avec la même région chromosomique. Selon les familles, différents allèles d'un même marqueur seront alors liés à la maladie. Elle fut d'ailleurs largement utilisée pour cartographier de nombreux gènes impliqués dans des maladies mendéliennes. Dans ce cas, l'étude de grandes familles est vraiment intéressante car il y a une très forte probabilité pour que l'ensemble des cas développés au sein d'une même famille soit dû à une susceptibilité commune. Cependant, cette méthode reste peu adaptée dans le cas des maladies complexes avec hétérogénéité non allélique. Etant une méthode paramétrée, elle nécessite la connaissance du modèle génétique (mode de transmission) de la maladie, c'est-à-dire si la maladie est autosomique ou liée au chromosome X, si elle est dominante ou récessive. Elle dépend de la fréquence et de la pénétrance de l'allèle de prédisposition à la maladie, de la fréquence des phénocopies, du taux de mutation et de la fréquence allélique des marqueurs de la maladie. Ces paramètres sont souvent préalablement estimés par les études de ségrégation. De manière générale, elle dépend aussi de la famille étudiée, sa taille et sa composition en nombre d'individus atteints, et des marqueurs microsatellites selon leur informativité (degré de polymorphisme). Dans le cas des maladies complexes, le mode héréditaire de transmission de la maladie est souvent trop imprécis. La méconnaissance de ces paramètres conduit généralement à une perte de puissance pour détecter une liaison existante (faux négatifs) et/ou à détecter par hasard une liaison inexistante (faux positifs). A moins d'avoir montré lors d'une analyse de ségrégation l'implication d'un gène majeur, il serait peu adapté d'utiliser cette méthode dans l'étude des maladies complexes.

Analyse de liaison non paramétrique ou méthode des paires de germains

Pour les raisons précédemment décrites, d'autres méthodes, dites non paramétri-

FIG. 1.5: **Différents états IBD possibles pour une paire de germains atteints**
 IBD : identique par descendance, IBD0 : aucun allèle IBD, IBD1 : un allèle IBD commun,
 et IBD2 : deux allèles IBD commun entre les germains

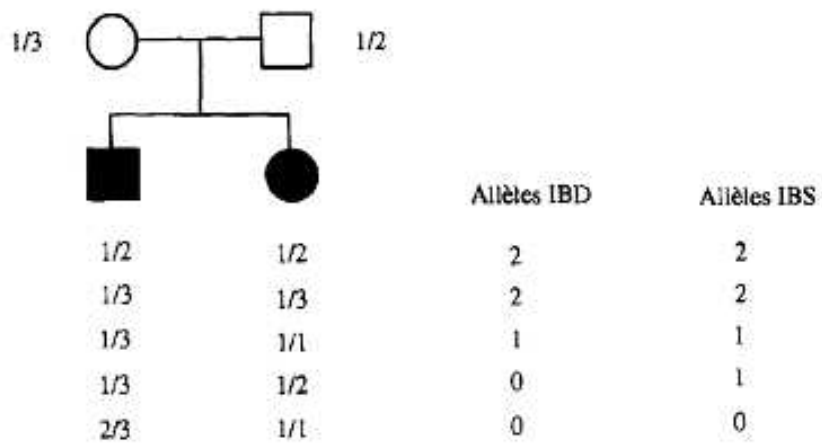


ques (ou "*model-free*") peuvent être utilisées [Demenais et al., 1996, Seboun, 1996, Feingold et al., 1998, Campion, 2001, Feingold, 2005]. Elles ne font aucune hypothèse *a priori* sur le mode héréditaire de transmission de la maladie. Une des méthodes est également une analyse de liaison qui repose sur le principe du partage d'allèles. Elle tente à montrer que pour des apparentés qui se ressemblent pour un trait (la maladie), la transmission d'un ou des segments chromosomiques ne correspond pas à celle obtenue lors d'une ségrégation aléatoire mendélienne mais qu'au contraire ces apparentés héritent d'un même segment chromosomique parental plus souvent que ne le voudrait le hasard. En d'autres termes, si un marqueur analysé est proche du locus du gène incriminé, les apparentés atteints auront tendance à partager le même segment et donc les mêmes allèles à ce site. Ces apparentés présenteront donc un excès d'allèles du marqueur en commun.

Selon ce principe, la méthode a été appliquée sur les paires de germains atteints de la même maladie (*Affected Sibling Pairs*, ASP) [Penrose, 1935]. Cette méthode des paires de germains se base sur le fait que s'il existe une liaison, une transmission non aléatoire des allèles parentaux est observée chez les enfants atteints. Dans ce cas, les enfants atteints héritent plus souvent des mêmes allèles du locus considéré que ne le voudrait le hasard. L'allèle commun entre deux germains provenant d'un même allèle parental est dit "identique par descendance" (*identical by descent*, IBD) [Campion, 2001, Feingold, 2005]. Cette méthode évalue, pour un marqueur donné, la proportion du nombre d'allèles identiques par descendance au sein de paires de patients. Ainsi, pour un marqueur, les germains peuvent avoir en commun 2, 1 ou 0 allèles IBD hérités de leurs parents. Les germains qui partagent deux allèles IBD (IBD2) ont hérité des deux mêmes allèles de leurs deux parents. S'ils partagent un allèle IBD (IBD1), ils ont hérité du même allèle d'un même parent. Et enfin, ils ne partagent aucun allèle IBD (IBD0) s'ils héritent d'allèles différents. Dans le cas d'une ségrégation mendélienne (en absence de liaison), les germains vont hériter de 2 allèles IBD d'un locus donné dans 25% des cas, d'un allèle IBD dans 50% des cas, et de 0 allèles IBD dans les 25% restants. Ces distributions attendues sont alors comparées aux distributions observées par un simple test de χ^2 qui devient significatif en cas de liaison (Figure 1.5). Un autre test, plus puissant qui teste spécialement l'augmentation du partage est le 'test moyen' [Blackwelder and Elston, 1985]. Pour tous ces tests, l'augmentation du partage des allèles identiques par descendance chez les paires de germains indique une liaison génétique entre le marqueur et le gène de prédisposition.

Ne requérant aucune hypothèse sur le modèle génétique de transmission, cette approche est largement utilisée dans le cas d'études de maladies complexes. Cette approche a permis d'ailleurs de mettre en évidence la liaison du système HLA avec différentes maladies auto-immunes, telles que la sclérose en plaques ou le diabète insulino-dépendant (DID) [Demenais et al., 1996]. Même si cette méthode

FIG. 1.6: Relation entre allèles IBD et allèles IBS dans un système de 3 allèles
(D'après [Seboun, 1996])



s'affranchit du problème de "pénétrance incomplète" en n'étudiant que des sujets atteints, elle reste une méthode de faible puissance car elle n'étudie qu'un seul type d'appariement, rendant difficile la séparation entre la concordance des allèles entre germains de la probabilité de ségrégation au hasard des deux loci.

Plusieurs facteurs influencent la puissance d'analyse de cette méthode pour détecter un locus de susceptibilité : l'effet génétique du locus "maladie", la taille de l'échantillon étudié, le taux de recombinaison θ et la détermination de l'état IBD. La baisse de puissance de cette méthode dépend également de l'hétérogénéité génétique de la maladie (présence de plusieurs loci) et de la présence de phénocopies. En ôtant ces derniers, la méthode pour détecter une région d'intérêt résulte de la contribution du locus dans le phénotype et par conséquent du risque relatif familial. Plus la contribution de ce locus sera grande, plus cette méthode pourra le détecter. Ce facteur intervient aussi dans la taille de l'échantillon à tester. Plus la contribution sera faible, plus la taille de l'échantillon à tester sera importante. Par exemple, en utilisant des marqueurs complètement informatifs et en supposant l'absence de recombinaison (conditions idéales), au moins 200 paires de germains sont nécessaires pour détecter une liaison avec une puissance de 80% pour une valeur de P de 0.05 si $\lambda_s=2$ (ce qui correspond déjà à une valeur élevée pour des facteurs de risque pour des maladies complexes), alors que 60 paires de germains suffisent si $\lambda_s=5$ [Risch, 1990].

Elle dépend aussi du taux de recombinaison entre les deux loci marqueur-maladie. Par exemple, sur un échantillon de 300 paires de germains, la puissance de détection d'une liaison statistique diminue de moitié lorsque le taux de recombinaison θ est supposé être de 0.10 [Risch, 1990].

La puissance de cette approche dépend aussi de la détermination sans ambiguïté de la provenance parentale de chaque allèle, c'est-à-dire, de l'état IBD des allèles du marqueur. Cette détermination correcte des allèles transmis des parents n'est possible qu'avec l'étude de marqueurs hautement polymorphes et celle du génotype des parents. Si ce dernier n'est pas réalisable, l'étude du génotype des individus supplémentaires de la fratrie est utile pour pouvoir "évaluer" les génotypes parentaux manquants. Cependant, dans la plupart des cas, les données de génotype aux locus "marqueurs" sont souvent ambiguës, ne permettant pas de connaître la provenance parentale exacte de chaque allèle. C'est le cas avec des parents homozygotes : les deux germains ont-ils reçu le même allèle ou différentes copies de l'allèle ? Il est seulement possible de déterminer si deux germains ont les mêmes allèles du marqueur identique par état (*identical by state*, IBS). Deux allèles sont définis comme étant identique par état lorsqu'ils sont les mêmes, indépendamment de leur origine ancestrale (Figure 1.6).

Pour cette raison, plusieurs tests basés sur le partage IBS ont été proposés, consistant à compter les allèles concordants entre germains atteints. Une des méthodes fondées sur le statut IBS est la méthode APM (*affected pedigree member me-*

thod) [Weeks and Lange, 1988]. Cette méthode permet d'étudier le statut IBS sur tous les sujets atteints appartenant à des généalogies, y compris de parents éloignés. Même si pour un marqueur très polymorphe, le statut IBS est similaire au statut IBD, ces méthodes sont moins robustes dans la majorité des cas car elles dépendent de la fréquence allélique du marqueur. En effet, pour calculer les fréquences attendues du partage IBS sous l'hypothèse nulle (en l'absence de liaison), il est nécessaire d'estimer les fréquences alléliques dans la population, paramètres souvent difficiles à établir avec précision. Une erreur sur ces fréquences peut conduire à la détection fautive d'une liaison. Récemment, d'autres méthodes plus flexibles, certaines basées sur le maximum de vraisemblance (MLS, *Maximum Likelihood Score*), permettent d'estimer le partage IBD et de prendre en compte les situations plus complexes telles que la présence de marqueurs "ambigus", l'étude de différents types de parentés atteints, l'absence de génotypes d'un parent. Dans ces méthodes, les proportions du partage IBD sont calculées en considérant tous les génotypes possibles pour les parents qui seraient en accord avec les données. L'ensemble de ces nouvelles méthodes permettent aussi de traiter les familles dans lesquelles il y a soit de multiples germains (comme la méthode MLB, *Maximum Likelihood Binomial method*) soit plusieurs membres (la généralisation du test moyen, la méthode NPL, *Non Parametric Linkage*), atteints et pas nécessairement indépendants [Abel and Muller-Myhsok, 1998].

Selon la méthode utilisée, le moyen de corriger cette non-indépendance parmi les germains est différent. Certains analyseront seulement une paire ou des paires indépendantes et, d'autres utiliseront toutes les paires possibles, mais en pondérant leurs contributions au test selon le nombre d'individus atteints dans les germains. L'effet de la non indépendance sur le test de liaison varie selon la méthode utilisée mais par exemple, dans le cas de la méthode MLB, l'erreur de type I (erreur de rejeter l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie, c'est-à-dire affirmer une liaison alors qu'il n'y en a pas) peut être augmentée [Abel and Muller-Myhsok, 1998]. De plus, certaines méthodes utilisent simultanément l'information de tous les marqueurs sur le chromosome. Cette analyse "multipoint" permet, comme pour une analyse paramétrique, d'augmenter la puissance dans les meilleures conditions mais également d'améliorer l'estimation du partage IBD. Cette analyse reste néanmoins limitée aux algorithmes utilisés qui peuvent être sensibles à la quantité de marqueurs et à la complexité des familles étudiées.

Les méthodes non paramétriques ont également été utilisées pour des analyses de liaison à un trait quantitatif (QTL, *Quantitative Trait Loci*). Proposée par Haseman et Elston (1972), cette approche est basée sur la corrélation entre le statut IBD des germains à un marqueur et leur ressemblance phénotypique (trait clinique ou biologique), mesurée par la différence au carré entre les valeurs quantitatives du trait [JK. and RC., 1972]. Plusieurs variantes de cette méthode

existent dont une fondée sur la décomposition de la variance.

Les analyses de liaison non paramétrées sont réalisées entre autres avec différents programmes tels que GeneHunter [Kruglyak et al., 1996], Merlin [Abecasis et al., 2002] ou SIMWALK2 [Sobel and Lange, 1996].

Enfin, la méthode générale des paires de germains n'est généralement pas capable de localiser un gène avec précision. En effet, le manque de puissance de cette méthode pour la détection de gènes ayant un effet mineur entraîne souvent la détection de fausses régions de prédisposition (faux-positifs), pouvant expliquer le peu de répliation des loci initialement suggérés. Et même si ces méthodes non paramétrées ont permis d'identifier surtout des régions d'intérêt contenant des gènes à effet fort, les régions identifiées ne sont souvent pas suffisamment petites (10 à 30 cM) pour permettre le clonage positionnel facile du gène causal, quelles que soient les approches utilisées (criblage systématique du génome ou cartographie fine) [Risch and Merikangas, 1996]. L'approche suivante sera alors la recherche d'association allélique (ou d'un ensemble d'allèles ("association haplotypique")), dans la population générale, entre la maladie et les allèles de marqueurs bi-alléliques présents soit dans les régions de prédisposition pour une cartographie fine, ou soit dans les gènes candidats pour une stratégie gène-candidat. Elle peut également être utilisée comme alternative des analyses de liaison lors d'un criblage du génome, avec des SNPs répartis sur le génome entier.

Analyses d'association

Une alternative et/ou un complément aux analyses de liaison pour détecter des loci (à l'aide de marqueurs répartis le long du génome) ou pour identifier les gènes de prédisposition aux maladies complexes (à l'aide d'une sélection de marqueurs présents dans la région ou le gène candidat) est la recherche d'association. Contrairement à l'analyse de liaison où l'hétérogénéité allélique n'intervient pas, l'analyse d'association cherche à identifier qu'un allèle particulier, identique dans toute la population, augmente le risque d'une maladie.

Etudes de population ou cas-témoins

Un allèle est dit associé à une maladie s'il est plus fréquent parmi des malades non apparentés (ou les "cas") que parmi les témoins sains [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005, Monpetit and Chagnon, 2006]. Par opposition aux études de liaison génétique où la co-transmission d'une maladie et d'un marqueur au sein des généalogies est examinée, l'association maladie-marqueur est mise en évidence en comparant les fréquences alléliques du marqueur chez les sujets atteints et chez les témoins (non atteints). Un simple test de χ^2 permet de tes-

ter la différence observée. Il est important que les deux groupes soient choisis au hasard d'une même population panmictique (les unions entre individus se font au hasard), sans critère de sélection autres que ceux correspondant à la maladie (l'âge et le sexe).

Une différence observée (association allélique positive) suggère que le marqueur est soit directement impliqué (et dans ce cas, cette association sera retrouvée dans différentes populations quelle que soit leur origine ethnique), soit en déséquilibre de liaison avec le(s) variant(s) causal(s).

Un déséquilibre de liaison (ou "DL") entre deux loci est défini par l'existence d'une combinaison d'allèles particulière à ces loci plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'association au hasard de ces allèles. En d'autres termes, dans le cas de deux allèles de deux loci, la fréquence des gamètes porteurs de ces deux allèles diffère de celle résultant du simple produit de leurs fréquences alléliques (voir ultérieurement Matériels et Méthodes).

En otant certains facteurs générateurs d'un DL entre loci tels que la migration ou le brassage des populations, deux marqueurs en fort déséquilibre de liaison (ou "déséquilibre gamétique") sont en général physiquement proches sur un même chromosome. Dans le cas de deux marqueurs en DL, la plupart des individus porteront la même combinaison de deux allèles spécifiques à ces marqueurs (un même haplotype). Généralement deux loci en déséquilibre de liaison seront également liés, mais l'inverse n'est pas nécessairement vrai. Un tel déséquilibre diminue au cours des générations successives entre autres par les événements de recombinaison et d'autant plus lentement que les deux loci sont très proches sur le même chromosome. Dans la plupart des cas, le marqueur dont un des allèles est trouvé associé à la maladie n'est pas souvent identifié comme le marqueur de prédisposition mais plutôt comme un marqueur en fort DL et proche du marqueur de susceptibilité à la maladie, surtout si peu de marqueurs ont été analysés lors de l'étude et s'il n'existe aucune preuve de son rôle dans la maladie sur le plan fonctionnel. L'existence d'un fort déséquilibre de liaison dépend en partie de l'histoire de la population étudiée. En effet, dans certains cas, le déséquilibre de liaison s'est constitué au sein d'une petite population "fondatrice" ou "isolée". La maladie serait due à une mutation apparue sur l'un des chromosomes d'un individu fondateur ou d'un nombre réduit de fondateurs (au maximum une centaine) et ainsi, les patients actuels partagent une toute petite région contenant cet allèle causal ancestral, variant selon la croissance de la population en question. Dans le cas d'une apparition relativement récente de l'allèle causatif d'une fréquence faible, le niveau du DL sera suffisamment élevé et étendu dans la région contenant le gène de prédisposition pour le détecter par ce type d'analyse. Si l'allèle à risque est fréquent dans la population actuelle (ce qui est attendu pour des maladies complexes), il a été sûrement associé à différents contextes chromosomiques dans la population ancestrale (conduisant à un plus faible DL dans la

région concernée), rendant difficile sa détection par DL [Kruglyak, 1999].

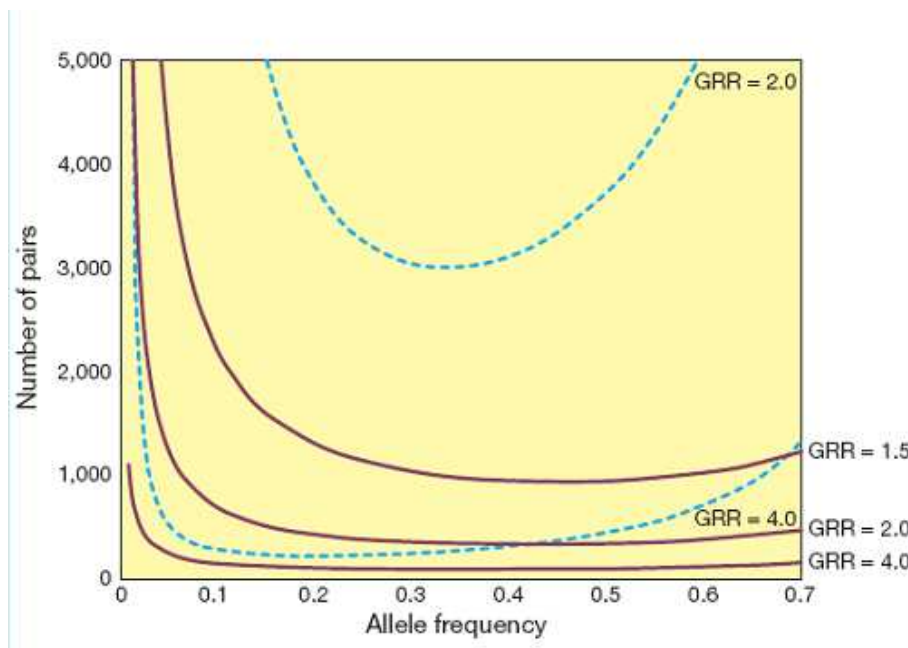
D'une manière générale, le DL peut s'étendre sur différentes distances (de quelques kilobases à plusieurs centaines de kilobases), selon la population étudiée. Le génome est d'ailleurs organisé en blocs avec un fort DL. Ces blocs mesurent en moyenne 10 à 20 kb, mais varient en taille de quelques kilobases à plusieurs centaines de kilobases et sont séparés par des petites régions d'environ 1-2 kb comportant des taux de recombinaison élevés, dit "points chauds de recombinaison" car la recombinaison ne survient pas de façon aléatoire dans le génome [Monpetit and Chagnon, 2006]. Cinquante pour cent de la recombinaison totale survient dans 10 % de la séquence du génome. Par exemple, dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), c'est 80 % de la recombinaison qui est observée dans moins de 10 % de la séquence [McVean et al., 2004]. De plus, ces blocs de DL sont différents selon les populations. Par exemple, dans la population humaine considérée comme la plus ancienne, la population africaine, le DL est moins fort et les blocs de DL observés s'étendent sur des distances plus courtes avec moins de SNPs, comparées aux populations européennes et asiatiques [Hinds et al., 2005]. Tous les humains descendent *a priori* d'ancêtres ayant vécu en Afrique il y a environ 150 000 ans. Ainsi, la plupart des variantes dans les populations actuelles, résultantes d'une migration, proviendraient d'une partie des variantes ayant existées dans cette population ancestrale. Contrairement aux autres populations, les populations d'Afrique ont été les plus nombreuses au cours du temps, multipliant d'autant leurs probabilités de scinder les haplotypes par recombinaison.

Grâce à différents projets d'analyse du génome humain (HapMap, Perlegen), la connaissance de l'ensemble de ces blocs dans différentes populations (caucasienne, africaine, asiatique) permet de réduire considérablement le nombre de SNPs à utiliser pour couvrir une région chromosomique ou le génome entier lors des études d'association. On estime que le nombre de SNPs nécessaires pour contenir la plupart de l'information sur la variation génétique du génome entier se situe entre 300 000 et 600 000. Pour ce dernier souvent utilisé dans le cas d'une étude sur des populations non-africaines, cela correspond à 1 SNP tous les 5kb.

Depuis les nombreux progrès technologiques, ce type d'analyse est maintenant réalisable et utilisé pour procéder à un criblage du génome entier, en analysant des centaines de milliers de SNPs répartis tout au long du génome. Cependant, il peut également être utilisé dans le cas où l'intervalle d'intérêt est restreint à quelques cM. En effet, puisque le nombre de gènes candidats dans cet intervalle est limité, une stratégie gène-candidat peut être réalisée en testant les gènes dont la fonction pourrait expliquer une partie de la maladie. Cette stratégie peut également être utilisée pour tester une région d'intérêt en analysant des marqueurs répartis uniformément le long de cette région, préférentiellement présents dans les

FIG. 1.7: **Comparaison entre les analyses de liaison et d'association pour détecter des effets génétiques**

L'analyse de liaison (en pointillés) est basée sur des paires de germains atteints sous les meilleures conditions (marqueur informatif et complètement lié). L'analyse d'association (en continue) est basée sur des échantillons cas-témoins (pour tester le variant causatif). Un modèle multiplicatif est supposé, ainsi le risque relatif attribué au génotype (GRR) homozygote à haut risque est le carré de la valeur de GRR pour l'hétérozygote, qui est donné dans la figure. Les loci avec un $GRR > 1.5$ peuvent être détecté par une analyse d'association alors qu'il faut un $GRR > 4$ pour pouvoir détecter des loci par une analyse de liaison. (D'après [Risch, 2000])



gènes de l'intervalle. Comme discuté précédemment, le marqueur, qui est montré associé avec la maladie, peut être soit le marqueur causal soit être en déséquilibre de liaison avec le réel variant impliqué. Ainsi, dans la plupart des études sur des courtes régions (comme dans les "stratégies gènes candidats"), l'étude se focalise principalement sur les variants les plus susceptibles d'intervenir dans la prédisposition des maladies génétiques, comme par exemple, les variants présents dans la région codante qui peuvent avoir un rôle direct, plus ou moins connu, sur la fonction de la protéine correspondante. Cela a d'ailleurs été souvent le cas dans les maladies mendéliennes. Dans le cas des maladies complexes, les SNPs présents dans la région promotrice ou même dans la région non codante semblent avoir un rôle important dans le développement de ce type de maladie. Ainsi, afin de ne pas manquer le gène de prédisposition et le variant causal, il est important de prendre en compte l'existence du DL au sein du génome et de réaliser une approche plus générale. Souvent utilisée dans les études du criblage du génome, cette approche repose sur l'étude de variants pris sans *a priori* sur leur éventuel rôle fonctionnel, mais plutôt sélectionnés selon la structure du DL au sein de la région. Ainsi, même si le variant causal n'est pas testé, le gène sera quand même identifié car certains marqueurs de ce gène seront montrés associés avec la maladie, dû à l'existence d'un DL (complet ou non) entre ces marqueurs et le marqueur causal.

Cependant, la détection d'une association dépend, de manière générale, de l'intensité du DL entre le marqueur et la mutation causale, de la fréquence de la mutation dans la population, de l'effet de la mutation (sa pénétrance) sur la pathologie, de la distance génétique entre les marqueurs et le locus de la maladie, et enfin de l'hétérogénéité allélique. Ainsi, la taille de l'échantillon à tester doit être choisie, si possible, en conséquence.

Ce type d'analyse reste néanmoins plus puissant que les analyses de liaison pour l'identification des facteurs de prédisposition à des maladies complexes, même mineurs (Figure 1.7) [Risch and Merikangas, 1996, Risch, 2000]. Il a d'ailleurs conduit à mettre en évidence le rôle du gène de l'apo-lipoprotéine E (*APO E*) comme facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer et de celui de l'enzyme de conversion (*ACE*) dans l'infarctus du myocarde [Cambien et al., 1992, Saunders et al., 1993].

Avec ce type d'étude, il est également possible de calculer le risque relatif (*odds-ratio*, OR) de présenter la pathologie en fonction de l'état homozygote ou hétérozygote de l'allèle.

Néanmoins, cette méthode, facile à mettre en oeuvre, peut également induire en erreur. Une association observée peut ainsi résulter d'un artéfact dû à la structure de la population étudiée, une stratification de populations ou un mélange de

populations ayant des fréquences différentes de la maladie et des allèles du marqueur (faux-positifs). En effet, il existe des disparités géographiques et ethniques des fréquences des marqueurs alléliques ou haplotypiques. Ainsi, il est important de sélectionner correctement la population témoin pour éviter de conclure faussement au rôle d'un marqueur et/ou d'un gène candidat.

Etudes familiales

Afin de contourner ce biais, des témoins "internes" pris au sein même des familles des malades ont été choisis. Les deux principales méthodes développées sur le principe de témoins "internes et fictifs" se font à partir de données familiales, les Trios (le patient et ses deux parents). Il s'agit du test d'haplotype à risque relatif (HRR, ou *haplotype relative risk*) et du test de transmission déséquilibré (TDT, ou *transmission disequilibrium test*) [Demenais et al., 1996, Feingold et al., 1998, Feingold, 2005].

Le test HRR permet de comparer les fréquences alléliques du marqueur chez les patients et les témoins, où les témoins ne sont pas des individus ("témoins fictifs") mais reconstitués à partir des deux allèles parentaux non transmis aux patients. La signification est testée par un test de χ^2 [Khoury, 1994].

Le test du déséquilibre de transmission (TDT) compare les fréquences avec lesquelles un allèle particulier est transmis par un parent hétérozygote à l'enfant atteint. Il compare donc la fréquence de cet allèle parmi les allèles transmis et les allèles non transmis (définissant les "témoins fictifs"). La signification de l'association est testée par un test de χ^2 [Spielman et al., 1993]. Si l'allèle est associé à la maladie, un excès de transmission de cet allèle sera observé dans plus de la moitié des cas. Ce test étudie à la fois l'association et la liaison génétique. Cette méthode a été appliquée pour l'étude du gène de l'insuline dans le diabète insulino-dépendant [Julier et al., 1991].

La robustesse de ce test vis-à-vis des biais de stratification (migrations et/ou brassages des populations) se paie toutefois par une diminution de la puissance à détecter l'association puisqu'il est nécessaire que les parents soient hétérozygotes pour pouvoir réaliser ce test. De plus, ce test requiert le recrutement de familles Trio, ce qui est plus difficile à mettre en oeuvre que des individus non apparentés (comme pour une étude cas-témoins). Il nécessite en plus la connaissance des génotypes des parents, ce qui n'est pas accessible de manière systématique comme par exemple dans le cas de maladies à début tardif, telles que les maladies neuro-dégénératives. Des méthodes analogues ont été développées afin de se passer des données parentales (telles que le *sib-TDT* qui prend en compte les germains (atteints ou non) du patient) et/ou afin de considérer l'ensemble des apparentés pour

reconstituer les données parentales (telles que le test basé sur les familles, FBAT (*Family-based association test*)). Les analyses d'association sont réalisées avec différents programmes tels que GeneHunter [Kruglyak et al., 1996], Merlin [Abecasis et al., 2002], FBAT [Laird et al., 2000] selon le type de cohorte étudiée.

Quel que soit le test d'association utilisé, la question des faux-positifs engendrés par les tests multiples demeure : tester n marqueurs avec k allèles revient à réaliser environ $n(k-1)$ tests indépendants. La signification de chaque test doit, en toute rigueur, être divisée par ce facteur (correction de Bonferroni). Par exemple, une valeur de signification nominale de $p=0.0005$ est requise pour atteindre un simple taux de 5% de faux positifs (l'erreur de type I) lorsque l'on teste indépendamment 100 polymorphismes bialléliques sur des gènes différents. Cette correction est cependant très conservatrice, surtout dans le cas des maladies multifactorielles où les nombreux tests réalisées lors des études ne sont pas souvent indépendants. Par exemple, les marqueurs étudiés sont souvent dépendants entre eux par l'existence d'un DL entre ces marqueurs. De plus, parmi les nombreux facteurs connus pour intervenir dans la puissance de l'étude, le facteur "taille de l'échantillon" doit être suffisamment important pour détecter l'ensemble des loci (faux-négatifs), ce qui est souvent peu réalisable en pratique. Ainsi, il est préférable d'être moins stringent vis à vis du seuil limite de détection, en tolérant un seuil de faux-positifs élevé. Une autre approche consiste à utiliser le test de permutations avec des séries de données générées par une simulation, pour établir la répartition attendue des faux-positifs et ajuster les seuils en conséquence. La réplification des résultats d'une étude par d'autres études indépendantes, en complément des données de liaison, reste le plus souhaitable pour garantir l'implication d'un locus ou d'un gène candidat car en général, la mise en évidence d'une association ne permet pas de conclure à l'implication formelle du gène candidat testé dans la susceptibilité génétique de la maladie, mais seulement de l'existence d'un facteur génétique à proximité (quelques kilobases). En effet, si le marqueur associé est directement impliqué dans la maladie, il sera trouvé associé dans différentes populations quelle que soit leur origine ethnique et leur structure de DL, variable selon leur histoire. Cependant, ce sont les études fonctionnelles sur les variants associés, si cela est possible, qui peuvent démontrer le mécanisme biologique en cause dans la maladie.

3 EXEMPLE D'UNE MALADIE A HEREDITE COMPLEXE : LE PSORIASIS

Le terme psoriasis, dérivé du grec "psora" désigne les pellicules, les éruptions et les démangeaisons. Le psoriasis est une maladie chronique et inflammatoire de la peau caractérisée par des lésions cutanées érythémateuses (rougeur de la peau)

et squameuses (détachement excessif des couches superficielles de l'épiderme) bien limitées, le plus souvent, au niveau des articulations (coudes, genoux) et du cuir chevelu, évoluant de façon continue ou par poussées et dont l'intensité et l'étendue peuvent être bénignes, comme fulgurantes.

3.1 Les données épidémiologiques

Le Psoriasis (OMIM 177900) est une maladie relativement fréquente affectant environ 1 à 4% de la population mondiale, indépendamment du sexe.

L'occurrence de la maladie diffère selon le type de populations. Sa prévalence est plus élevée dans les régions du Nord de l'ex-Union Soviétique et de la Norvège où elle peut atteindre jusqu'à 10% ; alors qu'elle est d'environ 3% aux Etats-Unis, Royaume Uni, et en France. La maladie est plus rare, environ 0,2%, dans les populations asiatique, africaine, indienne de l'Amérique du Nord et de l'Amérique Latine [Bhalerao and Bowcock, 1998, Christophers, 2001, Bowcock and Cookson, 2004, Bowcock, 2005]. Le psoriasis peut survenir à n'importe quel âge, mais 75% des patients développent la maladie avant l'âge de 40 ans. Deux types cliniques de psoriasis peuvent être distingués en fonction de l'âge d'apparition et des antécédents familiaux. Le psoriasis de type I se déclare avant l'âge de 40 ans, avec des antécédents importants de psoriasis familiaux et une évolution assez sévère. Une association avec l'antigène HLA-Cw6 est trouvée principalement chez les patients de ce type [Henseler and Christophers, 1985, Asumalahti et al., 2003c, Bowcock and Cookson, 2004, Szczerkowska-Dobosz et al., 2004, Bowcock, 2005]. Le psoriasis de type II apparaît chez un sujet plus âgé, après 40 ans, de façon sporadique, sans antécédents familiaux et avec une évolution plus bénigne [Henseler and Christophers, 1985].

Le psoriasis est rarement associé à un pronostic vital, mais cette maladie a un effet néfaste significatif sur la qualité de la vie. Le psoriasis a un impact psychologique important pouvant avoir des conséquences néfastes sur la vie socioprofessionnelle et affective des patients, surtout quand l'atteinte est visible. Dans 5-30% des cas, il peut s'accompagner d'handicaps articulaires et osseux douloureux (l'arthrite psoriasique) [Bowcock, 2005].

3.2 Les symptômes cliniques

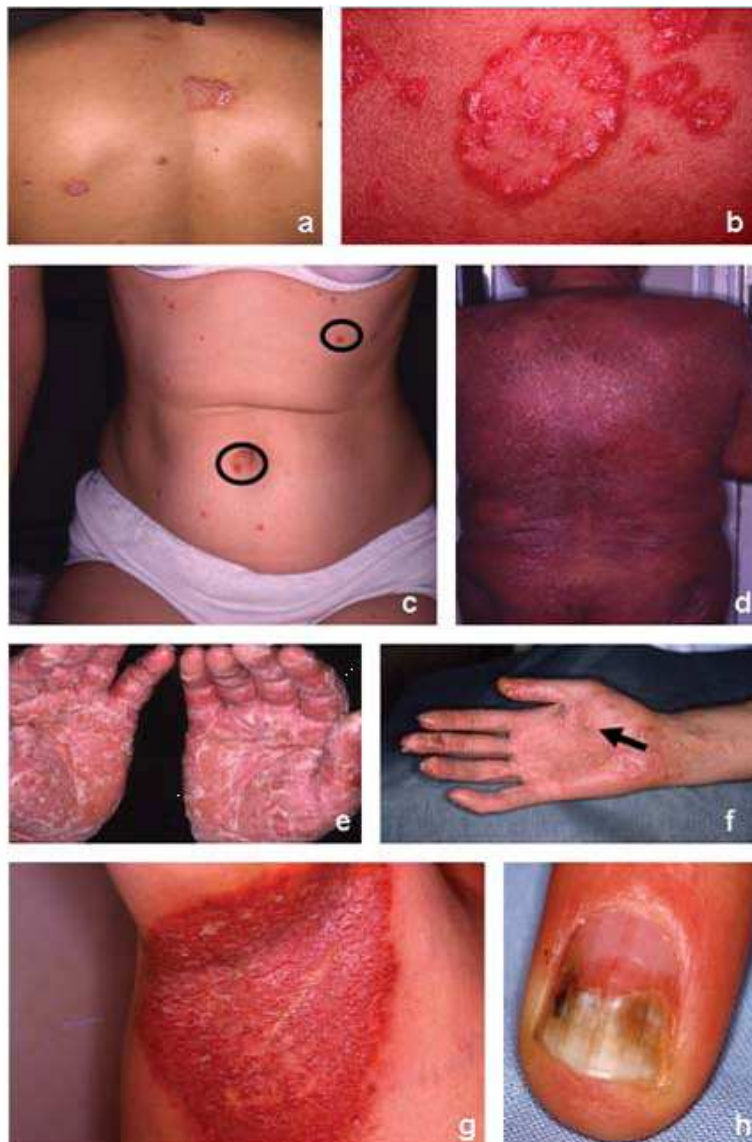
Le psoriasis est une maladie très hétérogène, de par l'étendue variable des zones du corps impliquées et de par son évolution, qui survient de façon continue ou par poussées.

3.2.1 Différents sous-types

Selon l'aspect des lésions cutanées, plusieurs formes cliniques dont le "*psoriasis vulgaris*" (le psoriasis vulgaire) ont été individualisées, Figure 1.8.

FIG. 1.8: Aspects cliniques du psoriasis

Dans la présentation "classique", de type psoriasis "*vulgaris*" (a), les lésions élémentaires apparaissent érythémato-squameuses (b). Une éruption de petits éléments érythémato-squameux diffusément répartis, au décours d'une infection des voies aériennes supérieures doit laisser suspecter un psoriasis en gouttes (c, cercles). Parfois les patients développent une érythrodermie, et dans ce contexte, une hospitalisation sera souvent indiquée (d). Certaines formes limitées ou certaines atteintes de psoriasis, peuvent représenter, pour le patient, une altération importante de sa qualité de vie, en raison de la gêne que cette atteinte va provoquer au quotidien (e). Dans le psoriasis pustuleux, les lésions élémentaires sont des pustules stériles (f, flèche). Le psoriasis inversé ne doit pas être confondu avec un intertrigo (g), auquel il peut parfois ressembler. Un exemple d'atteinte unguéale de psoriasis est repris en h, qui montre l'image d'une onycholyse distale. (D'après [Vereecken et al., 2007])



Le "*psoriasis vulgaris*" (PsV), nommé aussi "**psoriasis en plaques**" est la forme de la maladie la plus prévalente et toucherait 90% des patients. Il est caractérisé par des lésions cutanées érythémateuses et squameuses souvent symétriques, c'est à dire des plaques rouges et écailleuses. Ces plaques entraînent souvent des démangeaisons et sont parfois douloureuses. Elles apparaissent le plus souvent au niveau des surfaces extérieures des coudes, des genoux et dans le cuir chevelu.

Il existe cependant d'autres formes plus rares selon la morphologie de l'éruption [Thivolet and Nicolas, 1997a, Stevenson and Zaki, 2002, Bessis et al., 2005a, Vereecken et al., 2007] :

- **psoriasis en gouttes** (*psoriasis guttata*) : il est caractérisé par un début d'apparition soudaine de lésions rouges et écailleuses de petites tailles, arrondies, largement disséminés principalement au niveau du thorax et des membres proximaux, ressemblant à des gouttes d'eau aspergées sur le corps. Il débute généralement dans l'enfance ou l'adolescence et il est souvent déclenché suite à une infection de la gorge (par exemple, rhino-pharyngites, angines, amygdalites à streptocoques) ou suite à d'autres maladies comme le rhume ou la varicelle [Barker, 1991]. Certains patients atteints de psoriasis en gouttes peuvent développer plus tard un psoriasis en plaques [Mallon et al., 2000, Naldi et al., 2001, Asumalahti et al., 2003a].
- **psoriasis pustuleux** : il est caractérisé par des pustules blanc-jaunâtres (amicrobiennes) généralisées ou localisées comme le psoriasis annulaire ou le psoriasis palmo-plantaire. Cette dernière, survenant à l'âge adulte, présente des lésions souvent inflammatoires et avec des fissures sur la partie charnue des mains ou des pieds, s'accompagnant parfois de douleurs et de démangeaisons.
- **psoriasis érythrodermique** : c'est une atteinte grave érythémato-squameuse et oedémateuse de la totalité du corps y compris le visage, le cuir chevelu, les paupières. Selon le type d'érythrodermie (toxidermie ou pas), les lésions sont soit sèches en raison d'un important phénomène de desquamation soit humides et fissurées dans le cas de toxidermie, une érythrodermie le plus souvent provoquée par des médicaments. Il est aussi associé à des difficultés de mouvements, à des articulations douloureuses. Ce type de psoriasis peut être le premier signe de psoriasis ou être un signe d'aggravation d'un psoriasis en plaques. Cette atteinte de la barrière cutanée provoque des nombreuses anomalies dont la thermorégulation (fièvre, frissons, hyperhypo-thermie), pouvant amener à des complications infectieuses.
- **psoriasis inversé** : c'est une atteinte des plis de flexion et aussi des plis inter-fessiers, sous-mammaires et ombilicales.

3.2.2 Symptômes associés

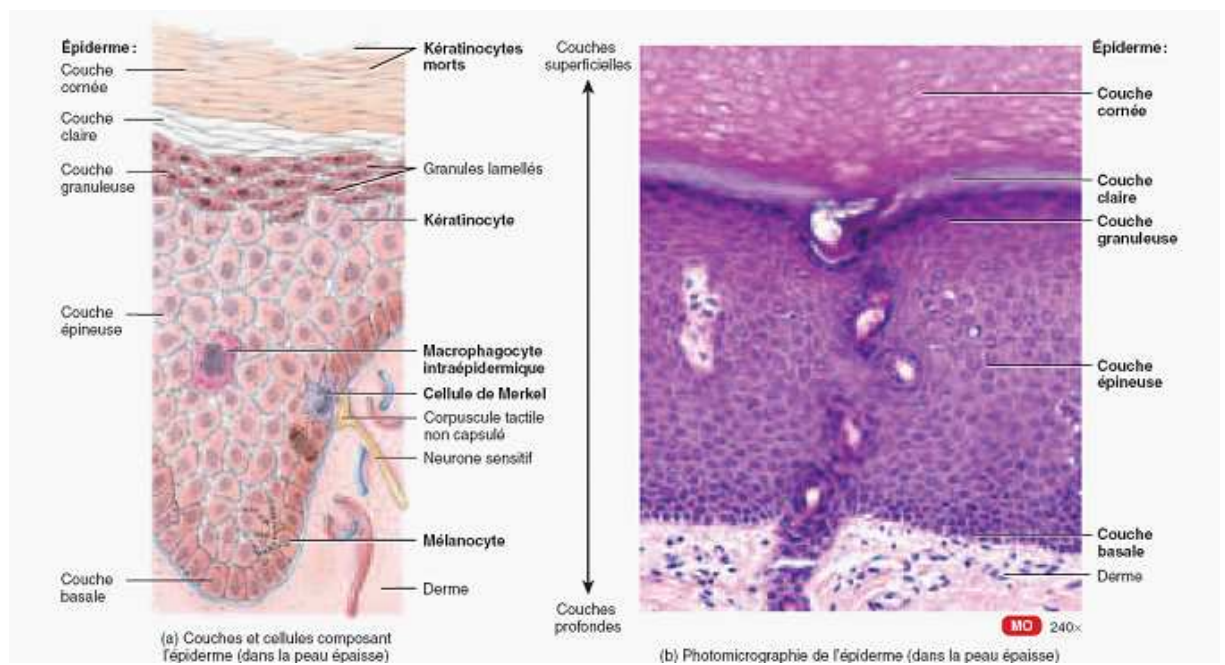
Plus de la moitié des patients souffrant de psoriasis développent une atteinte des ongles : décoloration de l'ongle, hyperkératose sous-unguéale (donnant des ongles mal formés, épaissis et granuleux), onycholyse (affection de l'ongle caractérisée par son décollement) ou présence de stries [Lavaroni et al., 1994, Larko, 1995, Stevenson and Zaki, 2002]. Le psoriasis peut également être accompagné d'arthrite psoriasique (PsA) dans 5-30% des individus atteints qui se manifeste par des douleurs, des épanchements ou des douleurs à la pression touchant les articulations isolées, provoquant une perte de mobilité [Bowcock, 2005]. Les atteintes articulaires varient beaucoup et touchent, notamment, le dos, les poignets, les genoux, les chevilles mais surtout, les articulations des doigts et des orteils.

3.3 L'organe atteint, la peau

Le psoriasis est une maladie de la peau, organe vital couvrant la surface du corps et jouant un rôle essentiel dans la protection contre l'environnement extérieur et ses agressions [Derrickson and Tortora, 2007]. Cette barrière physique est constituée de trois compartiments : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le psoriasis touche en particulier le compartiment le plus externe, l'épiderme, un épithélium stratifié kératinisé composé principalement de kératinocytes (~90%) mais aussi d'autres cellules assurant l'immunité, la pigmentation et la perception tactile comme les cellules de Langerhans, les mélanocytes et les cellules de Merkel respectivement. L'épiderme est composé de quatre couches principales, Figure 1.9 :

- **la couche basale** (*stratum basale*) est la couche la plus profonde de l'épiderme, formant une seule épaisseur de kératinocytes cubiques, avec un gros noyau. Ces cellules, en se divisant continuellement pour produire de nouveaux kératinocytes, permet d'assurer le renouvellement de l'épiderme.
- **la couche épineuse** (*stratum spinosum*) comporte plusieurs strates (8 à 10) de cellules aplaties et polyédriques (à plusieurs facettes), reliées étroitement entre elles par l'intermédiaire de la fixation des tonofilaments (filaments intermédiaires du cytosquelette, composés de kératines) aux desmosomes (des jonctions d'ancrage membranaires intercellulaires) formant ainsi un réseau stabilisé et conférant à la peau résistance et souplesse.
- **la couche granuleuse** (*stratum granulosum*) est formée de quelques strates (3 à 5) de cellules très aplaties en apoptose (mort cellulaire ordonnée et programmée génétiquement), marquant ainsi une démarcation entre les kératinocytes actifs des couches profondes et les cellules mortes des couches superficielles (les cornéocytes). Le noyau et les organites cytoplasmiques commencent à dégénérer et surtout de nombreux grains de kératohyaline et des kératinisomes apparaissent au sein du réseau tonofilamentaire.

FIG. 1.9: Différentes couches de l'épiderme
(D'après [Derrickson and Tortora, 2007])



Les grains de kératohyaline contiennent la profilagrine qui, dans la couche cornée, se transforme en filagrine, la matrice du cytoplasme des cornéocytes. Les kératinisomes (ou corps lamellaires) sont des granules qui produisent une substance riche en lipides sécrétées par exocytose dans les espaces intercellulaires des couches supérieures agissant comme un ciment et permettant ainsi un revêtement imperméabilisant limitant les infiltrations et les déperditions d'eau.

- et enfin, la couche la plus externe, **la couche cornée** (*stratum corneum*), comprend de nombreuses couches (25 à 30) de kératinocytes morts et complètement aplatis (les cornéocytes), contenant essentiellement des kératines et des grains de kératohyaline. Le noyau et les organites cytoplasmiques des cornéocytes ont totalement disparu. L'imperméabilité de la couche cornée est garantie par les lipides produits par les kératinisomes, cimentant les cornéocytes entre eux mais aussi par les épaisseurs multiples de cellules mortes. En superficie de cette couche, les cornéocytes se détachent de l'épiderme (desquamation) après lyse du ciment intercellulaire et des cornéodesmosomes (desmosomes de la couche cornée). Ces cellules sont donc éliminées continuellement et remplacées à mesure par des cellules des couches plus profondes.

Ces différentes couches correspondent aux étapes progressives de différenciation des cellules migrantes et principales de la peau, les kératinocytes, en commençant par leur zone de prolifération (la couche basale) jusqu'à leur zone de différenciation finale (la couche cornée) où ces cellules accumulent une quantité croissante de kératine (la kératinisation des cellules), entrent ensuite en apoptose et meurent (perte du noyau et de leurs organelles). Les facteurs régulant ce processus complexe sont peu connus mais l'équilibre entre ces différentes étapes entre le renouvellement des kératinocytes et la desquamation des cornéocytes semble être essentiel pour garantir l'intégrité de cette barrière protectrice.

3.4 La pathogenèse du psoriasis

Les principales caractéristiques du psoriasis sont la prolifération et la différenciation anormale des kératinocytes, l'infiltration de l'épiderme par des cellules inflammatoires et enfin, des changements vasculaires. L'interaction entre les différents types cellulaires tels que les cellules épidermiques (les kératinocytes et les fibroblastes), les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (les cellules T et les cellules présentatrices d'antigène) et celles du système vasculaire (les cellules endothéliales) semble jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie, mais le défaut primaire responsable de cette maladie reste encore à être identifié.

3.4.1 Kératinocytes

Histologiquement, le psoriasis est caractérisé par une acanthose (un épaississement de la couche épineuse) due à une augmentation de la prolifération des cellules épidermiques, les kératinocytes [Lowe et al., 2007]. Dans la peau atteinte, le processus amenant de l'étape de prolifération à celle de la différenciation finale (desquamation) des cellules se produit rapidement, en quelques jours (3-4 jours), ce qui diffère de la peau normale où le processus prend 4 à 6 semaines [Liu et al., 2007]. De plus, une augmentation du nombre de kératinocytes en division, ainsi que le raccourcissement de la durée de leur cycle cellulaire, dans la couche basale de l'épiderme psoriasique est observée [Ortonne and Ortonne, 1999]. Au niveau des lésions psoriasiques de la peau, une différenciation épidermique altérée est également observée, démontrée par une hyperkératose (épaississement de la couche cornée), ainsi qu'une parakératose (maturation anormale de cette même couche) traduite par la présence de noyaux dans les kératinocytes de cette dernière couche et par la disparition partielle ou totale de la couche granuleuse (l'agranulose), donnant l'aspect squameux observé [Bowcock and Krueger, 2005]. La conséquence de cette maturation incomplète des kératinocytes en cornéocytes (cellules de la couche cornée) est la structuration incorrecte de la barrière épidermique qui est due à l'incapacité des cornéocytes à adhérer entre eux, à s'aplatir normalement ou à sécréter des lipides extracellulaires afin de former la couche protectrice, la couche cornée [Liu et al., 2007, Lowe et al., 2007].

Dans les lésions, certains kératinocytes synthétisent et expriment à leur surface de nombreuses protéines, telles qu'ICAM-1 (la molécule 1 d'adhésion intracellulaire), CD40, HLA-DR et E-cadhérine, pouvant être des facteurs chimiotactiques qui attirent les cellules immunitaires, ou des facteurs qui permettent la migration des cellules immunitaires circulantes *via* leurs récepteurs de surface comme les intégrines β_2 et $\alpha_E\beta_7$ pour les ligands ICAM-1 et E-cadhérine [Abrams et al., 2000, Liu et al., 2007, Lowe et al., 2007].

3.4.2 Angiogenèse

L'aspect érythémateux ou rouge des plaques psoriasiques est dû à la dilation des vaisseaux du derme. L'angiogenèse, observée par l'élongation des vaisseaux, semble être médiée par les kératinocytes à travers la synthèse de mitogènes cellulaires comme VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et PDGF (*platelet-derived growth factor*) [Liu et al., 2007]. Inversement, les cellules endothéliales activées surproduisent des facteurs induisant la prolifération des kératinocytes comme KGF (*keratinocyte growth factor*).

De plus, l'ancrage ainsi que la migration des cellules immunitaires au sein de la peau, comme les lymphocytes et les neutrophiles, semblent être favorisés par l'expression à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux, de molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1* ou CD54), VCAM-1

(*vascular cell adhesion molecule-1* ou CD106), E-selectin (CD62E) [Lowe et al., 2007].

3.4.3 Cellules immunitaires

Les cellules immunitaires, spécialement les lymphocytes T, semblent avoir un rôle important dans la pathogenèse du psoriasis. Une des anomalies caractéristiques du psoriasis est l'inflammation, résultant à la fois d'une infiltration excessive du derme et de l'épiderme par des cellules du système immunitaire et de la libération, par celles-ci, de cytokines pro-inflammatoires [Bhalerao and Bowcock, 1998]. Une infiltration anormale de cellules mononuclées telles que les cellules T activées, principalement CD4+ (T auxiliaire 1) et des cellules dendritiques (cellules phagocytaires et présentatrices d'antigène) comme les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques myéloïdes CD11c+ est observée dans le derme. Dans l'épiderme, des cellules mononuclées telles que les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques myéloïdes CD11c+ restent présentes avec accumulation de lymphocytes T activés CD8+ (T cytotoxique 1). Des neutrophiles, cellules polynuclées, sont aussi observés dans la couche cornée [Liu et al., 2007, Lowe et al., 2007].

D'autres observations plaident en faveur du rôle prépondérant des lymphocytes T dans l'initiation et le maintien de l'inflammation dans le psoriasis et ainsi amènent à définir cette maladie comme une maladie auto-immune. Outre l'implication du système HLA, l'effet bénéfique des immunosuppresseurs dans le traitement de la maladie sont en faveur d'une origine auto-immune de la maladie. Les immunosuppresseurs sont des molécules bloquant les fonctions des lymphocytes T (comme la ciclosporine A, les anticorps anti-CD4) [Gottlieb et al., 1991, Gottlieb et al., 1995]. Par ailleurs, le psoriasis est souvent plus grave lors de l'infection par le VIH, connu pour infecter les lymphocytes T CD4+ [Duvic, 1990, Mallon and Bunker, 2000]. Enfin, l'injection de lymphocytes autologues de patients chez des souris immunodéficientes ayant été greffées avec de la peau saine de patients psoriasiques reproduit des lésions de psoriasis sur la peau greffée [Wrone-Smith and Nickoloff, 1996].

3.4.4 Interactions cellulaires

La cause du psoriasis reste aujourd'hui inconnue. Le psoriasis fait néanmoins partie des maladies auto-immunes qui sont caractérisées par une perte de la tolérance du soi, due à une réponse immune suractivée contre les antigènes du soi impliquant à la fois le système immunitaire humoral et cellulaire. Même si l'auto-antigène pathogène n'est pas réellement identifié, les anomalies observées lors de cette maladie semblent le confirmer et dévoilent, entre autres, une contribution conjointe et excessive de deux types cellulaires différents dans la pathogenèse du psoriasis : les kératinocytes et les leucocytes. Il existe une interaction complexe

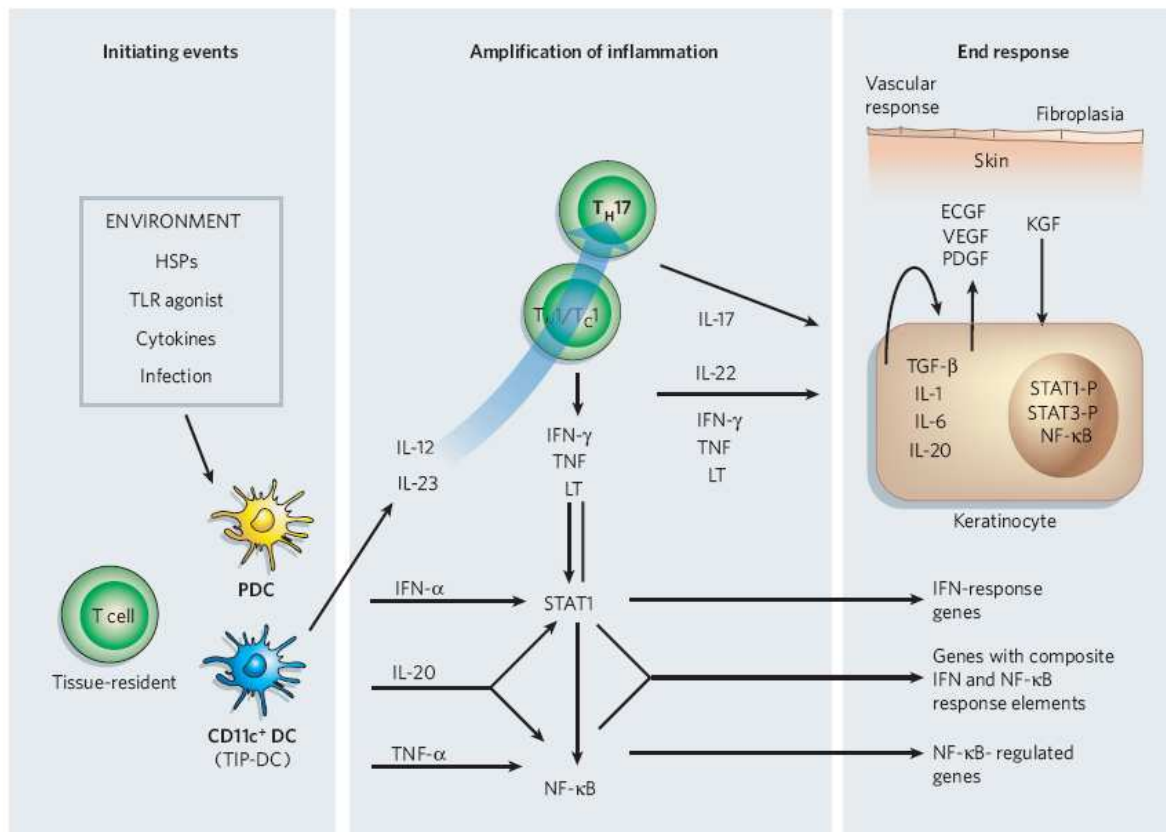
entre les cellules des systèmes immunitaires inné et acquis et les kératinocytes qui participent au recrutement et à l'activation des leucocytes *via* des facteurs et *vice versa* créant un cercle vicieux (Figure 1.10).

Les cellules de l'immunité innée sont majoritairement des cellules phagocytaires qui assurent une réponse inflammatoire immédiate et non spécifique à un pathogène. Les cellulaires phagocytaires ont la capacité de phagocyter et de détruire le pathogène rencontré. D'autres cellules, intermédiaires entre les deux types d'immunité, dites "présentatrices d'antigène" peuvent reconnaître des composés bactériens, les phagocyter et les présenter à l'aide des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I ou II) à d'autres cellules du système immunitaire notamment les lymphocytes, particulièrement les lymphocytes T, provoquant leur activation. Les peptides CMH de classe I sont exprimés par la plupart des cellules et présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T CD8+. Les peptides CMH de classe II, exprimés à la surface des cellules immunitaires, permettent la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T CD4+ (Tableau 1.5). Les cellules immunitaires non-spécifiques, présentes dans les lésions psoriasiques, sont les neutrophiles et des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques plasmacytoides et les dendritiques CD11c+. La migration des neutrophiles dans l'épiderme est due à un gradient chimotactique obtenu grâce à des molécules comme IL-8, CXCL1 et S100A7/A8/A9 produites par les kératinocytes. Les cellules dendritiques CD11c+ activées, par la production de cytokines IL-23, IL-20, IL-12 et IFN- α , activent les cellules T mais aussi pour certaines, les kératinocytes pour enclencher la réponse inflammatoire.

Contrairement aux cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité acquise sont les lymphocytes B et les lymphocytes T, qui assurent une réponse inflammatoire spécifique à un pathogène (Tableau 1.5). Dans le psoriasis, les acteurs principaux dans le déclenchement, le maintien de la réaction inflammatoire et même la prolifération des kératinocytes sont les lymphocytes T, plus particulièrement les lymphocytes activées CD4+ et CD8+. Dans le cas des lymphocytes T, le développement d'une immunité adaptative vis-à-vis d'un (ou plusieurs) antigène(s) découle de la reconnaissance de celui (ceux)-ci sous forme de peptide(s) associé(s) aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou de classe II exprimées à la surface des cellules "présentatrices", et particulièrement dans ces lésions, les cellules dendritiques. L'activation de ces lymphocytes se traduit par la libération de nombreuses cytokines. Il existe normalement un équilibre entre deux voies de réponses différentes par la médiation de deux types de cytokines, nommées type 1 ou type 2, qui sont capables de se réguler mutuellement

FIG. 1.10: Réseaux potentiels de cytokines dans les lésions psoriasiques

Cette figure montre certaines des interactions et les produits de cytokines et des facteurs de croissance qui sont sur-régulés dans les lésions de psoriasis. Environ 1300 gènes qui sont exprimés différemment dans les lésions psoriasiques sont connus pour être régulés par la famille de facteurs de transcription STAT et NFκB, aussi bien que par des facteurs de croissance, sur-régulés dans les lésions psoriasiques. Les cytokines clé qui peuvent activer les facteurs de transcription STAT3 et NFκB (impliqués dans l'amplification de l'inflammation) incluent TNFs, IL-1, IL-17, IL-20, IL622 et IFNs. Les DCs activés peuvent contribuer à la production d'IFNa, IL-20, IL-12 et IL-23. L'activation des cellules T à travers IL-12 ou IL-23 mène à la synthèse des cytokines inflammatoires. L'activation immune peut être initiée par l'activation des cellules DCs *via* entre autres des molécules (cytokines..) ou par l'interaction directe avec les cellules T. D'autres cytokines synthétisées par les kératinocytes régulent de manière croisée l'hyperplasie vasculaire et la fibroplasie qui apparaissent dans les lésions psoriasiques. TGF-α, IL-1, IL-6 et IL-20 peuvent jouer comme des facteurs de croissance paracrine ou autocrine pour les kératinocytes, sans exclure la possibilité d'un réseau complexe d'interaction entre chémokines. (D'après [Lowes et al., 2007])



TAB. 1.5: Rôle des cellules T effectrices dans les réponses de type cellulaire et de type humoral contre les pathogènes

Les réponses immunitaires de type cellulaire aboutissent à la destruction des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques et à la destruction des pathogènes intracellulaires par les macrophages activés par les cellules Th1. Les cellules Th1 peuvent aussi participer à l'immunité de type humoral comme les cellules Th2. En effet, les cellules Th1, par le biais de cytokines de type 1, promeuvent l'immunité à médiation cellulaire, l'activation des monocytes favorisant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TNFalpha. Elles sont nécessaires pour débarrasser l'organisme d'agents pathogènes intracellulaires (bactéries, macrophages infectés) mais peuvent provoquer des maladies inflammatoires chroniques. Les cellules Th1 participent également à l'immunité à médiation humorale en déclenchant la production d'anticorps qui favorisent la phagocytose des bactéries. D'autre part, les cellules Th2, *via* les cytokines de type 2, stimulent l'immunité à médiation humorale, la production d'anticorps (IL-4 et IL-13 pour les immunoglobulines IgE, IL-10 pour les IgG), activent les éosinophiles par l'IL-5, inactivent les monocytes et inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires par l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10. Elles sont essentielles pour combattre les agents pathogènes extracellulaires mais sont associées aux allergies et à l'asthme. (D'après [Janeway et al., 2003])

	Immunité de type cellulaire		Immunité de type humoral
Pathogènes typiques	Virus de la vaccine Virus de la grippe Virus de la rage <i>Listeria</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium leprae</i> <i>Leishmania donovani</i> <i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Clostridium tetani</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Virus de la polio <i>Pneumocystis carinii</i>
Localisation	Cytosol	Vésicules de macrophages	Liquide extracellulaire
Cellule T effectrice	Cellule T CD8 cytotoxique	Cellule T _H 1	Cellule T _H 1/T _H 2
Reconnaissance de l'Ag	Complexe CMH de classe I:peptide à la surface des cellules infectées	Complexe CMH de la classe II:peptide à la surface des macrophages	Complexe CMH de classe II:peptide à la surface des cellules B spécifiques de l'antigène
Action effectrice	Destruction des cellules infectées	Activation des macrophages infectés	Stimulation de la production d'anticorps par les cellules B spécifiques

FIG. 1.11: **Equilibre des cytokines Th1/ Th2 et leurs rôles dans l'immunité**

La différenciation des cellules naïves T CD4+ en cellules T helper de type 1 (Th1) ou de type 2 (Th2) est un aspect fondamental de la réponse immune aux larges implications dans la défense de l'hôte et la pathogenèse. Chacun des sous-types peut réguler les activités de l'autre sous-type. En effet, l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production d'IFN γ . Inversement, l'IFN γ inhibe la production d'IL-10 et agit aussi comme un facteur d'activation des monocytes, en agissant entre autres, sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1. (D'après le site : http://www.medspe.com/site/templates/template.php?identifiant_article=1221&surlignage=2)

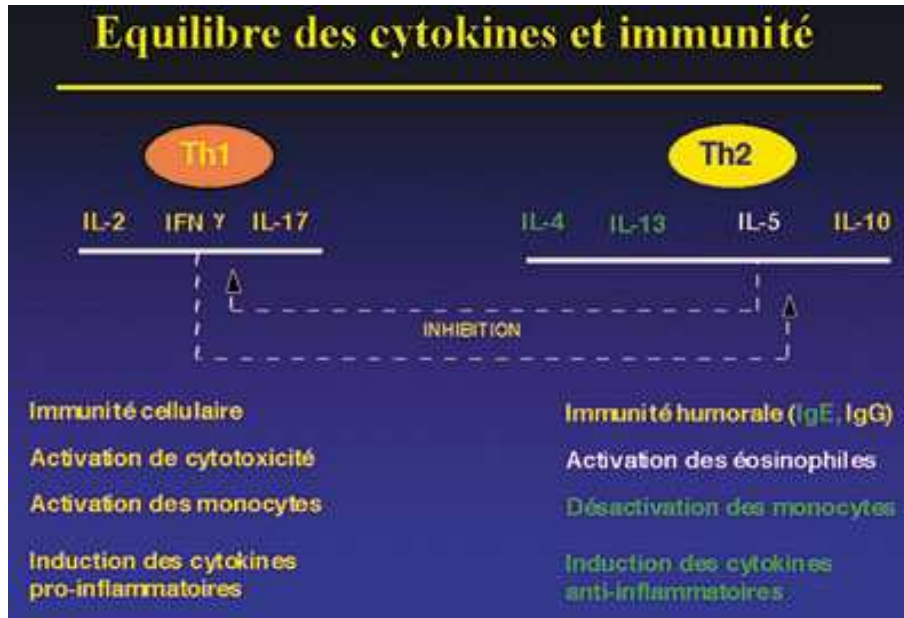
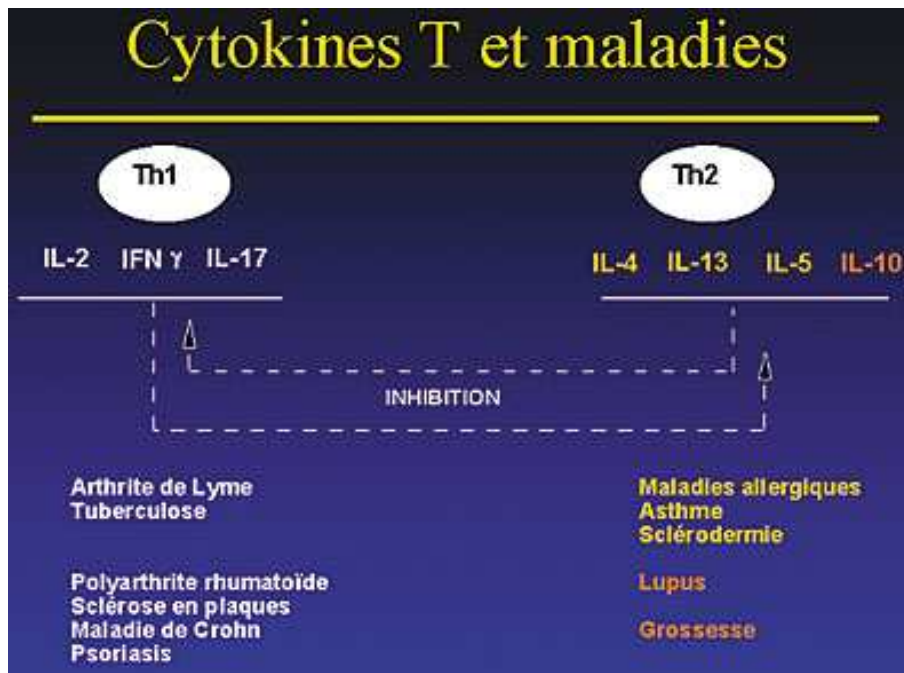


FIG. 1.12: **Lien entre les déséquilibres des cytokines et les maladies**

(D'après le site : http://www.medspe.com/site/templates/template.php?identifiant_article=1221&surlignage=2)



(Figure 1.11). Dans le cas du psoriasis, les cytokines libérées sont des cytokines de type 1 comme l'interleukine 2, l'interféron (IFN)- γ , le TNF- α et IL-17, contrairement à une autre maladie de la peau, la dermatite atopique, dont la déviation immune penche vers les cytokines de type 2 (IL-4, IL-13, IL-5, IL-10) (Figure 1.12). Ceci enclenche un ensemble de co-réactions entre les acteurs. Les cytokines agissent sur les kératinocytes ou les cellules immunitaires, ce qui accroît encore la sécrétion d'autres cytokines dont les chimiokines, molécules entraînant l'activation et le recrutement massif de nombreuses cellules de l'immunité sur le site inflammatoire. En effet, dans la peau psoriasique, de nombreuses cytokines (IL-1, IL-6, IL-17, IL-19, IL-20, IL-22, TNFs et les IFNs), régulant la prolifération des kératinocytes, sont surproduites par les leucocytes et inversement, les kératinocytes activées sécrètent des cytokines (IL-6, IL-8) et expriment aussi à leur surface certaines protéines (ICAM-1, CD40, HLA-DR, E-cadhérine) qui favorisent l'augmentation du flux des cellules T dans la peau. Dans les lésions, les chimiokines CCL19, CCL21, CXCL12 et CCL18 semblent activer les cellules T *via* leurs intégrines respectives. L'activation des cellules endothéliales des capillaires dermiques a pour conséquence la vasodilatation favorisant l'extravasation des cellules immunitaires circulantes *via* leurs interactions. Dans les lésions psoriasiques, on observe l'expression, à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux, de molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1, E-selectin qui permettent l'ancrage et la migration des cellules immunitaires au sein de la peau [Prinz, 2003, Liu et al., 2007, Lowes et al., 2007].

L'ensemble de ce processus complexe fait participer de manière croisée de nombreuses cellules de type cellulaire différent mais aussi de nombreux facteurs comme les cytokines, qui influencent au final des voies métaboliques intervenant entre autres, dans la prolifération, l'activation, la différenciation, l'adhésion et la migration de ces cellules. Une analyse génomique comparant l'expression des gènes dans la peau d'individus sains versus la peau atteinte et non atteinte de patients avec un psoriasis identifie une altération de l'expression de plus de 1300 gènes dans la peau atteinte, particulièrement ceux impliqués dans la prolifération épithéliale et dans le fonctionnement du système immunitaire [Zhou et al., 2003].

3.5 Les différents traitements

Aucun traitement ne permet à l'heure actuelle de guérir complètement ou définitivement du psoriasis. Cependant, il existe plusieurs possibilités de traitements pour atténuer l'étendue et la sévérité de la maladie et aussi pour améliorer la qualité de vie des patients. Le choix du traitement dépend de nombreux facteurs comme le type, l'étendue et la localisation des lésions psoriasiques, la réponse aux thérapies antérieures et leurs effets indésirables, les facteurs déclenchants et de l'état propre du patient (santé mentale/physique).

Les traitements classiques les plus couramment utilisés, parfois de manière combi-

TAB. 1.6: **Hiérarchie des choix thérapeutiques du psoriasis vulgaire**
(D'après [Vereecken et al., 2007])

1. Emollients.
2. Kératolytiques (vaseline salicylée).
3. Dermocorticoïdes (en combinaison ou en association ou non avec dérivés de vitamine D), dérivés de vitamine D, rétinoïdes topiques.
4. Photothérapie (PUVA, UVB-TL01), +/- dermocorticoïdes, coaltar.
5. Rétinoïdes systémiques.
6. Rétinoïdes + PUVA (rePUVA).
7. Méthotrexate, ciclosporine.
8. Agents biologiques.

nés, comprennent : le traitement local, la photothérapie, le traitement systémique (Tableau 1.6). Chaque patient est plus ou moins tolérant aux effets indésirables des différents traitements.

L'utilisation de nombreux traitements "à vie" a un impact financier important sur les budgets de la santé. On estime ainsi qu'aux Etats-Unis, le budget consacré à cette maladie représente environ 3 milliards de dollars par an [Bowcock and Cookson, 2004].

3.5.1 Traitements locaux

Les traitements locaux sont adoptés pour les formes légères de psoriasis, c'est-à-dire lorsque la surface corporelle atteinte est inférieure à 15%. Les principaux traitements locaux incluent les dermocorticoïdes, les analogues de la vitamine D3, un rétinoloïde par voie locale, le tazarotène, l'acide salicylique et les émoullients, disponibles sous différentes formes (lotion, pommade) [Thivolet and Nicolas, 1997b, Bessis et al., 2005b, Vereecken et al., 2007]. Les traitements à base de goudron sont abandonnés, notamment en raison de la gêne que cela occasionne (les odeurs, les taches et les risques cancérogènes).

L'acide salicylique est utilisé, à différentes concentrations variant de 2-25 % et sous plusieurs formes dont la vaseline salicylée, pour éliminer les squames des lésions psoriasiques. Cependant, l'acide salicylique a un effet irritant et érythématogène, surtout sur la peau non lésée. Absorbé par la peau en grande quantité, il peut être la cause d'une toxicité, surtout chez les enfants, se traduisant par, entre autres, des nausées et une hyperventilation.

Les corticoïdes locaux restent le traitement le plus largement prescrit pour le psoriasis et ont une action anti-inflammatoire, en inhibant la libération de médiateurs de l'inflammation et une action anti-proliférative, par exemple, des kératinocytes. Ils en existent avec différents niveaux d'activité, de faible (hydrocortisone, Aphilan [®]) à très forte activité (Bétaméthasone, Diprolène [®]) et, parfois combinés avec d'autres traitements comme l'acide salicylique (Bétaméthasone et acide salicylique, Diprosalic [®]). Ce traitement est de courte durée (un mois maximum) et de manière progressive afin d'éviter les effets secondaires (la fragilité, la finesse de la peau et les affections cutanées) dus à l'atrophie cutanée. De plus, un des inconvénients de ce traitement est souvent une récurrence rapide à l'arrêt du traitement.

D'autres produits, d'efficacité comparable aux corticoïdes, sont les analogues de la vitamine D3 comme le calcipotriol (Daivonex [®]), le tacalcitol (Apsor [®]) et le calcitriol (Silkis [®]). Ces molécules neutralisent la prolifération kératinocytaire et modulent la différenciation kératinocytaire. Elles peuvent être associées avec un dermocorticoïde (bétaméthasone, Daivobet [®]). Même si ce traitement n'entraîne pas d'atrophie cutanée, ni une récurrence après arrêt du traitement, il existe une possibilité d'irritation cutanée, surtout au niveau du visage et des plis, et un

risque d'hypercalcémie lors d'un surdosage.

L'utilisation du seul rétinoïde topique (Tazarotène, Zorac [®]) dans le traitement du psoriasis est restreinte en raison de son fort potentiel inflammatoire et irritant (brûlure, érythème). Il réduit l'hyperprolifération des kératinocytes et même corrige l'anomalie de différenciation de ces cellules.

Le traitement local peut par ailleurs être complété par des soins de peau et des bains de sel marin, de soufre et d'huiles.

3.5.2 Photothérapie

L'effet favorable de l'exposition solaire sur le psoriasis est bien connu. En cas de réponse insuffisante au premier type de traitement ou en cas de lésions plus étendues, atteignant plus de 20% de la surface corporelle, le traitement par photothérapie peut être envisagé. Les différentes techniques de photothérapie incluent les photothérapies UVB à large spectre et à spectre étroit, la PUVA-thérapie orale et locale, l'héliothérapie naturelle [Thivolet and Nicolas, 1997b, Bessis et al., 2005b, Vereecken et al., 2007].

L'amélioration des symptômes, lors des saisons ensoleillées, observée pour la majorité des patients indique l'utilité de l'héliothérapie naturelle (bains de soleil) comme premier traitement naturel. Néanmoins, pour certains patients, ces expositions peuvent aggraver leur dermatose, sans raison connue.

La photothérapie UVB à large spectre utilise la totalité du spectre UVB, correspondant au spectre du coup de soleil (de longueurs d'ondes 290 à 320 nm). L'amélioration du psoriasis se manifeste après une dizaine de séances, à raison de 2 à 3 par semaine. Ce traitement peut être utilisé avec certains émoullissants, qui relâchent et ramollissent la peau, ou des rétinoïdes, qui modifient l'épaisseur de la peau, favorisant la pénétration des UVB dans la peau. Cela permet de réduire la dose d'UVB administrée et la durée du traitement. Ce traitement nécessite une surveillance du patient et les UVB sont très érythématogènes. La photothérapie à spectre étroit est très efficace (82% des patients). Elle délivre un spectre d'environ 311 nm, permettant la destruction des lymphocytes T dans la peau lésée, et du fait de ce spectre plus sélectif, les effets secondaires semblent être moins nombreux. La combinaison de la photothérapie avec d'autres traitements semble être encore plus bénéfique tels que l'association avec des bains de sels (Thérapie Sole-Photo) ou du goudron (thérapie Goeckermann).

Une autre forme de photothérapie est la PUVA-thérapie, parfois associée à d'autres traitements topiques. Elle associe une exposition de 2 ou 3 séances par semaine, pendant une dizaine de semaines, au rayonnement UVA (de 320 à 400nm) et la prise simultanée de psoralènes, des substances photo-sensibilisantes telles que la Méladinine [®] ou le Psoraderm [®]. Cependant, elle fait figure de second choix en raison de ses nombreuses contre-indications (hypersensibilité à la lumière, cataracte, insuffisance hépatique/rénale), de ses effets indésirables (douleurs cutanées,

TAB. 1.7: Motivations pour initier un traitement systémique du psoriasis
(D'après [Vereecken et al., 2007])

1. Mauvaise réponse au traitement local et/ou à la photothérapie.
 2. Dose UV cumulative maximale atteinte ($> 2.000 \text{ J/cm}^2$, ou plus que 260 séances).
 3. Psoriasis étendu $> 10\text{-}15\%$.
 4. Formes inflammatoires : psoriasis érythrodermique, psoriasis pustuleux généralisé.
 5. Formes invalidantes : psoriasis palmo-plantaire rebelle, psoriasis articulaire, altération de la qualité de vie.
-

allergie, vieillissement et cancers cutanés).

3.5.3 Traitement systémique

Pour les formes plus sévères et résistantes au traitement, une thérapie systémique est envisagée avec des rétinoïdes, le méthotrexate ou la cyclosporine [Thivolet and Nicolas, 1997b, Bessis et al., 2005b, Vereecken et al., 2007]. La corticothérapie systémique est strictement interdite en raison du risque de rebond avec évolution vers une forme plus grave comme pustuleuse ou érythrodermique du psoriasis. Pour le choix de chaque traitement, une bonne connaissance des contre-indications et des effets indésirables sont nécessaires pour une administration correcte de ces médicaments (Tableau 1.7).

Le méthotrexate est un inhibiteur compétitif d'une enzyme indispensable à la synthèse de l'ADN et agit donc comme un agent antinéoplasique et anti-métabolique en inhibant la prolifération cellulaire. Les effets secondaires les plus sérieux, à part les nausées et les vomissements, consistent en une toxicité pour le foie et les poumons. La deuxième option de traitement systémique, limitée par ses nombreux effets secondaires est la cyclosporine, un immunosuppresseur puissant et spécifique des lymphocytes T, qui inhibe donc les réactions immunitaires à médiation cellulaire. En se fixant sur un récepteur spécifique, elle bloque la voie d'activation calcineurine (phosphatase) dépendante et par conséquent, inhibe la production de cytokines nécessaires à la réponse immune (IL-2) ainsi que leur libération. Le dernier traitement, utilisé dans des cas particuliers tel que l'érythrodermie psoriasique, est la rétinoïdo-thérapie avec l'acitrétine (Soriatane [®]). Comme les autres rétinoïdes, il réduit l'hyper-prolifération des kératinocytes. Cependant, son mode d'action reste peu connu. Il est tératogène, pouvant ainsi provoquer un développement anormal de l'embryon d'où sa contre-indication chez la femme enceinte et son utilisation obligatoire avec des contraceptions pendant et jusqu'à deux ans après la fin du traitement. Ce traitement nécessite une surveillance biologique car en plus des effets secondaires (sécheresse cutanée), il provoque des perturbations biologiques notamment hépatiques comme une augmentation d'enzymes (les transaminases), l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie.

3.5.4 Traitement avec des agents biologiques

En plus des traitements classiques, la recherche effectuée sur le système immunitaire et sur son rôle, particulièrement celui des lymphocytes T dans le psoriasis a permis la mise au point d'agents biologiques qui réduisent l'étendue et la sévérité de la maladie et ciblent les causes sous-jacentes du psoriasis [Thivolet and Nicolas, 1997b, Bessis et al., 2005b, Lowes et al., 2007, Vereecken et al., 2007]. Ils représentent une importante percée dans le traitement du psoriasis modéré à sévère. La tolérance et la toxicité restent cependant encore inconnues. Comparés aux traitements locaux qui peuvent intervenir sur la prolifération ou la différen-

TAB. 1.8: Exemples de thérapies systémiques du psoriasis
(D'après [Loves et al., 2007])

Table 1 Examples of systemic therapeutics for psoriasis vulgaris		
Generic name (trade name)	Target	Status
Agents used in early studies to establish immunological basis of psoriasis		
Denileukin diftitox*/DAB389IL-2 (Ontak)	CD25 (toxic)	
Abatacept/CTLA4lg (Orencia)	CD80 and CD86	
Tacrolimus/FK506 (Prograf)	Calcineurin	
Daclizumab*† (Zenepax)	CD25 (antagonist)	
Basiliximab*† (Simulect)	CD25 (antagonist)	
Widely used systemic agents approved for use (immunosuppressives)		
Cyclosporine* (Neoral, Gengraf)	Calcineurin	Widely used
Methotrexate (Rheumatrex, Trexall)	Leukocytes	Widely used
Fumarates*	T cells	Widely used in Germany
Approved biological agents		
Alefacept* (Amevive)	CD2	FDA approved
Efalizumab*† (Raptiva)	CD11a (LFA-1)	FDA and EMEA approved
Infliximab†‡ (Remicade)	TNF	FDA and EMEA approved
Etanercept‡ (Enbrel)	TNF, lymphotoxin	FDA and EMEA approved
Drugs/biological agents under investigation (human or murine trials)		
Adalimumab†‡ (Humira)	TNF	In clinical trials ⁵⁹ (FDA approved for psoriatic arthritis)
Pimecrolimus	Calcineurin	In clinical trials ⁶⁰
Cent-1275†‡	IL-12/23p40	In clinical trials ⁶¹
ABT-874†‡	IL-12/23p40	In clinical trials
146B7†‡	IL-15	In clinical trials ⁶⁸

*T-cell targeted.
†Monoclonal antibodies.
‡Cytokine inhibitors.

ciation des kératinocytes (les analogues de la vitamine D3, les rétinoïdes), les agents biologiques, qui sont des protéines de fusion ou des anticorps, ciblent des molécules spécifiques intervenant dans l'effet pathogénique des cellules T dans le psoriasis. Ils ont pour but de bloquer l'activation des lymphocytes T en agissant sur les lymphocytes ou sur les cellules dendritiques en intervenant sur la prolifération des lymphocytes T ou sur la modulation de la production des cytokines par de nombreux types cellulaires.

Ces agents peuvent être classés en 4 groupes [Lowes et al., 2007], représentés dans le tableau 1.8 :

- des agents utilisés lors de l'étude des bases immunologiques du psoriasis tels que l'Abatacept (Orencia $\text{\textcircled{R}}$), Tacrolimus (Prograf $\text{\textcircled{R}}$) ou Daclizumab (Zenepax $\text{\textcircled{R}}$)
- des agents immunosuppresseurs largement utilisés tels que la cyclosporine (Gengraf $\text{\textcircled{R}}$), la méthotrexate (Trexall $\text{\textcircled{R}}$), précédemment décrits ou les fumarates
- des agents récemment acceptés tels que l'Aléfacept (Amevive $\text{\textcircled{R}}$), Efalizumab (Raptiva $\text{\textcircled{R}}$), Infliximab (Remicade $\text{\textcircled{R}}$)
- des agents encore en étude tels que l'Adalimumab (Humira $\text{\textcircled{R}}$), Pimecrolimus.

Dans les thérapies biologiques nouvellement utilisées ou en cours d'études, les agents adalimumab, éfalizumab et infliximab sont des anticorps monoclonaux alors que les agents aléfacept et étanercept sont des protéines de fusion.

L'aléfacept et l'éfalizumab ciblent des protéines de structures des cellules T et inhibent l'activation et le recrutement de ces cellules. L'aléfacept se lie à une molécule, CD2, présente à la surface de cellules T, de cellules NK (*natural killer*) et de certaines cellules dendritiques et bloquent l'interaction de CD2 avec d'autres molécules, comme LFA-3 des cellules dendritiques, nécessaires pour la réponse immunitaire. L'éfalizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre une sous-unité de LFA-1, CD11a, présente spécifiquement à la surface des cellules T. L'interaction de LFA-1 avec ICAM-1 ou ICAM-2 permet l'adhésion des cellules T à d'autres cellules dont les cellules dendritiques, un contact capital pour le processus immunitaire, et les cellules endothéliales, favorisant l'entrée des cellules T circulantes dans la peau.

Pour des atteintes sévères de psoriasis, des inhibiteurs du TNF, bloquant l'interaction de cette cytokine pro-inflammatoire importante dans la pathogenèse du psoriasis avec son récepteur, semblent être un nouveau type de traitement. Les anti-TNF-*alpha* (*tumor necrosis factor-alpha*) utilisés ou encore en étude sont l'étanercept (Enbrel $\text{\textcircled{R}}$), l'adalimumab et l'infliximab. Contrairement à l'étanercept qui se lie au TNF soluble, les deux autres molécules ciblent aussi le TNF fixé sur ses récepteurs. De nouvelles thérapies, encore en cours d'étude, ciblent les

interleukines clés du psoriasis comme IL-12 ou IL-23 en prenant comme nouveaux agents des anti-interleukines.

Ces nouveaux traitements sont très coûteux (environ 3 800 euros/an) avec une efficacité très variable allant d'une absence totale de réponse à une rémission complète. Le rapport risque/bénéfice reste à être déterminé pour des traitements de longue durée car ces médicaments sont potentiellement des immunosuppresseurs. Ainsi, certains effets comme les risques d'infection, la réactivation d'autres infections comme la tuberculose et celui des lymphomes doivent être pris en compte lors du choix de ce type de traitement.

3.6 La génétique du psoriasis

3.6.1 Caractère "Multifactoriel"

Le psoriasis est une maladie dite "multifactorielle" ou "complexe" c'est-à-dire une maladie due, dans des proportions encore mal connues, à des facteurs génétiques et à des facteurs environnementaux. L'étiologie de cette maladie reste encore mal connue.

La difficulté de l'analyse de ce type de maladie résulte de la complexité de l'hérédité exprimée par de nombreuses variations de l'expression phénotypique, de l'hétérogénéité génétique et des interactions entre facteurs génétiques et environnement. Ceci n'entraîne donc pas une corrélation simple entre le phénotype "maladie" et la constitution génétique, le génotype.

Pendant des années, le mode de transmission de la maladie est resté incertain. Certaines études suggèrent un mode de transmission monogénique autosomique dominant avec une pénétrance incomplète du ou des gène(s) délétère(s). Selon les études, la pénétrance de la maladie serait estimée entre 30% et 80% [Elder et al., 1994].

Depuis la réalisation d'analyses de ségrégation sur des familles non présélectionnées, il est aujourd'hui accepté qu'il s'agit d'une hérédité multifactorielle [Pietrzyk et al., 1982] pouvant être due à des interactions avec les facteurs suivants :

– **L'impact de l'environnement** :

De nombreux facteurs environnementaux sont impliqués dans l'apparition ou l'aggravation d'un psoriasis. Certains facteurs physiques comme les traumatismes, la pression ou le grattage de la peau, peuvent déclencher la survenue de nouveaux foyers par un effet d'irritation (phénomène de Koebner) [Bhalerao and Bowcock, 1998, Raychaudhuri and Gross, 2000b]. Certaines drogues/médicaments (les bêtabloquants, la chloroquine/hydroxychloroquine, le lithium, l'interféron) aussi bien que des infections virales ou bactériennes (au VIH/à streptocoques) semblent aussi jouer un rôle. Les infections à streptocoques ont été associées à l'apparition du psoriasis en gouttes

mais aussi à l'aggravation du psoriasis en plaques [Valdimarsson et al., 1997, Skov and Baadsgaard, 2000]. La séropositivité au virus VIH et plus généralement une déficience immunitaire peuvent faciliter l'apparition d'un psoriasis, souvent d'évolution plus grave et réfractaire aux thérapeutiques conventionnelles [Duvic, 1990, Mallon and Bunker, 2000, Bowcock and Cookson, 2004].

Des facteurs d'ordre psychologique semblent aussi intervenir dans le déclenchement du psoriasis puisque l'apparition de la maladie fait souvent suite à un événement stressant ou traumatisant [Raychaudhuri and Gross, 2000a, Raychaudhuri and Gross, 2000b, Kirby et al., 2001]. Les abus d'alcool et de nicotine et même le surpoids sont parfois évoqués comme facteurs de risque pour le psoriasis [Raychaudhuri and Gross, 2000a, Raychaudhuri and Gross, 2000b, Kirby et al., 2001, Ockenfels, 2003, Bowcock, 2005, Griffiths and Barker, 2007].

- **l'impact génétique** est également important et est détaillé dans le paragraphe suivant.

3.6.2 Composante génétique

A l'origine, le caractère "génétique complexe" a été suggéré par des études cliniques, tel qu'une expression variable de la maladie au sein des familles :

- l'âge du début de la maladie variant entre 10 et 30 ans dans les formes familiales.
- une association entre une forme grave du psoriasis et un autre symptôme, l'arthropathie sévère, décrite dans 5 à 30% des cas [Bowcock, 2005].

Plus tard, des études familiales plus détaillées ont prouvé l'existence d'une forte prédisposition génétique au psoriasis [Elder et al., 1994] :

- on estime que les apparentés du premier degré des individus atteints de la maladie ont un risque de 8-23% plus élevé que ceux de la population générale de développer un psoriasis [Krueger and Duvic, 1994]. Par exemple, le risque pour des germains d'un individu atteint de psoriasis, est de 4 fois supérieur à celui dans la population générale. Ce risque relatif assez élevé pour les apparentés d'un individu atteint d'une maladie commune laisse suspecter qu'il existerait un nombre limité de gènes en cause au sein d'une même famille [Elder et al., 1994].
- les études de jumeaux qui montrent un taux de concordance de la maladie de 65-72% pour les jumeaux monozygotes et de 15-23% pour ceux dizygotes dans des populations européennes et américaines [Bhalerao and Bowcock, 1998]. En revanche, une étude de jumeaux réalisée dans une population

TAB. 1.9: **Taux de concordance de différentes maladies multifactorielles chez les jumeaux monozygotes et dizygotes** (D'après [Bhalerao and Bowcock, 1998, Los et al., 1999, Revillard, 2001, Feingold, 2005])

Maladie multifactorielle	Taux de concordance chez les jumeaux monozygotes	Taux de concordance chez les jumeaux dizygotes
Asthme	45-76%	20-25%
Diabète de type I	30-60%	5%
Lupus érythémateux disséminé	20-34%	2-5%
Maladie de Crohn	35-58%	4%
Polyarthrite rhumatoïde	15-17%	4%
Psoriasis	65-72%	15-23%
Sclérose en plaques	15-31%	2-3%

australienne a montrée des taux de concordance plus faibles, avec 35% pour les jumeaux monozygotes et 12% pour ceux dizygotes [Duffy et al., 1993, Bowcock and Cookson, 2004]. En comparaison avec d'autres maladies multifactorielles, cette grande différence du taux de concordance entre les deux types de jumeaux indique la forte composante génétique responsable du psoriasis, Tableau 1.9. Puisque le taux de concordance du psoriasis n'atteint pas 100% chez les jumeaux monozygotes, qui ont pourtant en commun 100 % de leurs gènes, les facteurs environnementaux semblent donc également jouer un rôle dans la maladie. La composante héréditaire du psoriasis a été estimée en moyenne entre 60-90%. Par exemple, dans la population australienne, l'héritabilité est évaluée à 80% [Duffy et al., 1993, Bowcock and Cookson, 2004].

- l'identification d'un facteur génétique avec la forte association entre des molécules nécessaires dans la reconnaissance du soi par le système immunitaire, les antigènes de classe I (B13, B17, B37, B57, Cw6) et de classe II (DR7 et DQ9) du système HLA (Human Leukocyte Antigen), et le psoriasis a été démontrée dès les premières études sur la maladie [Elder et al., 1994, Bhalerao and Bowcock, 1998]. De plus, l'aspect des lésions histologiques avec infiltration par des lymphocytes et l'association entre le psoriasis et le système HLA classent le psoriasis dans le groupe des maladies auto-immunes cellules T-dépendantes [Elder et al., 1994, Bhalerao and Bowcock, 1998], comme la spondylarthrite ankylosante ou le vitiligo.

Ces différentes observations indiquent donc l'existence d'une forte composante génétique, c'est-à-dire, l'intervention de gènes prédisposant au psoriasis.

3.6.3 Identification des gènes

Afin de localiser les régions dans lesquelles les gènes pourraient avoir un rôle dans la prédisposition au psoriasis, plusieurs équipes ont effectué des balayages du génome sur différents types de cohortes : des familles nucléaires, et/ou des familles multiplexes, et/ou des cas-témoins.

Le développement de nombreux modèles statistiques (études de liaison et/ou d'association), largement décrits précédemment, a permis une meilleure extraction des informations contenues dans les familles étudiées, où la majorité des patients sont atteints de psoriasis vulgaire. L'analyse de ces données a révélé la présence de plusieurs localisations de gènes de prédisposition au psoriasis, présents sur plusieurs chromosomes. Les études de liaison ont révélé une vingtaine de loci potentiels lors de ces dernières dizaines d'année dont neuf loci nommés *PSORS1* à *9* ont été identifiés respectivement sur les chromosomes 6p21, 17q25, 4q32-35,

1q21, 3q21, 19p13, 1p, 16q et 4q27-31 [Tomfohrde et al., 1994, Matthews et al., 1996, Nair et al., 1997, Trembath et al., 1997, Capon et al., 1999a, Enlund et al., 1999a, Enlund et al., 1999b, Oka et al., 1999, Samuelsson et al., 1999, Lee et al., 2000, Nair et al., 2000, Capon et al., 2001, Veal et al., 2001, Veal et al., 2002, Zhang et al., 2002, Allen et al., 2003, Hensen et al., 2003, Karason et al., 2003, Speckman et al., 2003, Zheng et al., 2003, Sagoo et al., 2004, Karason et al., 2005, Hwu et al., 2005, Birnbaum et al., 2006, Friberg et al., 2006, Cargill et al., 2007, Yan et al., 2007, Chang et al., 2008a, Liu et al., 2008, Wolf et al., 2008].

D'autres régions avec une liaison statistiquement moins significative ont été décrites sur les chromosomes 1q, 2p, 2q, 3q, 4p, 5p, 6p, 6q, 7p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10q, 11q, 12p, 12q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18p, 18q, 20p, 21q et 22q [Trembath et al., 1997, Nair et al., 1997, Samuelsson et al., 1999, Lee et al., 2000, Veal et al., 2001, Zhang et al., 2002, Allen et al., 2003, Asumalahti et al., 2003b, Sagoo et al., 2004, Karason et al., 2005, Friberg et al., 2006, Sun et al., 2007, Chang et al., 2008a, Liu et al., 2008, Sun et al., 2008, Wolf et al., 2008]. La description non exhaustive des tests, du type et de l'origine des familles utilisées jusqu'à ce jour est résumée dans le Tableau 1.10.

Afin de confirmer les loci de prédisposition, on cherche en général à répliquer les analyses de liaison ou d'association au niveau du même locus sur des jeux de données familiales indépendantes. En effet, pour une maladie multifactorielle, plusieurs facteurs compliquent les analyses de liaison, donc l'évaluation des loci de prédisposition. Ces facteurs incluent la pénétrance incomplète, les phénocopies, les individus mal diagnostiqués, l'absence de modèle génétique robuste. La difficulté peut être aussi due à l'effet faible de la variation génétique, aux biais non connus, aux interactions entre les gènes et l'environnement.

Ainsi, les loci *PSORS1*, *PSORS2*, *PSORS3*, *PSORS4*, *PSORS6*, *PSORS9*, et les régions 2p23-11, 5q31-35, 13q13-21, 14q32, 15q11-12, 16q12-q24, 18p11 et 20p13-12 ont été détectés dans au moins deux autres études (Tableau 1.10).

Cependant, seul le locus sur le chromosome 6p21 apparaît bien établi dans la prédisposition au psoriasis (Tableau 1.10).

De plus, l'étude des loci de prédisposition montre l'existence d'un chevauchement entre les loci de différentes maladies, telles que les maladies inflammatoires, voir Figure 1.13. Par exemple, plusieurs gènes présents sur les chromosomes 1q21, 3q21, 17q25 et 20p et ayant des effets sur l'inflammation du derme et l'immunité sont communs entre le psoriasis, la dermatite atopique et l'asthme [Bowcock and Cookson, 2004].

PSORS1

Malgré le grand nombre de localisations décrites, le facteur génétique majeur prédisposant au psoriasis semble être le locus *PSORS1* présent dans la région

3. EXEMPLE D'UNE MALADIE A HEREDITE COMPLEXE : LE PSORIASIS 61

TAB. 1.10: Liste des loci de prédisposition au psoriasis et caractéristiques des populations utilisées pour les études

Chr. : Chromosome, Nbre : Nombre, M : Microsatellites, NPL : Liaison Non Paramétrique, HRR : Risque Relatif de l'Haplotype, S : SNPs, PsA : Arthrite Psoriasique, ind. : individus, att. : atteints, EDC : Complexe de Différenciation Epidermique

Chr.	Nom du Locus	Références	Population	Nbre de familles (F) ou de paires de germains atteints (ASP)	Nbre de marqueurs testés	Test
1p33-31	PSORS7	Veal et al. (2001)	Anglaise	158 F. nucléaires (284 ASP), 767 ind. (472 att.) (1)	271 M	D1S197-D1S200 : NPL=3.6 ($P=1.9*10^{-4}$)
		Liu et al. (2008)	Américaine (2a) et Anglaise (2b)	810 cas (185 PsA)/1256 témoins (2c) et 576 cas PsA/480 témoins (2d)	305 983 S 289 S	SNPs d' <i>IL23R</i> : $P_{max}=0.0001$ et $P_{max}=0.0008$
1q21	PSORS4	Capon et al. (1999)	Italienne	22 F., 224 ind. (108 att.)	198 M	D1S305 : $Z(\theta=0.05)=3.75$ ou NPL=4.07 ($P=0.0001$)
		Capon et al. (2001)	Italienne et Sardaigne	79 F., 237 ind. (136 att.) et 28 cas/56 témoins	7 M	D1S2346 : $P_{TDT}=0.004$ et $P=0.02$
		Liu et al. (2008)	(2a)	(2c)	305 983 S 289 S	SNP de EDC : $P=0.00005$
2p23-11		Trembath et al. (1997)	Anglaise	69 F. (106 ASP) (3)	260 M	D2S134 : lod score=1.27 ($P=0.0077$)
		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D2S165 : NPL=2.09 quand utilisation de F. donnant NPL > 0.8 sur le chr. 6
		Zhang et al. (2002)	Chinoise	61 F. multiplexes, 355 ind. (189 att.) (4)	304 M	D2S337 : NPL=2.13 ($P=0.02$)
		Sun et al. (2008)	Chinoise	180 F.	NA	D2S337 : NPL=4.11 ($P=3*10^{-5}$)
		Liu et al. (2008)	(2a)	(2c)	305 983 S 289 S	SNPs de la région <i>GNLY-ATOH8</i> et de <i>CTNNA2</i> : $P_{max}=0.00002$
3q21	PSORS5	Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	86 F. (134 ASP), 366 ind. (5)	390 M	D3S1551 : NPL=2.64 ($P=0.004$), selon les douleurs articulaires (44 F.)
		Enlund et al. (1999)	Suédoise (Sud)	188 F. nucléaires	8 M	D3S1269 : $P_{TDT}=0.004$
4q27-31	PSORS9	Zhang et al. (2002)	Chinoise	(4)	304 M	D4S2982 : NPL=2.68 ($P=0.005$)
		Sagoo et al. (2004)	5 populations : Américaine Germanique Anglaise Suédoise Chinoise (6a)	Méta-analyse de Nair et al. (1997) Trembath et al. (1997) Samuelsson et al. (1999) Veal et al. (2001) Zhang et al. (2002) Lee et al. (2000) (6b)	NA	132-165cM : $P=2.47*10^{-4}$
		Karason et al. (2005)	Islandaise	238 F. (874 att.) (7)	1 000 M	D4S106 : lod score=3.6, selon l'âge d'apparition
		Yan et al. (2007)	Chinoise	151 F., 759 ind. (404 att.)	13 M	D4S3033 : NPL=3.95 ($P=4*10^{-5}$)
		Liu et al. (2008)	(2a) et (2b)	(2c) et (2d)	305 983 S 289 S	SNPs : $P_{max}=0.001$
		Matthews et al. (1996)	Irlandaise et Anglaise	6 F., 74 ind. (37 att.)	NA	D4S1535 : $Z(\theta=0.08)=3.03$ ou $P=0.003$
4q32-35	PSORS3	Nair et al. (1997)	Américaine et Germanique (8a)	115 F. (182 ASP), 726 ind. (414 att.) (8b)	287 M	D4S413 : NPL=1.79 ($P=0.04$)
		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D4S2431 : NPL=1.74 ($P=0.04$)
		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D5S816 : NPL=2.45 ($P=0.008$), selon les douleurs articulaires (44 F.)
5q31-35		Friberg et al. (2006)	Suédoise	114 F. (168 ASP), 481 ind.	34 M	D5S436 : NPL=3.1 ($P=0.001$), selon les douleurs articulaires (55 F.)
		Cargill et al. (2007), Chang et al. (2008)	Américaine	1446 cas et 1432 témoins	25215 S	SNPs d' <i>IL13</i> et d' <i>IL23</i> : $P_{max}=7.85*10^{-10}$
		Liu et al. (2008)	(2a) et (2b)	(2c) et (2d)	305 983 S 289 S	SNPs : $P_{max}=0.00005$

Suite du tableau à la page suivante =>

Chr.	Nom du Locus	Références	Population	Nbre de familles (F) ou de paires de germains atteints (ASP)	Nbre de marqueurs testés	Test
6p22-21	PSORS1	Nair et al. (1997)	(8a)	(8b)	287 M	D6S291 : NPL=2.06 (P=0.02)
		Trembath et al. (1997)	Anglaise	(3)	260 M	TNF α : lod score=6.5 (P=5.8*10 ⁻⁷)
		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D6S1019 : NPL=2.07 (P=0.02)
		Enlund et al. (1999)	Suédoise	(104 F. (153ASP) (9)	8 M	D6S276 : NPL=3.07 (P=0.0012)
		Lee et al. (2000)	Allemande	32 F., 357 ind. (162 att.) (10)	370 M	D6S422 : NPL=3.07 (P=0.001)
		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D6S291 : P _{max} =3.4*10 ⁻⁸
		Zhang et al. (2002)	Chinoise	(4)	304 M	D6S1610 : NPL=3.86 (P=0.0002)
		Allen et al. (2003)	Caucasienne	710 F. (942 ASP) (11)	53 M	D6S273 : MLS=12.6 (P=2*10 ⁻¹⁴)
		Sagoo et al. (2004)	(6a)	Méta-analyse (6b)	NA	33-66 cM : P=3.06*10 ⁻⁸
		Karason et al. (2005)	Islandaise	(7)	1 000 M	TNF α : lod score=10.9
		Wolf et al. (2008)	Anglaise	1256 cas/2938 témoins (12)	15 S	SNP : P=0.0002
		Liu et al. (2008)	(2a) et (2b)	(2c) et (2d)	305 983 S/289 S	SNPs du MHC : P _{max} =1.8*10 ⁻³⁹ et P _{max} =6.86*10 ⁻¹¹
7		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D7S519-D7S669 : NPL=2.1 (P=0.02)
8q21-24		Trembath et al. (1997)	Anglaise	(3)	260 M	D8S284 : lod score=2.6 (P=0.00027)
		Lee et al. (2000)	Allemande	(10)	370 M	D8S270 : NPL=2.02 (P=0.02)
9q33-34		Zhang et al. (2002)	Chinoise	(4)	304 M	D9S1682 : NPL=2.74 (P=0.0038)
		Sun et al. (2007)	Chinoise	160 F.	9 M	D9S290 : NPL=4.64 (P=2.3*10 ⁻⁷)
10q22-26		Nair et al. (1997)	(8a)	(8b)	287 M	D10S569 : NPL=2.07 (P=0.02)
		Allen et al. (2003)	Caucasienne	(11)	53 M	D10S2327 : MLS=1.1 (P=0.012)
		Sagoo et al. (2004)	(6a)	Méta-analyse (6b)	NA	165-end : P=0.054
		Karason et al. (2005)	Islandaise	(7)	1 000 M	D10S1700 : lod score=3.1, selon la clinique (Cuir chevelu)
13q13-31		Zhang et al. (2002)	Chinoise	(4)	304 M	D13S159 : NPL=2.44 (P=0.0083)
		Sagoo et al. (2004)	(6a)	Méta-analyse (6b)	NA	66-99 cM : P=0.038
		Liu et al. (2008)	(2a)	(2c)	305 983 S/289 S	SNPs de <i>COG6</i> : P _{max} =2*10 ⁻⁶
14q32		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D14S267 : NPL=2 quand utilisation de F. donnant NPL>0.8 sur le chr. 6
		Karason et al. (2005)	Islandaise	(7)	1 000 M	D14S1050 : lod score=3.1, selon la clinique (phénomène Knoebner)
		Liu et al. (2008)	(2a)	(2c)	305 983 S/289 S	SNP de <i>CLMN</i> : P=0.003

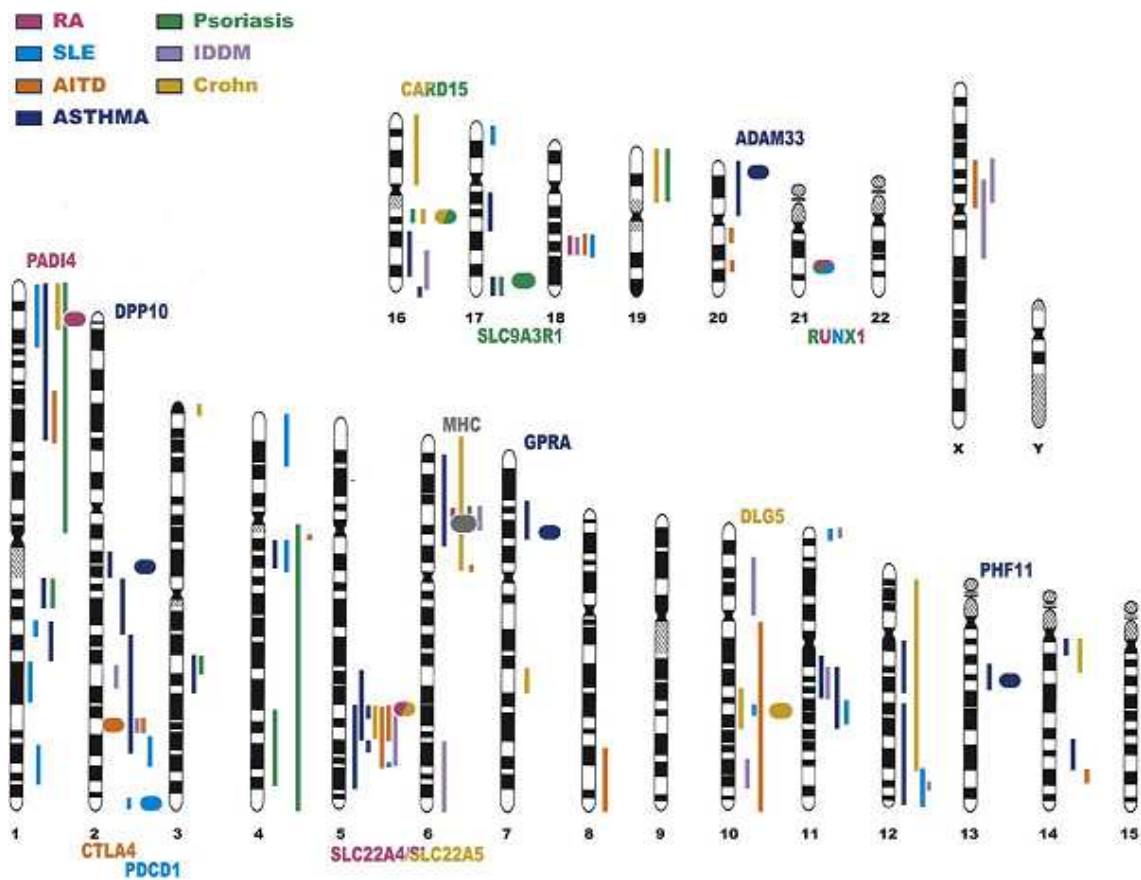
Suite du tableau à la page suivante ⇒

3. EXEMPLE D'UNE MALADIE A HEREDITE COMPLEXE : LE PSORIASIS 63

15q11-22		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D15S817 : NPL=2.96 (P=0.0017), selon les douleurs articulaires (44 F.)
		Asumalahti et al. (2003)	Finlandaise	31 F., 227 ind. (121 att.) (13)	377 M	D15S1007-D15S117 : NPL=1.93 (P=0.034)
		Liu et al. (2008)	(2a)	(2c)	305 983 S/289 S	SNPs de la région <i>USP8-TNFAIO8L3</i> : $P_{max}=2.9*10^{-5}$
16q12-24	PSORS8	Nair et al. (1997)	(8a)	(8b)	287 M	D16S2110 : NPL=2.92 (P=0.0025)
		Trembath et al. (1997)	Anglaise	(3)	260 M	D16S422 : P<0.005, étude sur 41 F.
		Karason et al. (2003)	Islandaise	39 F. PsA (100 att.)	1 000 M	D16S267 : lod score=4.19, selon l'empreinte parentale
		Allen et al. (2003)	Caucasienne	(12)	53 M	D16S3032 : MLS=1.3 (P=0.007)
		Sagoo et al. (2004)	(6a)	Méta-analyse (6b)	NA	99-end : P=0.049
		Karason et al. (2005)	Islandaise	(7)	1 000 M	84cM : lod score=5.7, selon la clinique (PsA) et selon l'empreinte parentale
17q25	PSORS2	Tomfohrde et al. (1994)	Américaines	151 ind. (65 att.)	NA	D17S784 : Z($\theta=0.04$)=5.33 pour une famille
		Nair et al. (1997)	(8a)	(8b)	287 M	D17S802 : NPL=2.63 (P=0.0056)
		Enlund et al. (1999)	Suédoise	(9)	4 M	D17S784 : NPL=1.83 (P=0.027)
		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D17S784 : NPL=2.41 (P=0.009), selon les douleurs articulaires (44 F.)
		Speckman et al. (2003)	Caucasienne	242 F. nucléaires, 1005 ind. (572 att.)	15 M	D17S1602 : $P_{HRR}=0.0001$
		Zheng et al. (2003)	Chinoise	38 F., 188 ind. (96 att.)	19 M	D17S785 : NPL=1.62 (P=0.04)
		Hwu et al. (2005)	Taïwanaise	5 F., 93 ind. (26 att.)	382 M	D17S928 : Z($\theta=0.01$)=7.16
		Birnbaum et al. (2006)	Marocaine	1 F., 54 ind. (19 att.)	400 M+ NA S	SNP : Z($\theta=0$)=8.79
18p11		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D18S843 : NPL=1.67 (P=0.048)
		Asumalahti et al. (2003)	Finlandaise	(13)	377 M	D18S63-D18S967 : NPL=3.58 (P=0.0038)
		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D18S59-D18S1150 : NPL=1.97 (P=0.025)
19p13	PSORS6	Lee et al. (2000)	Allemande	(10)	370 M	D19S916 : NPL=3.62 (P=0.0002)
		Veal et al. (2001)	Anglaise	(1)	271 M	D19S901-D19S221 : NPL=2.4 (P=0.008)
		Hensen et al. (2003)	Allemande	210 F.	45 M	D19S922 : P=0.008
20p13-12		Nair et al. (1997)	(8a)	(8b)	287 M	D20S917 : NPL=1.65 (P=0.04)
		Trembath et al. (1997)	Anglaise	(3)	260 M	D20S186 : lod score=2.01 (P=0.0012)
		Samuelsson et al. (1999)	Suédoise	(5)	390 M	D20S604 : NPL=1.95 (P=0.027), selon les douleurs articulaires (44 F.)
21q11-22		Lee et al. (2000)	Allemande	(10)	370 M	D21S1256 : NPL=2.02 (P=0.0066)
		Wolf et al. (2008)	Anglaise	(12)	15 S	SNP : P=0.0003

FIG. 1.13: Représentation schématique des chevauchements de loci de prédisposition avec les gènes correspondants mis en cause dans plusieurs maladies inflammatoires

RA : la polyarthrite rhumatoïde, AITD : la thyroïdite auto-immune, IDDM : le diabète de Type I, SLE : le lupus érythémateux systémique, IBD : les maladies inflammatoires intestinales (maladie de Crohn) (D'après [Yamada and Ymamoto, 2005])



de classe I du système HLA (1.8Mb) sur le chromosome 6p21.3, Fig 1.14. En effet, lors de diverses études de liaison paramétriques et non paramétriques, ce locus d'environ 300kb a été identifié et confirmé par l'existence d'une forte liaison entre le psoriasis et plusieurs marqueurs présents dans la région dans différentes populations de diverses ethnies (américaine, européenne (allemande, suédoise, anglaise, islandaise), chinoise) (Tableau 1.10). Ce locus serait responsable d'un tiers à un demi de la part génétique du psoriasis [Trembath et al., 1997, Allen et al., 2003]. Des analyses d'associations sur cette région soutiennent également l'importance du locus *PSORS1* dans la susceptibilité au psoriasis.

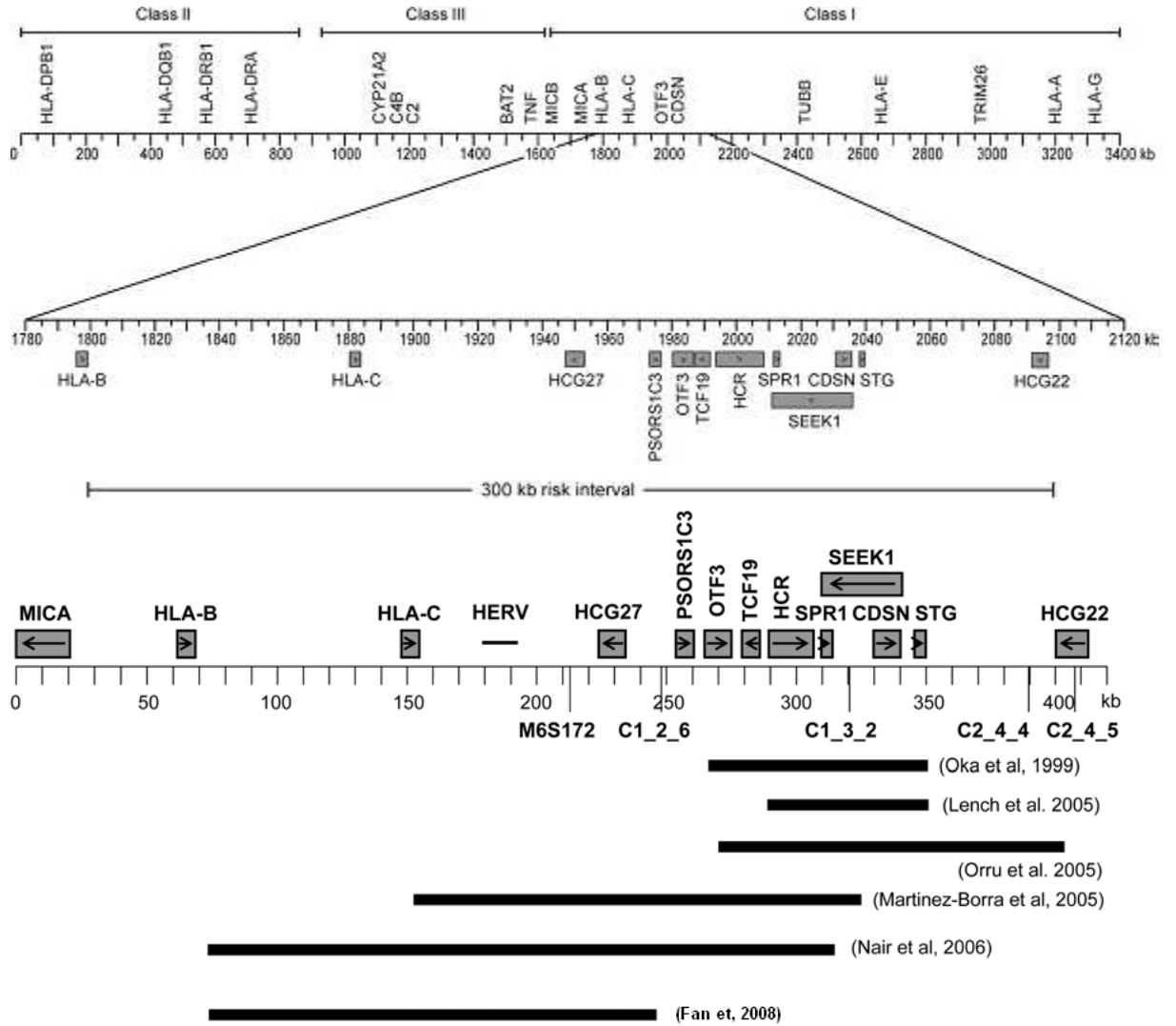
A l'aide de nombreux marqueurs espacés au niveau de la région HLA, plusieurs études d'association ont tenté de rétrécir ce large locus afin d'identifier le gène causatif [Balendran et al., 1999, Oka et al., 1999, Nair et al., 2000, Veal et al., 2002, Helms et al., 2005, Lench et al., 2005, Martinez-Borra et al., 2005, Orru et al., 2005, Nair et al., 2006, Fan et al., 2008](Figure 1.14).

Basé sur ces études, le gène de prédisposition au psoriasis du locus *PSORS1* a été localisé dans une région d'environ 200kb du coté télomérique du HLA-C. Cette région contient une dizaine de gènes dont certains sont des candidats potentiels : *HLA-C*, *TCF19* (SCI), *OTF3* (POU5F1), *HCR* (Pg8), *CDSN*, *SEEK1*, *SPR1*, and *STG* (Figure 1.14). Deux d'entre eux, *HCR* (*helix coiled coil rod homolog*) et *CDSN* (*corneodesmosin*), furent activement étudiés pour leur rôle éventuel dans la pathogenèse de la maladie.

Le gène *HCR* a tout d'abord été prédit lors d'une étude sur la séquence génomique de la région HLA. Nommé tout d'abord *Pg8* (*putative gene 8*) puis, plus récemment *HCR*, ce gène hautement polymorphe code pour une protéine alpha hélicoïdale de fonction inconnue [Guillaudeux et al., 1998, Oka et al., 1999, Asumalahti et al., 2000, Asumalahti et al., 2002]. Ce gène est situé dans l'une des régions candidates de *PSORS1* identifiée lors de diverses études globales de la région dans les populations japonaises, américaines ou européennes [Oka et al., 1999, Nair et al., 2000, Martinez-Borra et al., 2005, Orru et al., 2005]. Une première étude d'association (cas-témoins) sur le gène lui-même, comparant 93 témoins avec 100 patients finlandais atteints de psoriasis démontre une association de ce gène avec le psoriasis [Asumalahti et al., 2000]. Deux SNPs, présents dans l'exon 4 du gène *HCR* (307 C>T et 325 C>T (Arginine en Tryptophane)) sont conjointement associés de manière significative au psoriasis (42% pour les individus atteints *versus* 20% pour les témoins, P= 0.00068) [Asumalahti et al., 2000]. Ces deux marqueurs, prédits pour changer la structure secondaire de la protéine, semblent être, en plus, en fort déséquilibre de liaison chez les patients et chez les témoins avec l'allèle *HLA-Cw6*, qui est aussi fortement associé avec la maladie (P=0.0000031) [Asumalahti et al., 2000, Asumalahti et al., 2002].

FIG. 1.14: Cartographie de la région *PSORS1* montrant la position des gènes connus ainsi que les régions candidates minimales pour contenir le gène causal identifiés lors des différentes études

La flèche montre le sens de la transcription. (D'après [Fan et al., 2008])



Une autre étude cas-témoins, réalisée sur 419 familles venant de 6 populations (Grande Bretagne, Finlande, Suède, Espagne, Italie, Inde), confirme l'association du gène *HCR* avec le psoriasis, particulièrement avec un haplotype constitué de 4 SNPs codants non-synonymes (307T, 325T, 1723T et 2327G), *HCR*WWCC* ($P=1 \times 10^{-10}$). Les trois premiers variants semblent intervenir dans la structure secondaire de la protéine [Asumalahti et al., 2002]. Un ou l'ensemble de ces variants est montré(s) également associé(s) avec la maladie, et particulièrement avec le psoriasis de type I, dans d'autres populations (chinoise ou israélienne) [Chang et al., 2004, Martinez-Borra et al., 2005, Chang et al., 2006]. De nombreuses études sur différentes populations (américaine, européenne, et chinoise), réaffirment, en plus, l'existence d'un fort déséquilibre de liaison entre le gène *HCR* et l'allèle *HLA-Cw6* [Chia et al., 2001, O'Brien et al., 2001, Asumalahti et al., 2002, Chang et al., 2004, Helms et al., 2005, Chang et al., 2006, Suomela et al., 2007]. Une étude épidémiologique sur 379 patients finlandais montre que les allèles à risque *HCR*WWCC* (62%) et *HLA-Cw6* (54%) sont associés aux mêmes caractéristiques cliniques. Par exemple, les patients porteurs de l'haplotype à risque *HCR* ont un âge de début plus précoce, ont généralement une infection de la gorge comme facteur déclenchant, des lésions de type psoriasis en gouttes et une histoire familiale de psoriasis plus importante que les patients non porteurs de cet haplotype. De plus, les patients non porteurs de cet haplotype ont des psoriasis plus graves de type pustulaire ou érythrodermique [Suomela et al., 2007].

Des études supplémentaires sur l'expression génique de *HCR* indiquent une expression forte du gène seulement dans les kératinocytes basales (au niveau nucléaire et cytoplasmique) des lésions psoriasiques [Asumalahti et al., 2000]. Ils montrent aussi un profil d'expression différent selon le type de peau. Pour les peaux saines, une expression uniforme dans les kératinocytes basales est observée contrairement aux peaux lésées, où l'expression est plus faible dans les kératinocytes basales prolifératifs. Ceci suggère un rôle de *HCR* dans la régulation de la différenciation ou de la prolifération des cellules épidermiques [Asumalahti et al., 2002]. Pour étudier la fonction du gène *HCR*, des souris transgéniques sur-exprimant l'haplotype sauvage ou l'haplotype à risque *HCR*WWCC* dans les kératinocytes basales ont été générés. Bien qu'aucun phénotype particulier n'ait été observé chez ces souris transgéniques, des différences dans le profil d'expression génique, ressemblant à celles observées chez les patients, ont été révélées. Par exemple, chez les souris sur-exprimant l'haplotype à risque *HCR*, des gènes intervenant dans la prolifération ou la différenciation terminale des kératinocytes (comme les cytokératines 6, 16 et 17) et aussi dans la formation de l'enveloppe cellulaire cornifiée (tels que les SPRRs (*small proline-rich proteins*) et la transglutaminase TGM3) sont sur-exprimés [Elomaa et al., 2004].

L'ensemble de ces données tend à considérer ce gène comme un gène candidat du *PSORS1*, parfois indépendamment du gène *HLA-C* [Oka et al., 1999, Nair et al.,

2000, Martinez-Borra et al., 2005, Orru et al., 2005] et du gène *CDSN* [Martinez-Borra et al., 2005]. Néanmoins, même en présence d'une forte association de la maladie avec le gène *HCR*, plusieurs études sur diverses populations (Europe, USA, Chine) semblent en désaccord avec le rôle possible de ce gène seul dans la maladie en raison du fort déséquilibre de liaison entre les gènes *HLA-C* et *HCR* dans ces populations, rendant difficile de différencier les activités réciproques de chacun des gènes [Asumalahti et al., 2000, Chia et al., 2001, O'Brien et al., 2001, Asumalahti et al., 2002, Veal et al., 2002, Helms et al., 2005, Nair et al., 2006, Fan et al., 2008].

Le deuxième gène le plus étudié au locus 6p21 (*PSORS1*) est la cornéodesmosine (*CDSN*, *S gene*). La cornéodesmosine est une protéine essentielle impliquée dans les structures intracellulaires de la couche cornée, les cornéodesmosomes. Cette protéine est synthétisée lors des dernières étapes de la différenciation des kératinocytes et semble avoir un rôle dans la cohésion entre les cellules épidermiques de la couche cornée ainsi que dans le processus de desquamation *via* les cornéodesmosomes. La protéolyse de certains composants cornéodesmosomiaux comme la cornéodesmosine permettrait le détachement des cornéocytes superficiels [Zhou and Chaplin, 1993, Simon et al., 1997, Guerrin et al., 1998]. De nombreuses études montrent une association significative entre le gène *CDSN* polymorphe et le psoriasis dans la population caucasienne. Lors d'une étude TDT réalisée sur 152 trios anglais, trois SNPs non-synonymes (*CDSN-619T*, *-1240G*, *-1243C* dans l'exon 2, nommé *CDSN*5*) sont associés avec le psoriasis ($P=3 \times 10^{-6}$), apparemment indépendamment de l'allèle *HLA-Cw6* [Allen et al., 1999]. D'autres études confirment l'association du gène *CDSN* avec le psoriasis dans la population européenne lors d'études TDT (*CDSN*5*_*CDSN-1236T* : 153 trios, $P=8.5 \times 10^{-8}$ et *CDSN-619T-1236T-1243C*, nommé *CDSN*TTC* : 52 familles, $P=0.003$) ou lors d'études castémoin (*CDSN*TTC* : 161 *vs* 184, $P=8.3 \times 10^{-9}$, *CDSN-1243C* : 235 *vs* 374) respectivement [Tazi Ahnini et al., 1999, Schmitt-Egenolf et al., 2001, Ameen et al., 2005, Orru et al., 2005]. Dans le dernier cas, l'allèle *CDSN-1243*C* est significativement associé avec la maladie, en particulier avec le psoriasis de type I, 65% des 235 patients sont porteurs de l'allèle C alors que seulement 47% des 374 témoins le sont ($P=2 \times 10^{-9}$). Un fort déséquilibre de liaison entre le gène *CDSN* et un autre allèle associé, le *HLA-Cw6*, est aussi observé (36% *versus* 10%, $P=8 \times 10^{-45}$) [Tazi Ahnini et al., 1999]. Un constat similaire est obtenu avec des haplotypes longs contenant *CDSN*5* dans d'autres études caucasiennes/européennes [Jenisch et al., 1999, Capon et al., 2003, Orru et al., 2005]. L'association de ce gène avec le psoriasis, particulièrement avec le psoriasis de type I, est aussi retrouvée dans la population chinoise [Chang et al., 2006]. Une étude sur 103 patients caucasiens atteints de psoriasis en gouttes suggère que ce gène intervient aussi dans la pathogenèse dans d'autres formes cliniques de psoriasis, et de manière indépendante de l'allèle *HLA-Cw6* [Tazi-Ahnini et al., 1999].

Sur le plan fonctionnel, une étude montre qu'un allèle de *CDSN* (971T), présent sur les haplotypes longs associés au psoriasis, entraîne une augmentation de la stabilité de l'ARNm [Capon et al., 2004a]. Puis, l'expression de *CDSN* semble être altérée de manière générale dans les lésions psoriasiques. Son expression est en effet élevée au niveau des couches épineuse et cornée au lieu d'être limitée à l'interface entre les couches granuleuse et cornée comme dans le cas d'une peau saine ou non lésée [Allen et al., 2001].

Néanmoins, d'autres études (Japon, Chine, Thaïlande, Europe) semblent en désaccord avec le rôle possible de ce gène dans la maladie, même avec l'existence d'un très fort DL avec HLA-*Cw6* [Ishihara et al., 1996, Asumalahti et al., 2000, Enerback et al., 2000, Chang et al., 2003, Romphruk et al., 2003, Ameen et al., 2005, Helms et al., 2005, Martinez-Borra et al., 2005].

La localisation exacte du gène de *PSORS1* reste controversée due à l'existence d'un fort déséquilibre de liaison dans la sous-région de classe I du système HLA, caractérisée par un taux de recombinaison de 2.3 fois inférieur au taux moyen sur le génome [Walsh et al., 2003]. Cela expliquerait les nombreuses associations observées entre le psoriasis et plusieurs gènes de la région, souvent de magnitude comparable à celle observée pour le gène initialement décrit HLA-C, puisqu'ils sont, comme précédemment exposé, eux-mêmes en déséquilibre de liaison entre eux.

Le gène HLA-C, et particulièrement l'antigène de classe I HLA-*Cw6*, reste néanmoins le meilleur candidat comme gène de prédisposition du *PSORS1*.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études sur différentes populations ont montré une forte association avec l'allèle HLA-*Cw6* et le psoriasis [Tiilikainen et al., 1980, Elder et al., 1994, Mallon et al., 1999]. Environ 45% des personnes de type caucasien atteintes de psoriasis portent l'allèle HLA-*Cw6* alors que cet allèle n'a qu'une fréquence de 10% dans la population générale [Trembath et al., 1997]. Cette association est particulièrement importante chez les patients avec un psoriasis à début précoce et un psoriasis en gouttes [Tiilikainen et al., 1980, Henseler and Christophers, 1985, Enerback et al., 1997, Mallon et al., 1997, Mallon et al., 1999, Gudjonsson et al., 2002, Szczerkowska-Dobosz et al., 2004]. Dans l'une des études, 85% des patients avec un psoriasis à début précoce (avant l'âge de 40 ans) ont au moins un allèle HLA-*Cw6*, comparé au 15% des patients atteints après 40 ans [Henseler and Christophers, 1985].

Les caractéristiques cliniques ou le risque de développer la maladie varient selon le type HLA du patient. Les patients porteurs du HLA-*Cw602* ont des symptômes plus étendus et parfois plus sévères [Gudjonsson et al., 2002, Szczerkowska-Dobosz et al., 2004]. Ils sont également plus sensibles au phénomène de Koebner et ont une réponse plus favorable à la lumière du soleil [Gudjonsson et al., 2002]. Les

patients portant HLA-*Cw6* ont un risque augmenté de 10 à 20 fois de développer un psoriasis et les patients homozygotes pour cet allèle ont 2,5 fois plus de risque que les patients hétérozygotes [Gudjonsson et al., 2003]. En revanche, les défauts de l'ongle et l'arthrite psoriasique sont plus fréquents chez les patients non porteurs de l'allèle HLA-*Cw6* [Gudjonsson et al., 2002].

Diverses études indiquent que *PSORS1* est proche du gène *HLA-C* et distinct de la région contenant *CDSN* et *HCR* [Veal et al., 2002, Helms et al., 2005]. En effet, deux SNPs (nommés SNP7 et SNP9) présents à environ 5,7 et 10 kb en amont du codon d'initiation du gène *HLA-C* sont trouvés fortement associés avec le psoriasis, en comparaison avec d'autres SNPs de la région [Veal et al., 2002]. Des haplotypes contenant en majorité l'allèle HLA-*Cw6* sont également préférentiellement transmis aux individus atteints dans une étude européenne. Commun à ces haplotypes, un autre variant semble de fonction intéressante puisqu'il entraîne la création d'un site de fixation pour le facteur de transcription RUNX et qu'il est en complet DL avec les deux polymorphismes en amont du gène *HLA-C* [Helms et al., 2005].

D'autres études de la région *PSORS1* de 300kb, en combinant l'analyse d'haplotypes avec celle des séquences, ont récemment identifié HLA-*Cw6* comme étant l'allèle causal [Enerback et al., 2000, Chang et al., 2003, Elder, 2006, Nair et al., 2006, Fan et al., 2008]. Une étude récente compare les séquences (environ 300kb) de 7 chromosomes afin d'identifier un variant ou une combinaison de variants qui serait présent uniquement sur les deux chromosomes à risque (*HLA-B57-Cw6* et *HLA-B50-Cw6*). Seulement deux gènes dans cet intervalle, *HLA-C* et *CDSN*, ont des allèles spécifiques aux chromosomes à risque qui affectent les protéines correspondantes. Or, une étude d'association sur la totalité des familles caucasiennes confirme que les allèles HLA-*Cw6* et *CDSN*TTC* sont fortement associés avec le psoriasis. Une analyse dans les familles, de 76 haplotypes recombinants du chromosome à risque ancestral et porteurs soit de HLA-*Cw6* ou soit de *CDSN*TTC*, montre que seuls les haplotypes *HLA-Cw6*+/*CDSN*TTC*- sont significativement associés avec la maladie et que par déduction, la région candidate est réduite à un segment de 158 kb excluant tous les gènes exceptés *HLA-C* et *HCG27*.

Ceci est confirmé par une analyse des familles chinoises atteintes de psoriasis. En effet, HLA-*Cw6* est l'allèle du gène majeur produisant une molécule HLA de classe I, importante de par son implication dans la présentation de l'antigène aux cellules immunes (cellules T). Ainsi, l'antigène correspondant doit avoir un rôle important dans la maladie et sa connaissance pourrait être utilisée pour le développement d'un médicament.

Cependant, l'allèle HLA-*Cw6* ne serait pas le seul allèle à risque dans le locus *PSORS1* [Fan et al., 2008]. Cette hypothèse établie par de nombreuses études pourrait expliquer les différences observées lors de la cartographie fine de ce locus

par plusieurs équipes [Schmitt-Egenolf et al., 2001, Capon et al., 2004a, Martinez-Borra et al., 2005] (Figure 1.14). Puisque le psoriasis est une "maladie complexe", il est possible qu'il y ait plus qu'un gène de prédisposition au psoriasis dans le locus *PSORS1*. Ces différences entre les études peuvent donc être dues à l'existence d'une hétérogénéité génétique entre les populations avec différents haplotypes à risque ou différents allèles à risque. L'allèle majeur HLA-*Cw6* n'est présent que dans 40-80% des cas et sa prévalence dans la population générale n'est que de 10%, impliquant des facteurs ou des interactions de facteurs environnementaux et/ou génétiques supplémentaires et différentes selon les populations [Nair et al., 2000, Bowcock and Cookson, 2004]. Ainsi, il peut exister d'autres gènes capables de modifier le risque lié à HLA-*Cw6* dans la région HLA. Par exemple, différents haplotypes qui portent l'allèle HLA-*Cw6* avec différents allèles *HLA-B* (*B57-Cw6*, *B13-Cw6* and *B37-Cw6*) confèrent un risque différent au psoriasis [Jenisch et al., 1998].

Le fait que *PSORS1* ait une faible pénétrance (estimée à 15%) indique l'implication d'autres facteurs. Ces facteurs peuvent d'ailleurs conférer un risque de manière indépendante ou dépendante du locus *PSORS1*. Depuis quelques années, après la découverte d'une vingtaine de loci potentiels, les chercheurs tentent d'identifier les gènes, et les allèles correspondants prédisposant au psoriasis. Trois de ces régions sont d'ailleurs décrites par la suite et sont examinées en détail plus loin dans ce mémoire. Cependant, comme attendu pour une "maladie complexe", peu de gènes sont rapportés comme étant associés au psoriasis (Tableau 1.11).

PSORS2

Un balayage du génome sur 8 familles caucasiennes des Etats-Unis avec 65 individus atteints de psoriasis a permis d'identifier un premier locus non-HLA conférant une prédisposition au psoriasis, *PSORS2* sur le chromosome 17q25 [Tomfohrde et al., 1994]. Dans une famille où la preuve de liaison est la plus forte, le lod score bi-point au marqueur D17S784 est de 5.33 avec une forte pénétrance de 99%. Plusieurs études ont confirmé la liaison au chromosome 17q de manière indépendante dans différentes populations (Tableau 1.10). Par exemple, une étude de liaison non paramétrique, suivie d'une étude d'association de la région liée sur le chromosome 17q25 sur 242 familles nucléaires européennes, a permis de confirmer ce locus mais aussi d'identifier deux zones, distinctes de 6Mb, associées au psoriasis. Ces deux zones fortement associées sont situées au niveau des gènes *SLC9A3R1/NAT9* et du gène *RAPTOR* [Helms et al., 2003, Speckman et al., 2003]. De plus, un variant situé entre les gènes *SLC9A3R1* et *NAT9* semble être candidat comme facteur causal car en plus d'être associé à la maladie, il entraîne la perte de la liaison d'un facteur de transcription *RUNX1* suggérant comme conséquence une dérégulation de l'expression des deux gènes voisins [Helms et al., 2003].

TAB. 1.11: Gènes et variants associés avec le psoriasis retrouvés dans au moins une étude (D'après [Liu et al., 2007])

<i>Gene</i>	<i>Gene title</i>	<i>Chromosome band</i>	<i>Polymorphism(s) location</i>
<i>IL-10</i>	Interleukin 10	1q31–q32	Promoter (microsatellite)
<i>IL-12B/p40 subunit</i>	Interleukin 12B	5q31.1–q33.1	Upstream gene, 3'-UTR (SNP)
<i>IL-19/IL-20/IL-24</i>	Interleukin 19/interleukin 20/ interleukin 24	1q32	Haplotype
<i>IL-23R</i>	Interleukin 23 receptor precursor	1p31.3	Missense alteration
<i>IRF2</i>	Interferon regulatory factor 2	4q35.1	Non-coding SNP
<i>MGST2</i>	Microsomal glutathione S-transferase 2	4q28.3	Gene disruption/non-coding SNP
<i>PTPN22</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	1p13.3–p13.1	Two associated haplotypes in German psoriatics
<i>RAPTOR</i>	Regulatory associated protein of mTOR	17q25	Non-coding SNPs
<i>SLC12A8</i>	Solute carrier family 12 member A8	3q21	Non-coding haplotype in Swedish families
<i>SLC9A3R1/NAT9</i>	Solute carrier family 9 (sodium/ hydrogen exchanger), member 3 regulator 1	17q25.1	Non-coding SNPs/haplotype
<i>SUMO4</i>	Small ubiquitin-like modifier 4 protein	6q25.1	M55V
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	6p21.3	Promotor SNPs

Une étude sur une grande famille taïwanaise identifie le même locus dans la région distale du chromosome 17q avec un lod score bi-point maximum de 7.16 pour D17S928, présent à environ 2,4Mb du côté distal de D17S784 [Hwu et al., 2005]. Une cartographie fine faite lors cette étude indique une association forte entre le psoriasis et rs3744165 ($P=0.0008$) localisé à 0,38 Mb du côté distal du marqueur D17S928. Ce variant est situé dans la région 5'UTR du gène *ZNF750* (*zinc finger protein 750*) [Hwu et al., 2005]. Une autre étude sur une famille israélo-marocaine atteinte de dermatite séborrhéique accompagnée de lésions psoriasiques confirme la liaison avec ce chromosome au niveau de la même région, particulièrement au niveau du variant rs3744165 (lod score multipoint de 8.79), et repère une co-ségrégation de la maladie avec une mutation "décalage de lecture" (56_57dupCC) dans *ZNF750* [Birnbaum et al., 2006].

ZNF750 est un facteur de transcription putatif contenant un domaine en doigt de zinc de type C2H2 et un site de localisation nucléaire. *ZNF750* n'est pas exprimé dans les fibroblastes mais dans les kératinocytes. La protéine est aussi faiblement exprimée dans les cellules T (CD4). Cependant, aucune expression de cette protéine n'est observée dans les leucocytes du sang périphérique [Birnbaum et al., 2006]. Récemment, une équipe taïwanaise a identifié, après séquençage de 78 gènes, 4 variants qui co-ségrègent avec le psoriasis dans une grande famille : Ala201Val dans le gène *CD7*, -625A>C dans *ZNF750*, Asp189Asn dans *C17orf56* et Ala568Thr dans *AATK*. Seule la mutation présente dans le promoteur de *ZNF750* semble intéressante car elle entraîne un changement dans l'activité du promoteur [Yang et al., 2008]. L'implication de ce gène dans la pathogenèse du psoriasis et sa fonction restent encore à être déterminées.

Mais toutes les études ne détectent pas ce locus. Par exemple, aucune preuve de liaison n'a été montrée pour le marqueur D17S784 lors d'une étude de 41 familles anglaises et de 24 familles américaines [Nair et al., 1995, Trembath et al., 1997].

PSORS4

Cette région candidate a été identifiée pour la première fois lors de l'analyse de 22 familles multiplexes italiennes. Une forte liaison entre le chromosome 1q21 et le psoriasis a été observée, particulièrement avec le marqueur D1S305 avec un NPL score de 4.07 ($P=0.0001$) et un lod score bi-points de 3.75 à $\theta=0.05$ [Capon et al., 1999a]. La présence d'une interaction entre *PSORS1* et *PSORS4* est aussi proposée [Capon et al., 1999b].

Cette région a été retrouvée lors d'une analyse de liaison indépendante réalisée sur 23 grandes familles américaines (D1S1679, $P=0.005$) [Bhalerao and Bowcock, 1998]. De plus, une analyse du déséquilibre de liaison de la région d'intérêt (1.6Mb (D1S1664-D1S305)) dans 79 trios italiens indépendants a permis, avec la présence d'une association significative pour D1S2346 ($P=0.004$), de confirmer ce locus comme région candidate mais aussi de rétrécir la région d'intérêt entre deux marqueurs (D1S2346, 140J1D (présents entre D1S2346-D1S2715)). L'étude

cas-témoins de 28 patients et 56 témoins, originaires d'une population isolée de Sardaigne, semble confirmer l'association entre cette région et la maladie, principalement au niveau des marqueurs D1S2346 et D1S2715 ($P=0.02$) [Capon et al., 2001]. Ce locus de prédisposition au psoriasis coïncide avec la région du complexe de différenciation épidermique étendue sur 2Mb, où de nombreux gènes codent des protéines impliquées dans la maturation des cellules épidermiques comme les protéines de la famille S100 ou SPRR ainsi que l'involucrine et la filagrine. Certaines de ces protéines telles que S100A7, S100A9 ou SPRR3 sont montrées sur-exprimées dans la peau atteinte de psoriasis [Zhou et al., 2003]. De plus, cette région est aussi une région d'intérêt pour une autre maladie de la peau d'origine auto-immune, la dermatite atopique. Récemment, une association avec cette maladie et des mutations à type de 'pertes de fonctions' de la filagrine, responsable de l'ichtyose vulgaire, a été observée [Palmer et al., 2006]. L'intérêt de cette protéine dans la pathogenèse du psoriasis sera discuté ultérieurement dans le chapitre 3.

PSORS5

Lors d'une étude préliminaire de 20 familles suédoises, une liaison suggestive a été observée au niveau du chromosome 3q21. Une investigation de cette région sur un plus grand nombre de familles suédoises (104 familles avec 153 paires de germains) a montré une liaison suggestive avec un NPL de 1.77 pour le marqueur D3S1589 ($P=0.04$). De plus, une stratification de ces familles selon leur origine conduit, lors de l'étude des familles venant du sud-ouest de la Suède, à l'obtention d'un NPL de 2.77 ($P=0.003$) pour le marqueur D3S1587 et d'une valeur de p de 0.005 pour le marqueur D3S1269 lors d'un test TDT [Enlund et al., 1999b]. Après stratification de 86 familles suédoises selon leurs atteintes articulaires, une liaison avec le chromosome 3 a été observée au niveau des marqueurs D3S1768 et D3S2409 (3p21, NPL=2.89, $P=0.002$) dans le sous-groupe de 42 familles sans problème au niveau des jointures. Une liaison est également observée au niveau du marqueur D3S1551 (3q21, NPL=2.64, $P=0.004$) dans le sous-groupe de 44 familles présentant des maux aux jointures [Samuelsson et al., 1999]. Une autre étude réalisée sur 195 familles suédoises a permis, par une analyse d'association TDT, de rétrécir la région à un intervalle de 250 kb et d'identifier *SLC12A8* (*solute carrier family 12, member 8*) comme un nouveau gène de prédisposition au psoriasis par la présence d'associations entre la maladie et 5 variants introniques ($P<0.05$) [Hewett et al., 2002]. Ce gène code pour une protéine homologue (30-40%) à la famille des co-transporteurs de cation/chlorure (Na/K/Cl) [Hewett et al., 2002]. L'association entre ce gène, en particulier les 6 SNPs introniques, et le psoriasis a été confirmée et a été montrée être indépendante du locus *PSORS1* lors d'une analyse cas-témoins de 375 malades allemands [Huffmeier et al., 2005a]. Le détail de ces deux études d'association est décrit ultérieurement dans le chapitre 3. De manière générale, les études d'association et de liaison ne sont pas toujours répliquées dans toutes les cohortes. Ceci pourrait être dû à un effet faible du

gène en question, des biais occasionnés par l'étude elle-même, la complexité de la maladie ou l'existence d'interaction entre facteurs, etc.. Ceci rend l'identification des facteurs à risque très difficile.

3.6.4 Modèles animaux

La disponibilité de modèles animaux de maladies humaines, obtenus naturellement ou par ingénierie génétique en sur-exprimant dans des souris transgéniques, une protéine ou au contraire en détruisant le gène avec déficience de la protéine correspondante permet de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués et le rôle éventuel de la protéine impliquée dans la physiopathologie de la maladie. La reproduction des symptômes de la maladie dans ces modèles permet aussi de tester les traitements susceptibles de soigner la maladie chez l'homme. Aucun modèle animal naturel n'existe pour le psoriasis. Il existe néanmoins des mutations spontanées à l'état homozygote (*Ttc7^{fsn}*, *cpdm*, *Scd1^{ab}*) chez quelques souris qui entraînent des lésions dites psoriasiformes comme l'hyperprolifération épidermique, l'infiltration par des macrophages et des changements vasculaires. Cependant, ces souris ne montrent pas toutes les caractéristiques pathologiques du psoriasis comme la présence d'infiltration de lymphocytes T ainsi qu'une réponse aux traitements anti-psoriasis comme la cyclosporine et le calcipotriol [Gudjonsson et al., 2007].

Plusieurs modèles murins pour le psoriasis ont été développés, malgré des différences entre la peau et l'immunité humaine et murine (dont l'épaisseur et le nombre des couches de la peau). La plupart de ces modèles sur-exprime ou n'exprime plus des gènes dont l'expression semble être altérée dans le psoriasis tels que les cytokines (IL-20, IL-6, IL-1 α , IL-1ra) ou des facteurs de croissance (TGF- β 1, VEGF). Ces changements d'expression sont ciblés au niveau de la couche basale de l'épiderme grâce à l'utilisation de promoteurs des gènes de kératine KRT5 ou KRT14 ou au niveau de la couche suprabasale grâce aux promoteurs des gènes KRT1, KRT10 ou de l'involucrine. L'ensemble des caractéristiques des modèles murins et leurs similarités avec le psoriasis humain sont détaillés dans le tableau 1.12.

Les modèles murins semblent indiquer l'importance de la voie de Stat3, de NF- κ B, du facteur de transcription AP-1, des intégrines, des facteurs de croissance, des interleukines ainsi que des cellules T dans la survenue du psoriasis (Figure 1.15).

Stat3 est un facteur de transcription intervenant, quand il est activé, dans de nombreux processus physiologiques comme la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Il semble aussi jouer un rôle dans le psoriasis. Des observations

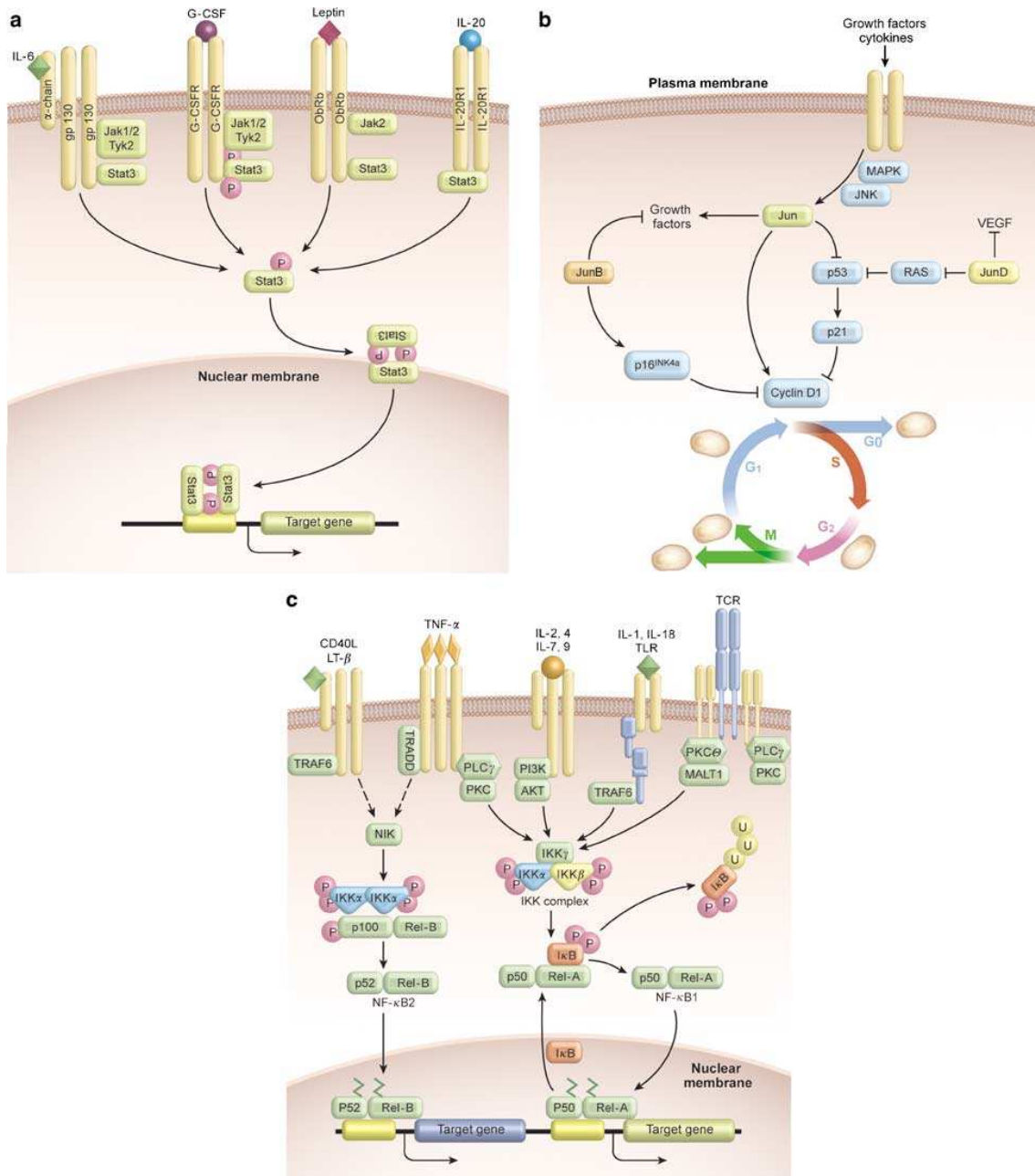
TAB. 1.12: Modèles murins et leur ressemblance au psoriasis humain

La première ligne indique les changements caractéristiques du psoriasis chez l'Homme suivi de ceux chez des modèles murins (Xg : xéno greffe, Alg : allogreffe avec des CMH différents, et Sp : modèles murins spontanés, Y, oui; N; non). Les différences avec l'Homme sont indiquées en rouge, les ressemblances en vert et les données inconnues en jaune. Les nombreux modèles murins ont la plupart des caractéristiques du psoriasis, malgré les différences histologiques de la peau des deux mammifères. (D'après [Gudjonsson et al., 2007])

Model	Epidermal changes				Vascular changes	Inflammatory changes		"Koebner" phenomenon	Phenotype dependent on immune activation	Features unlike human psoriasis
	Thickening	Altered differentiation	Rete ridges	Papillomatosis	Dilation of capillary loops	Epidermal T-cell infiltrate	Intraepidermal microabscesses			
Human psoriasis	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	
Xg	PN on CB.17-Prkdc ^{scid} (Wrono-Smith and Nickoloff, 1996)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	
	PN on AGR129 (Boyman et al., 2004)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	
Alg	CD4 ⁺ CD45RB ^{hi} on ICR-Prkdc ^{scid} (Schon et al., 1997)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Colon inflammation, splenomegaly, no CD8 ⁺ T cells
Transgenic	K5-Stat3C (Sano et al., 2005a)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Alopecia
	K14-IL-20 (Blumberg et al., 2001)	Y	Y	N	N	N	N	N	N	Neonatal lethality
	K14-IL-6 (Turksen et al., 1992)	Y	N	N	N	N	N	N	N	No hyperproliferation
	K5-latent TGF- β 1 (Li et al., 2004)	Y	Y	Y	?	Y	Y	Y	Y	Alopecia
	K10-BMP-6 (Blessing et al., 1996)	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	?	Alopecia
	Involucrin-integrins (Carroll et al., 1995)	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	?	Retarded growth, hair abnormalities, corneal damage
	Involucrin-MEK1 (Hobbs et al., 2004)	Y	Y	N	Y	?	Y	?	?	No parakeratosis, increased loricrin and filaggrin
	Involucrin-amphiregulin (Cook et al., 2004)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	?	Early lethality, alopecia, synovitis
	K14-IL-1 α (Groves et al., 1995)	Y	Y	N	N	N	?	N	N	Crusts, scarring, alopecia, weight loss
	Haptoglobin-collagenase (D'Armiento et al., 1995)	Y	Y	N	?	N	N	N	?	Early lethality
	K14-amphiregulin (Cook et al., 1997)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	?	Early lethality, alopecia, mild synovitis
	K14-VEGF (Xia et al., 2003)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Wounding needed in younger mice
	Tie2 (Tek) (Voskas et al., 2005)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Hair loss, age-related cataracts
	Involucrin-IFN- γ (Carroll et al., 1997)	Y	Y	N	N	Y	N	?	?	Retarded growth, alopecia
	K14-p40 (Kopp et al., 2001)	Y	?	?	?	?	Y	?	?	Crusts, alopecia, no CD8 ⁺ T-cell infiltrate
	HLA-B*27 and β 2m (Breban et al., 1996)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	?	Multiorgan inflammatory disease
TCR MM14.4 (Logunova et al., 2005)	Y	Y	N	N	?	Y	Y	?	Alopecia	
Targeted mutations	Hypomorphic CD18 (Bullard et al., 1996)	Y	Y	N	?	Y	Y	?	Y	Alopecia and crust formation.
	Targeted Junb, Jun KO (Zenz et al., 2005)	Y	Y	?	N	Y	Y	?	N	Alopecia, spongiosis, IL-12p35 and IL-18 absent, TNF- α and T-cell independent
	IL-1ra KO (Shepherd et al., 2004)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	?	Infiltrate of mixed Th1 and Th2 cells, few CD8 ⁺ T cells
	Integrin α _E KO (Schon et al., 2000)	Y	Y	?	?	?	Y	Y	?	Mixed Th1 and Th2 cytokines, few epidermal CD8 ⁺ T cells
	IRF-2 KO (Hida et al., 2000)	Y	Y	?	?	?	Y	?	?	Alopecia, ulceration, disorganized muscle layer with fibrosis
Targeted IKK2 KO (Pasparakis et al., 2002)	Y	Y	N	N	?	N	Y	?	Y	Apoptosis in epidermis, early death. T-cell independent
Spontaneous	Flaky skin (Tic ^{flm} /Tic ^{flm}) (Sundberg et al., 1997)	Y	Y	N	Y	Y	N	Y	Y	Anemia, alopecia, multiorgan
	Chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm) (HogenEsch, 1993)	Y	Y	?	?	Y	N	Y	Y	Severe pruritus, few infiltrating T cells
	Homozygous asebia (Scd1 ^{ab} /Scd1 ^{ab}) (Brown and Hardy, 1988, 1989).	Y	N	N	N	Y	N	N	?	?

FIG. 1.15: Trois voies de signalisation des modèles murins de psoriasis : STAT3, AP-1 et NF- κ B

(a) Des signaux extracellulaires (IL-6, IL-20, etc) activent la voie STAT. Stat3 est activé par phosphorylation, suivi par sa dimérisation et sa translocation nucléaire. (b) Les protéines Jun (Jun, JunB, et JunD) avec d'autres protéines (Fos, ATF et CREB) sont les composants principaux de la famille du facteur de transcription AP-1. Jun intervient dans la prolifération cellulaire (*via* p53 et la cyclin D1), alors que JunB régule négativement la croissance cellulaire (*via* l'inhibiteur p16INK4a). (c) De nombreux signaux extracellulaires sont transmis au noyau *via* NF- κ B sous le contrôle du complexe kinase I κ B (IKK). Activé lors de la phosphorylation de ses sous-unités IKK α et IKK β , IKK phosphorylise I κ B, entraînant sa dissociation, suivi de sa dégradation. Ceci amène à la libération de NF- κ B actif (p50 and Rel-A(p65)) qui se transloque au noyau pour induire la transcription de gènes cibles. (D'après [Gudjonsson et al., 2007])



indiquent que Stat3 semble être un régulateur de la prolifération des kératinocytes et qu'il est présent sous forme activée au niveau des lésions psoriasiques humaines. Des lésions de la peau de type psoriasique ont d'ailleurs été obtenues spontanément ou en réponse à une blessure chez une souris transgénique exprimant de manière constitutive dans les kératinocytes basales Stat3 sous forme active. Cependant, le développement des lésions dans ce modèle semble être dépendant de l'activation des cellules T. D'autres souris transgéniques exprimant des activateurs potentiels de Stat3, montrés surexprimés dans la peau lésée, comme IL-20 et IL-6, montrent aussi des caractéristiques typiques du psoriasis telles que l'hyperprolifération des kératinocytes et une altération de la différenciation mais contrairement aux mutants Stat3, aucune infiltration par des leucocytes n'est observée.

Une autre voie semble intervenir dans la maladie : la voie NF- κ B. Cette voie de signalisation joue un rôle dans le contrôle de nombreux gènes impliqués dans le développement, dans la mort cellulaire programmée mais surtout dans la réponse immune et inflammatoire et dans la prolifération cellulaire. Les facteurs de transcription NF- κ B sont maintenus à l'état inactif par leur association avec les protéines inhibitrices de la famille des I κ B qui inhibent en partie la translocation au noyau de NF- κ B et la capacité de liaison de NF- κ B à l'ADN. L'activation des dimères NF- κ B est réalisée par le complexe I κ B kinase (IKK) qui est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une protéine régulatrice IKK γ /NEMO. Lorsque IKK est activé, il phosphoryle I κ B qui conduit, lors de la fixation d'un complexe, à la polyubiquitination de I κ B et son adressage vers le protéasome où elle sera dégradée. Les dimères NF- κ B sont alors transloqués dans le noyau où ils activent la transcription de nombreux gènes NF- κ B-dépendants. Des souris transgéniques avec délétion épidermique d'IKK β ou d'IKK α développent dans le premier cas une maladie de la peau inflammatoire et dans le second cas des anomalies de l'épiderme. Cependant, ces modèles montrent de grandes différences avec le psoriasis humain comme l'apoptose des kératinocytes pour les souris mutantes d'IKK β [Gudjonsson et al., 2007].

De manière générale, les différents modèles murins ne possèdent qu'une partie des caractéristiques de la maladie, ce qui indique une complexité de celle-ci et l'existence d'interaction entre différents types cellulaires et les cytokines dans la pathogenèse de la maladie.

En résumé, même si les mécanismes physiopathologiques responsables du psoriasis restent encore inconnus, l'existence d'une composante génétique à l'origine de la maladie faisant intervenir plusieurs gènes et d'une composante environnementale est confirmée.

4 OBJECTIF DE LA THESE

Au sein de l'équipe du Dr Judith Fischer au CNG (Centre National de Génotypage), l'objectif général de mon travail a été d'identifier les loci de prédisposition au psoriasis dans une collection de grandes familles françaises, puis de caractériser les gènes impliqués dans la pathophysiologie de la maladie.

Pour atteindre mon premier objectif, j'ai analysé les données d'un criblage du génome réalisé sur un ensemble de grandes familles françaises. Ceci m'a permis de confirmer des régions déjà identifiées lors d'une étude antérieure réalisée avec un nombre plus restreint de marqueurs.

Pour l'identification des gènes de prédisposition, plusieurs voies d'étude ont été menées. Dans un premier temps, j'ai étudié deux des loci caractérisés lors du criblage sur les familles françaises. J'ai ainsi confirmé la contribution du gène HLA-C pour le locus majeur *PSORS1* dans les familles étudiées, et j'ai également contribué à la cartographie fine de la région 20p, ainsi qu'à la caractérisation d'un gène de prédisposition au psoriasis *ADAM33* dans cette région. Dans un deuxième temps, j'ai appliqué une stratégie de "gènes candidats" afin de confirmer ou de découvrir d'autres facteurs génétiques du psoriasis.

Chapitre 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 LES FAMILLES

Le recrutement des familles françaises atteintes de psoriasis a été réalisé grâce à une campagne médiatique entre 1996 et 2001 par Généthon : pages publicitaires dans les magazines, publicités à la radio et à la télévision, affiches dans le métro parisien pour sensibiliser les familles avec plusieurs sujets atteints de la maladie, leur fournir un numéro téléphonique vert gratuit et les inciter à participer à une étude génétique de leur maladie [Mahe et al., 2002].

Cette campagne a permis d'identifier plus de 3800 familles avec au moins deux cas de psoriasis. Parmi ces 3800 familles, 108 familles dites "informatives" d'un point de vue génétique ont été sélectionnées. Ces familles comprennent plus de huit cas de psoriasis sur au moins deux générations. Les diagnostics cliniques sont vérifiés par les renseignements acquis lors d'appels téléphoniques à tous les membres des familles, atteints ou non atteints. Pour chaque sujet de chaque famille, une fiche questionnaire clinique détaillée est remplie par appel téléphonique par des dermatologues. Les informations sur les patients sont ensuite validées deux fois, et dans 75% des cas, confirmées souvent par courrier électronique, de façon indépendante par les médecins qui suivent les patients. En pratique, le sang des sujets de 46 de ces familles a été prélevé et inclus dans notre étude. Cet échantillon représente le premier groupe de familles (Lot I) pour notre étude. Une transmission apparemment autosomique dominante a été observée dans ces familles. Un deuxième groupe de 81 familles françaises moins informatives (Lot II), de taille plus petite et avec en moyenne trois individus atteints de psoriasis par famille, a aussi été identifié et prélevé dans un deuxième temps.

L'ADN génomique a été extrait et les cellules ont été conservées à partir des échantillons de sang collectés à Généthon, selon un protocole classique d'extrac-

TAB. 2.1: **Structure et caractéristiques généalogiques et cliniques des 126 familles du Lot I et du Lot II** (D'après [Lesueur et al., 2007b] traduit et adapté)

A. Description des familles utilisées dans notre étude (NC : Non communiqué)		
Set	Lot I	Lot II
Nombre de familles	45	81
Nombre de familles nucléaires	295	173
Nombre de sujets	1161	668
Nombre moyen de sujets par famille	25.80	8.25
Nombre de sujets génotypés (atteints)	926 (346)	539 (235)
Ratio Homme/Femme atteints (génotypés)	1.02 (0.93)	0.72 (0.69)
Nombre moyen de sujets génotypés par famille (atteints)	20.58 (7.69)	7.32 (2.90)
Nombre de familles consanguines	1	1
Nombre de familles à deux générations	1	24
Nombre de familles à trois générations	18	15
Nombre de familles à quatre générations	17	5
Nombre de familles à cinq générations	8	1
Nombre de familles à six générations	1	0
Age moyen d'apparition de la maladie	19	NC
Pourcentage de patients atteints de psoriasis en plaques	96	NC

B. Distribution des familles selon le nombre de familles nucléaires

par famille	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10	Total
Lot I	1	5	5	6	2	8	4	1	2	4	7	45
Lot II	43	8	16	10	1	2	0	0	1	0	0	81

C. Distribution des familles nucléaires selon le nombre de descendants

par famille nucléaire	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	14	Total	
Lot I		75	91	58	31	10	8	11	5	3	2	1	295
Lot II		40	66	47	11	5	4	0	0	0	0	0	173

tion d'ADN (phénol/chloroforme). La concentration des ADN a ensuite été mesurée par spectrophotométrie et normalisée à une concentration finale de 200 ng/ μ l. Conformément à la loi, les personnes intégrées dans l'étude ont signé un consentement écrit et éclairé, donnant leur accord pour participer à une étude génétique. Les études génétiques restent anonymes et l'identité de chaque personne, ainsi que les informations les concernant restent confidentielles. Chaque personne est identifiée par un numéro unique, permettant ainsi sa traçabilité permanente mais de manière anonyme. L'étude française du psoriasis a été approuvée par le comité d'éthique de l'Hôpital Le Kremlin-Bicêtre en 1995. Cette étude a donc été conduite en accord avec les principes d'Helsinki.

La première étude de liaison a été effectuée sur un sous-groupe de 14 grandes familles du Lot I. Si une liaison avec une région est observée, une étude sur cette région d'intérêt est alors réalisée sur l'ensemble des 46 familles. La description détaillée des caractéristiques cliniques et de la structure des 46 familles incluses dans notre étude de liaison est présentée dans l'article [Lesueur et al., 2007a]. Les études d'association sont réalisées sur 45 familles du Lot I (une famille ayant été éliminée). Lorsqu'une association est suggérée pour un gène candidat, nous avons tenté de le répliquer dans le deuxième échantillon, constitué de 81 familles plus petites du Lot II. La description détaillée des caractéristiques cliniques et de la structure des 126 familles incluses dans notre étude est donnée dans le tableau 2.1.

2 ANALYSE DE LIAISON

2.1 Génotypage des microsatellites

2.1.1 Contexte

Premier criblage du génome (nommé "Criblage 1")

Le premier criblage de l'ensemble du génome, réalisé au laboratoire, a été entrepris en génotypant et en analysant un panel de 260 marqueurs microsatellites polymorphiques, choisis en fonction de la carte génétique de Généthon (Evry, France), sur un premier groupe de 14 familles du Lot I. Des marqueurs supplémentaires à ce panel dans des loci candidats précédemment publiés ont également été analysés (Tableau 2.2).

Ces marqueurs sont le plus souvent des marqueurs de répétitions de dinucléotides (CA), répartis de manière régulière (environ un marqueur tous les 15 cM) et abondamment tout au long du génome. Lorsqu'une liaison entre une région et le psoriasis a été suggérée dans ce premier groupe de 14 familles, la région a été étudiée dans le deuxième groupe des familles du lot I (32 familles restantes).

TAB. 2.2: Microsatellites supplémentaires génotypés dans les 14 premières familles du Lot I ou dans la totalité des 46 familles du même lot (6p, 10q, 13q, 14q, 16p and 20p)

Région	Marqueurs	Hétérozygotie	Distance du telomere (P) (cM)	Référence
1p12-p13 (PSORS7)	D1S2726	0.75	144	[Veal et al., 2001]
	D1S252	0.82	150	
	D1S514	0.76	152	
1q21 (PSORS4)	D1S498	0.82	155	[Capon et al., 1999a]
	D1S305	0.83	159	
	D1S2721	0.74	161	
	D1S2635	0.86	166	
2p12-p16	D2S357	0.79	80	[Veal et al., 2001]
	D2S380	0.83	84	
	D2S286	0.67	94	
	D2S139	0.82	102	
4qter (PSORS3)	D4S1607	0.82	184	[Matthews et al., 1996]; [Nair et al., 1997]; [Sagoo et al., 2004]
	D4S1535	0.75	195	
	D4S408	0.78	195	
	D4S3032	0.67	200	
6p21 (PSORS1)	D6S1686	0.61	39	[Nair et al., 1997]; [Trembath et al., 1997]; [Samuelsson et al., 1999]; [Veal et al., 2001]; [Zhang et al., 2002]; [Sagoo et al., 2004]
	D6S1663	0.68	40	
	D6S299	0.80	42	
	D6S276	0.83	42	
	D6S1554	0.71	42	
	D6S258	0.77	44	
	D6S1542	0.46	47.7	
	D6S1568	0.87	47.7	
	TNF α	0.27	47.7	
	D6S1560	0.85	47.7	
	D6S1618	0.85	47.7	
	D6S439	0.60	48.2	
D6S291	0.70	49.5		
8q24	D8S1832	0.70	132	[Trembath et al., 1997]
	D8S263	0.68	142	
	D8S284	0.83	144	
	D8S1712	0.72	144	
	D8S1740	0.64	147	
	D8S529	0.81	148	
	D8S256	0.83	148	
	D8S537	0.89	151	
D8S1753	0.86	154		
10q23-q26	D10S583	0.83	115	[Sagoo et al., 2004]
	D10S603	0.75	124	
	D10S1731	0.82	134	
	D10S587	0.81	148	

Suite du tableau à la page suivante \Rightarrow

Région	Marqueurs	Hétérozygotie	Distance du telomere (P) (cM)	Référence
	D10S217	0.81	158	
12p13	D12S1652	0.81	8	[Veal et al., 2001]
	D12S314	0.80	11	
	D12S77	0.89	20	
13q31-q34	D13S265	0.68	69	
	D13S154	0.87	75	
	D13S280	0.88	85	
	D13S286	0.78	94	
	D13S1315	0.80	103	
14q11-q32	D14S72	0.82	9	[Veal et al., 2001]
	D14S50	0.77	13	
	D14S283	0.82	14	
	D14S1057	0.80	56	
	D14S63	0.77	69	
	D14S1028	0.82	81	
	D14S1052	0.74	94	
	D14I066	0.64	99	
16p13	D16S521	0.71	1	
	D16S423	0.73	10	
	D16S3075	0.78	23	
	D16S3103	0.82	32	
	D16S499	0.69	33	
16q12-23(PSORS8)	D16S415	0.74	68	[Nair et al., 1997]; [Karason et al., 2003]; [Sagoo et al., 2004]
	D16S3039	0.74	74	
	D16S516	0.73	100	
	D16S422	0.79	111	
17q25(PSORS2)	D17S939	0.83	106	[Tomfohrde et al., 1994]; [Nair et al., 1997]; [Samuelsson et al., 1999]
	D17S784	0.77	117	
	D17S928	0.77	127	
20p13	D20S864	0.50	0	[Nair et al., 1997]; [Trembath et al., 1997]
	D20S116	0.80	11	
	D20S851	0.73	25	
	D20S917	0.81	25	
	D20S189	0.75	31	
	D20S112	0.80	39	

Ainsi, 2 à 8 marqueurs adjacents ont été analysés à l'exception de la région 6p21 (13 marqueurs) et de la région 8q24 (9 marqueurs) dans 32 autres familles (Tableau 2.2).

Deuxième criblage du génome (nommé "Criblage 2")

Réalisé par l'équipe de la plateforme du génotypage des microsatellites au CNG, le deuxième criblage de l'ensemble du génome a été entrepris en analysant un panel de 371 microsatellites sur l'ensemble du lot I (46 familles), sans aucun *a priori* sur la localisation des régions du génome pouvant contenir un ou des gènes de prédisposition à la maladie. Une analyse combinée de ce panel avec le premier criblage (nommé "Criblage 1+2") est également réalisée. Cette augmentation de densité de marqueurs polymorphes permet entre autres d'affiner la définition des régions d'intérêt. Lors de cette dernière analyse, 118 microsatellites supplémentaires sont également analysés sur le lot I. Au total, 826 microsatellites ont été analysés dont 147 en double.

2.1.2 Principe

Le principe du génotypage des microsatellites est d'amplifier, par la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), spécifiquement un fragment d'ADN comportant le marqueur microsatellite encadré par deux séquences connues utilisées comme amorces, puis de séparer les différentes tailles des amplifiats, correspondant aux divers profils alléliques de ce marqueur, par électrophorèse sur un gel d'acrylamide. Le séquenceur intègre les différentes émissions de fluorescence émises par l'excitation par un laser des fluorochromes, marquant les différents microsatellites en 5'P et, à l'aide de logiciels, va permettre de distinguer les différents marqueurs par leurs marquages et les allèles par leur taille, estimée en fonction des différents pics du marqueur de taille.

2.1.3 Technique

Le génotypage des microsatellites a été réalisé par l'utilisation de séquenceurs automatiques pour le premier criblage, ABI PRISM 373 (36 puits) et 377 (96 puits) (PE Applied Biosystems) et pour le deuxième criblage, MegaBACE 1000. Les différents profils alléliques du marqueur sont visualisés grâce au marquage des microsatellites lors de l'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) *via* l'utilisation d'une amorce marquée par un fluorochrome à son extrémité 5'. Sur un même individu, plusieurs microsatellites de tailles proches peuvent être analysés dans un même gel ou un même capillaire *via* l'utilisation de différents fluorophores : TET (tétrachlorofluorescéine, fluorescent dans le vert), FAM (5-carboxyfluorescéine, fluorescent dans le bleu) et HEX (6-carboxy 2',4',7',4,7-hexachlorofluorescéine, fluorescent dans le jaune). Les groupes de microsatellites ("le pool des microsatellites") à analyser ensemble sont établis en fonction de la

taille des marqueurs et de leur couleur. Ainsi, environ 8 marqueurs dont 3 de tailles voisines avec des fluorochromes différents peuvent être étudiés ensemble. Le protocole de la PCR le plus largement utilisé est rapidement décrit dans les tableaux 2.3 et 2.4. La PCR est une succession de cycles d'amplification comportant une étape de dénaturation de la double hélice de l'ADN, une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN cible et une étape de synthèse du fragment analysé (c'est-à-dire l'élongation des amorces en prenant pour modèle le brin hybridé à l'amorce) (Figure 2.1).

Pour pouvoir déposer plusieurs marqueurs sur un seul puits, différents protocoles sont appliqués selon le séquenceur utilisé. Dans le cas des séquenceurs ABI PRISM 373 et 377, le programme "PrepManip" est utilisé pour déterminer la quantité de produits de PCR nécessaire pour le pooling, ainsi que le volume à déposer sur le gel. Les ADN amplifiés sont dénaturés dans un mélange de 2 μ l composé de formamide déionisée, d'un marqueur de taille (TAMRA) et d'un tampon de charge (bleu de dextran) par chauffage pendant 5 min à 96°C et refroidissement brutal dans la glace. Les échantillons sont déposés dans les puits du gel des séquenceurs 373/377 et soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide avec une durée de migration d'environ 3 heures.

Dans le cas du séquenceur MegaBACE 1000, 2 μ l pour les marqueurs FAM et TET et 3 μ l pour HEX sont mélangés dans le même puits, suivi de leurs dilutions avec 15 μ l d'eau. Puis, 20 μ l du mélange est purifié à l'aide d'une colonne contenant du Sephadex G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB), tassé par une centrifugation de 3 minutes à 1500g. Le produit purifié est récupéré lors d'une centrifugation de 2 minutes à 1100g et 2 μ l de ce produit est dénaturé dans un mélange de charge (ET-ROX400) contenant comme marqueur de taille ROX. Ils sont analysés par le séquenceur MegaBACE 1000. La durée de migration de l'électrophorèse est d'environ 2 heures.

Un marqueur de taille, couplé à un fluorochrome (TAMRA ou ROX) est présent dans chaque puits et migre en même temps que l'ADN. Cela permet de calibrer et de définir la taille des différents allèles du microsatellite dans l'intervalle d'environ 50-500pb. Pour les séquenceurs ABI 373/377, l'analyse des données brutes, ainsi que le calcul de la taille des fragments (en fonction du marqueur de taille), correspondant au nombre de répétitions (CA), se font à l'aide du logiciel GeneScan analysis (PE Applied Biosystems). L'analyse des profils alléliques pour chaque marqueur pour les différents individus est réalisée à l'aide du logiciel Genotyper (PE Applied Biosystems). Pour le séquenceur MégaBACE, l'analyse globale se fait à l'aide du programme Genetic Profiler (GE Healthcare) (Figure 2.2).

2.1.4 Contrôle de qualité

Deux échantillons d'ADN du panel du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH), dont le génotype pour les marqueurs étudiés est connu, sont

TAB. 2.3: Mélange réactionnel pour une amplification individuelle du marqueur par PCR sur une plaque de 96 puits

Séquenceurs utilisés	ABI 373/377	MégaBACE
Produits	Quantité	Quantité
ADN	30 ng	20 ng
dNTPs	0.2 mM	0.06 mM
MgCl ₂	2.5 mM	2.5 mM
Tampon	1X	1X
Triton	0.1%	0
Primers Forward et Reverse	0.67 μM	0.67 μM
AmpliTaq Gold (ADN polymérase)	0.5U	0.4U
Volume final (qsp H ₂ O)	15 μl	10 μl

TAB. 2.4: Différentes étapes du cycle de la PCR le plus souvent utilisé

1- pour les séquenceurs ABI 373/377, lancé sur le thermocycleur Techne genius

Température	Temps	Répétition (cycles)
92°C	10 min. (dénaturation initiale)	
91°C	40 sec. (dénaturation)	3
69°C	30 sec (hybridation et extension)	
90°C	40 sec.	3
64°C	30 sec.	
89°C	40 sec.	3
59°C	30 sec.	
89°C	40 sec.	32
55°C	30 sec.	
72°C	5 min (élongation finale)	
15°C	15 min.	

2- pour le séquenceur MégaBACE, lancé sur le thermocycleur 9700PCR system Perkin Elmer

Température	Temps	Répétition (cycles)
95°C	12 min. (dénaturation initiale)	
94°C	15 sec. (dénaturation)	10
55°C	15 sec (annealing)	
72°C	30 sec (extension)	
89°C	15 sec.	20
55°C	15 sec.	
72°C	30 sec.	
72°C	10 min (élongation finale)	
15°C	15 min.	

FIG. 2.1: Principe de la PCR
(d'après [Swynghedauw, 2001])

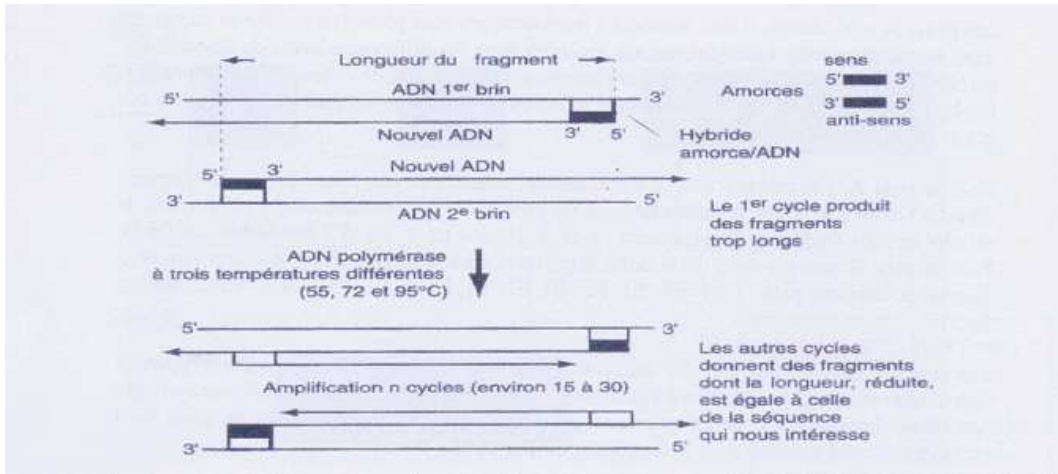
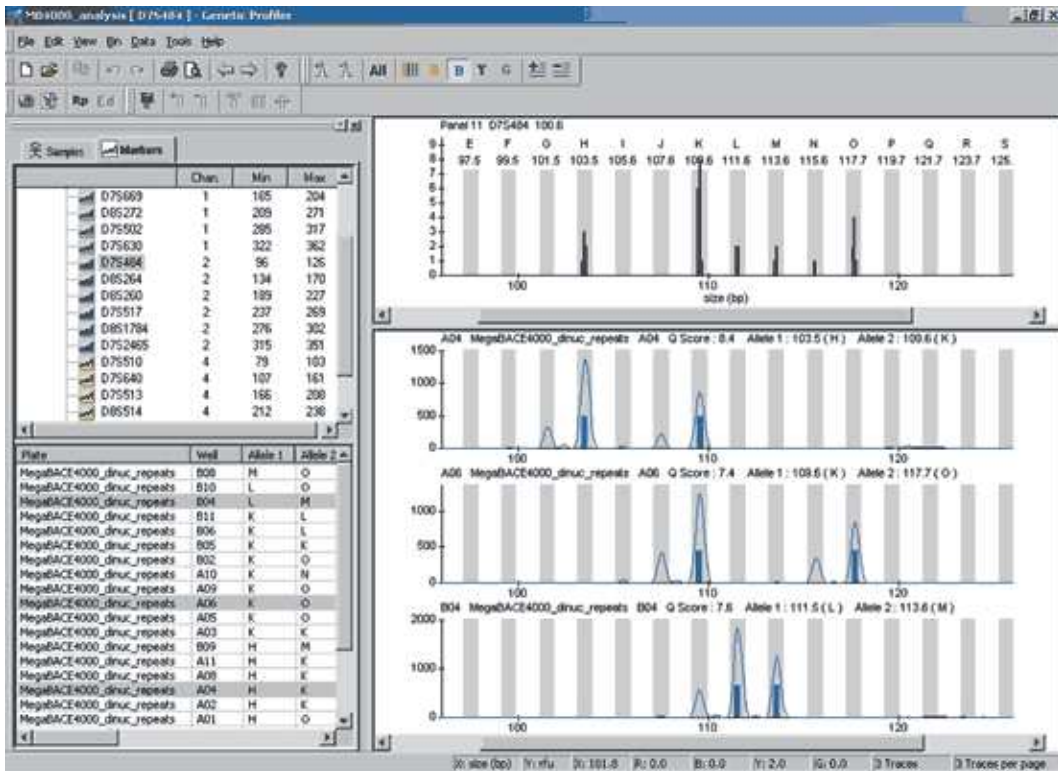


FIG. 2.2: Représentation de différents profils génétiques de différents individus analysés par le programme Genetic Profiler

Chaque graphe correspond à un individu et chaque pic "bleu" correspond à un allèle du marqueur analysé. Par exemple, le premier individu a un allèle de taille 103 pb et un autre allèle de taille de 109 pb.



inclus dans chaque gel analysé comme témoins internes de la qualité de la manipulation. Après l'analyse des profils alléliques, l'homogénéisation des données obtenues entre les différents gels et la vérification des relations intrafamiliales est réalisée à l'aide du logiciel Marksyn (Alibert O., Généthon). Une analyse globale des différentes erreurs de génotypes ou d'erreurs de concordance dans les familles, mais également d'erreurs de transmission mendélienne, est effectuée par le programme PedCheck [O'Connell and Weeks, 1998].

2.2 Méthodes des analyses de liaison

2.2.1 Analyses paramétriques

Simulations

L'analyse paramétrique, qui teste la vraisemblance de la liaison de la maladie à des marqueurs dans des familles selon différentes valeurs du taux de recombinaison θ , visualisé par le lod score, dépend de différents paramètres : le modèle génétique, les caractéristiques de la maladie (autosomique dominante, récessive, fréquence du gène, pénétrance..) et les caractéristiques des familles étudiées (nombre de sujets atteints, consanguinité..). Comme exposé dans l'introduction, dans le cas des maladies à hérédité complexe, ces paramètres sont souvent difficiles à estimer et peuvent entraîner de nombreux faux-positifs. Cependant, dans notre recherche, il pouvait être intéressant de faire une étude préalable par une analyse paramétrique car nos échantillons sont des grandes familles avec plusieurs générations et avec une transmission apparemment autosomique dominante du psoriasis. Avant de réaliser le génotypage, il est important d'estimer la probabilité de détecter une liaison dans des conditions définies (le modèle génétique, les caractéristiques de la maladie). La puissance théorique d'analyse paramétrique bi-point des familles est estimée par le programme SLINK (option MSIM) qui calcule, par simulation, la probabilité d'obtenir un lod score maximal à partir des différentes données choisies au préalable [Weeks et al., 1990]. Pour tester nos familles, les hypothèses choisies sont les suivantes : mode de transmission autosomique dominant avec une pénétrance incomplète (80%), absence d'hétérogénéité génétique, fréquence allélique de la maladie de 1% et analyse d'un marqueur avec quatre allèles équi-fréquents. Après une simulation de 500 répliques, le lod score maximum moyen estimé à $\theta = 0$ est supérieur à 3 dans 42% (19/45) des familles. Il est entre 2 et 3 dans 22% (10/45) des familles, $1 < Z < 2$ dans 25% (11/45) et < 1 pour le reste de familles (11%, 5/45). Le lod score moyen pour toutes les familles est de 3.2 (l'écart type : 1.19) avec comme valeur la plus haute 7.64 et la plus basse 0.30. Or, le seuil de décision pour que l'hypothèse d'indépendance soit rejetée est de $Z = 3$. Même si une analyse paramétrique est peu adaptée dans le cas d'une "maladie complexe" pour identifier des régions de prédisposition, cette analyse a été réalisée sous deux modèles, en raison de la puissance théorique élevée de certaines de nos grandes

familles.

Analyse paramétrique

L'analyse paramétrique bi-point a été réalisée avec le package LINKAGE (programme MLINK), pour tester tous les marqueurs (choisis lors des 1er et 2ème criblages du génome) sur l'ensemble des 45 familles étudiées [Lathrop et al., 1984]. Lors de cette analyse, deux modèles ont été testés : le modèle 1 (mode de transmission autosomique dominant avec une pénétrance incomplète (80%), absence d'hétérogénéité génétique, fréquence allélique de la maladie de 1%) et le modèle 2 (mode de transmission autosomique récessif avec une pénétrance faiblement incomplète (99%), absence d'hétérogénéité génétique, fréquence allélique de la maladie de 1%). Les fréquences alléliques pour l'ensemble des marqueurs ont été estimées à partir des données brutes sur les individus fondateurs ou indépendants des 45 familles grâce à ce même logiciel.

Les résultats sont avant tout descriptifs et sont pris avec précaution, dûs à la probabilité élevée d'avoir de faux positifs, car dépendants des modèles choisis lors de l'analyse.

2.2.2 Analyses non paramétriques

En plus des analyses paramétriques, différentes analyses non paramétriques multipoints ont été réalisées car ce type d'analyse ne nécessite pas de connaître les paramètres déjà décrits précédemment. Une analyse multipoint est plus robuste qu'une analyse bi-point car elle prend en compte les informations obtenues par tous les marqueurs, même ceux qui sont peu informatifs en se basant sur les marqueurs voisins.

Différents programmes permettent de faire ce type d'analyse tels que GENEHUNTER [Kruglyak et al., 1996], Allegro [Gudbjartsson et al., 2000], ou MERLIN [Abecasis et al., 2002]. Cependant, dans le cas de l'étude sur des grandes familles, peu de programmes peuvent les analyser à moins d'avoir un nombre limité de marqueurs tels que LINKAGE [Lathrop et al., 1984] et SIMWALK [Sobel and Lange, 1996]. Pour le premier criblage, deux méthodes non paramétriques multipoints ont été utilisées : la méthode MLB (*Maximum Likelihood Binomial method*) [Abel and Muller-Myhsok, 1998] et la méthode NPL (*Non Parametric Linkage*). Ces deux méthodes sont des extensions de la méthode des paires de germains atteints, décrite dans le chapitre Introduction et consistent à déterminer l'IBD entre tous les germains atteints (dans le cas du MLB) ou entre toutes les paires de germains atteints (dans le cas du NPL_{pair}) ou encore entre tous les malades d'une famille (dans le cas du NPL_{all}). Cette approche permet d'accorder plus d'importance à une transmission d'un même allèle à plusieurs apparentés atteints qu'à la transmission d'un certain allèle à une paire de germains atteints. Contrairement au NPL qui est basé sur le nombre d'allèles partagés IBD par tous

les membres atteints d'une famille, la méthode MLB est basée sur la distribution binomiale des allèles parentaux parmi les descendants atteints, considérant ainsi tous les germains pris comme un entier.

La probabilité α pour un germain atteint de recevoir d'un parent l'allèle "marqueur" transmis avec l'allèle "maladie" est égale à 0.5 sous l'hypothèse nulle de non liaison et est supérieure à 0.5 sous l'hypothèse de liaison. Le test de liaison est réalisé à partir d'un test de rapport de vraisemblance $\lambda = 2Ln[L(\alpha)/L(\alpha = 0.5)]$ avec une statistique distribuée asymptotiquement comme une distribution mixte de $0.5\chi_{0df}^2$ et $0.5\chi_{1df}^2$. Le test peut également être exprimé comme $Z_{MLB} = \lambda^{\frac{1}{2}}$ ou $LOD_{MLB} = \frac{\lambda}{(2Ln(10))}$.

Ces analyses sont réalisables grâce aux programmes MLBGH, une extension du programme GENEHUNTER, et MERLIN. Un des inconvénients de ces programmes est la limite du nombre maximal d'individus pouvant être analysés. Ainsi, pour permettre l'analyse, les structures familiales ont été modifiées en les clivant en familles nucléaires avec le program Mega 2 [Mukhopadhyay et al., 2005]. Les 45 familles ont été divisées en 77 familles nucléaires, chacune avec au moins deux germains atteints.

Après l'étude de ce premier criblage, un tour du génome a été effectué, non plus sur les 14 premières familles du Lot I mais sur la totalité des 45 familles du Lot I. Afin de pouvoir comparer avec le premier criblage, nous avons étudié ce deuxième tour de génome seul (Criblage 2) ou en ajoutant les marqueurs du premier criblage (Criblage 1+2) en utilisant la méthode MLB.

Pour l'analyse du deuxième criblage avec ou sans les marqueurs du premier criblage, d'autres méthodes non paramétriques multipoints (en particulier en calculant les statistiques NPL_{pair} et NPL_{all}) ont été appliquées pour l'analyse des familles non fragmentées grâce au programme SIMWALK2 [Sobel and Lange, 1996]. Contrairement au programme MERLIN, SIMWALK2 utilise une approche MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) pour estimer les allèles IBD entre individus atteints selon leur vraisemblance.

La difficulté de ces analyses reste l'estimation du statut IBD des individus. Contrairement aux analyses de paires de germains, l'utilisation de nombreux individus atteints dans l'analyse, permet une meilleure estimation de ce statut, ainsi que l'utilisation simultanée de l'information de tous les marqueurs sur le chromosome. Néanmoins, selon la méthode utilisée, le moyen de corriger l'effet de la non-indépendance parmi les germains dans l'analyse est différent. Dans tous les cas, une mauvaise estimation du statut IBD peut diminuer la puissance d'analyse et amener à des faux-positifs. Le seuil de la valeur de P doit être au moins égale à 7.4×10^{-4} (correspondant à un lod score=2.2) pour indiquer une preuve suggestive d'une liaison, à 2.2×10^{-5} (lod score=3.6) pour une preuve significative et à 3×10^{-7} (lod score=5.4) pour une preuve hautement significative [Lander and Kruglyak, 1995]. Cependant, à l'exception de l'étude du premier criblage sur

14 familles où la valeur de P est de 1%, la valeur de P seuil dans l'ensemble des études de liaison, est de 5% ($Z_{norm}=1.6$ pour la méthode MLB). Conscients des erreurs possibles, nos résultats n'ont pas été corrigés en fonction du nombre de tests effectués (Correction de Bonferonni).

3 ANALYSE D'ASSOCIATION

3.1 Principe des études d'association

Comme précédemment décrit dans le chapitre Introduction, les études d'association sont fondées sur le principe d'un déséquilibre de liaison (DL). Le déséquilibre de liaison décrit une non-indépendance de deux allèles situés à des loci différents du génome dans la population. Il est affecté par la recombinaison méiotique et diminue proportionnellement à la distance séparant les loci.

La force du déséquilibre de liaison entre deux locus est mesurée à l'aide du coefficient de déséquilibre de liaison, D . Considérons le cas de deux marqueurs bialléliques, avec les allèles A , a et B , b de fréquence p_A, q_A, p_B et q_B . Ce coefficient D correspond à la différence entre la proportion observée d'un haplotype et celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance.

Dans le cas de l'haplotype AB : $D = P(AB)_{\text{observé}} - P(AB)_{\text{attendu}}$, si les deux locus sont indépendants, on s'attend à ce que la proportion d'haplotypes AB soit égale au produit des fréquences d'allèles A et B , c'est-à-dire :

$$D = P(AB)_{\text{observé}} - P(AB)_{\text{attendu}} = P(AB)_{\text{observé}} - p_A p_B$$

Mais D est également estimé par :

$$D = P(Ab)_{\text{observé}} - P(Ab)_{\text{attendu}} = P(Ab)_{\text{observé}} - p_A q_B$$

$$D = P(aB)_{\text{observé}} - P(aB)_{\text{attendu}} = P(aB)_{\text{observé}} - q_A p_B$$

$$D = P(ab)_{\text{observé}} - P(ab)_{\text{attendu}} = P(ab)_{\text{observé}} - q_A q_B$$

$$D = P(AB)P(ab) - P(Ab)P(aB)$$

Ainsi, plus D est élevé, plus les locus sont en déséquilibre de liaison.

Afin d'avoir des mesures comprises entre 0 et 1, des standardisations de D ont été proposées, dont deux sont les plus utilisées : le coefficient D' et le coefficient de corrélation r^2 . Ils sont calculés ainsi :

$$|D'| = |D|/D_{max}$$

$$\text{où } D_{max} = \min(p_A q_B, q_A p_B) \text{ si } D > 0$$

$$D_{max} = \min(p_A p_B, q_A q_B) \text{ si } D < 0$$

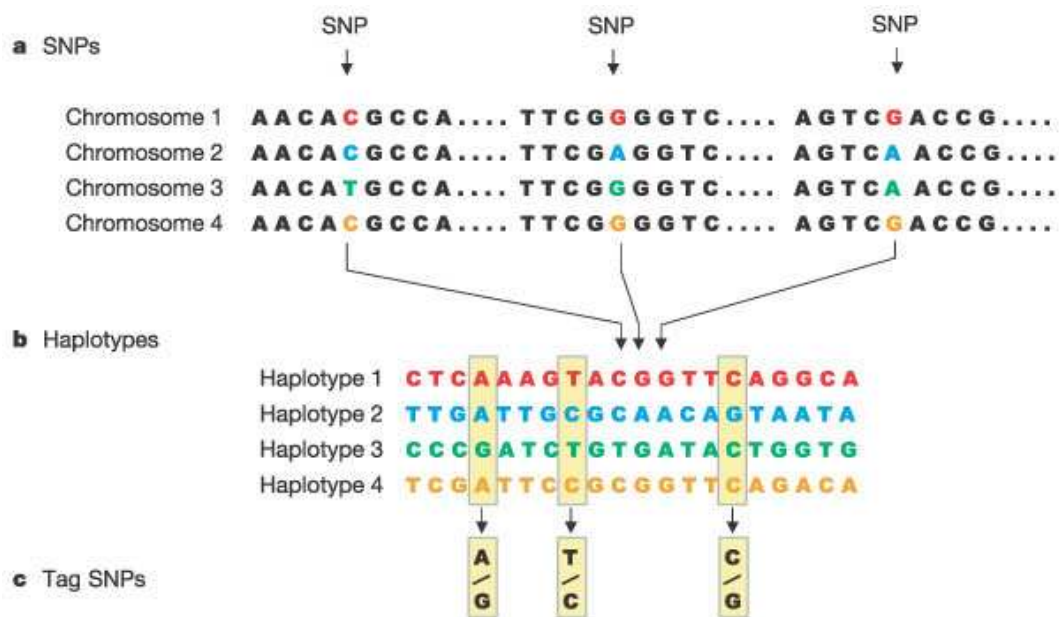
$$\text{et } r^2 = D^2/(p_A q_A p_B q_B)$$

Lorsque $D' = 1$, il y a déséquilibre complet et lorsque $r^2 = 1$, il y a déséquilibre parfait.

La mesure r^2 varie, comme D' , avec la recombinaison mais aussi avec la fréquence allélique des marqueurs, qui est un reflet de leur ancienneté dans l'histoire d'une

FIG. 2.3: Approche "TagSNPs" se fait en trois étapes

(a) Les polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) sont identifiés dans les échantillons d'ADN provenant de nombreux individus. (b) Les SNPs adjacents qui sont hérités simultanément sont regroupés en "haplotypes" dont la fréquence dans la population excède un pour cent. (c) Des SNPs marqueurs, au sein d'un haplotype, sont choisis pour constituer un identificateur unique de cet haplotype. En génotypant les trois SNPs marqueurs illustrés dans cette figure, on peut déterminer lequel des quatre haplotypes illustrés est porté par chaque individu. (D'après le site : <http://www.hapmap.org/whatismap.html.fr>)



population. Ainsi, contrairement au cas où $D' = 1$, deux SNPs ayant un r^2 de 1 sont totalement équivalents et l'un peut être utilisé comme substitut de l'autre (l'information contenue est équivalente). Ceci est dû à la présence de seulement deux des génotypes possibles. En pratique, un r^2 de 0,8 est habituellement choisi dans les études d'association pour décrire deux SNPs équivalents.

L'étude du DL au sein du génome montre que le DL peut parfois s'étendre sur plusieurs centaines de kilobases. Le génome est d'ailleurs structuré en fonction du DL, résultant d'une différence du taux de recombinaison le long du génome. Cette structuration en blocs de DL peut aussi résulter de phénomènes dépendants de la population étudiée tels que la dérive génétique (fixation d'un allèle de manière aléatoire au sein de la population), la croissance et la stratification de la population, la sélection naturelle et l'apparition de mutations. Le génome est donc organisé en blocs de régions transmises de manière intacte au cours des générations. Ces blocs dans lesquels il existe un fort DL et par conséquent, une faible diversité haplotypique (soit les différentes combinaisons possibles des allèles de chaque SNP) sont appelés des blocs de DL (ou blocs haplotypiques). Ainsi, par l'existence de ce fort DL, de nombreux polymorphismes donnent la même information sur la variation génétique au sein du bloc car ils sont souvent hérités ensemble. Par conséquent, seulement quelques polymorphismes seront nécessaires à étudier car ils seront représentatifs de l'ensemble des haplotypes existants dans la population, c'est-à-dire de l'ensemble de la variabilité génétique du bloc. Ils sont nommés "TagSNPs" (Figure 2.3).

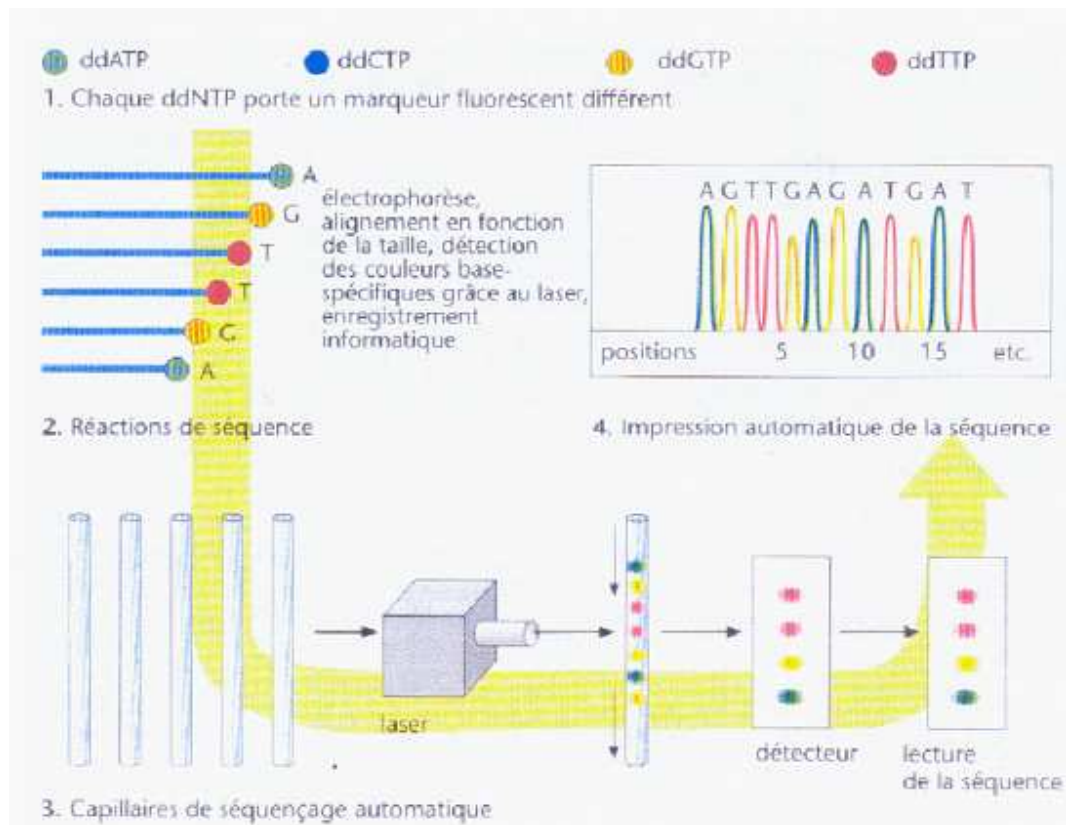
La caractérisation des SNPs, en particulier des TagSNPs, a été l'objectif de différents projets d'analyse du génome dont HapMap (<http://www.hapmap.org/>) afin de faciliter les études d'association [Consortium, 2003]. Ce projet international a permis de cataloguer les variations génétiques (nature, position et fréquence selon les populations) les plus fréquentes chez l'Humain, en analysant l'ADN de 4 populations d'origine africaine, asiatique (japonaise et chinoise) et européenne [Consortium, 2003]. Cette connaissance permet l'identification de la plupart des haplotypes communs à la population mondiale, variables en fréquence selon les populations. Ainsi, l'étude des blocs DL en fonction des populations permet de caractériser les identificateurs uniques d'un haplotype, les TagSNPs, spécifique d'une population [Consortium, 2005]. Cela est très utile pour des études d'association systématiques.

3.2 Séquençage

3.2.1 Contexte sur le locus HLA-C

Après la confirmation d'un locus majeur du psoriasis sur le chromosome 6p21 (*PSORS1*) dans notre étude de liaison sur les familles françaises, nous avons voulu montrer l'implication particulière, à ce locus, de l'allèle HLA-*Cw6* dans le psoriasis

FIG. 2.4: Schématisation du principe du séquençage
(d'après [Passarge, 2000])



TAB. 2.5: Liste des amorces choisis pour chaque exon du HLA-C
Amorce F : "forward" (5'→3'), amorce R : "Reverse" (3'→5')

Exon du gène HLAC	5'→3'
Amorce 1F pour l'exon2	CAGGCTCCCACTCCATGA
Amorce 1R pour l'exon2	CTCTCCGGTGGAGGGTCT
Amorce 2F pour l'exon3	CAGACCCTCGACCGGAGA
Amorce 2R pour l'exon3	CCCATTTTCCTCCCCTCCT

par une étude d'association. Pour cela, la structure du DL entre les nombreux polymorphismes au sein du gène *HLA-C* est étudiée afin d'analyser le nombre minimum de marqueurs nécessaires pour caractériser spécifiquement cet allèle. Malgré la complexité de la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), il existe un fort déséquilibre de liaison dans la région contenant le gène *HLA-C*. Ainsi, un SNP en position 213 (rs1050414) ou 341 (rs1131123) permet, avec le SNP en position 361 (rs1131118), de typer *HLA-C* en distinguant tous les sous allèles de *HLA-Cw6* (*HLA-Cw6*02-11) (d'après IMGT/HLA, Avril 2004 version 2.5 (www.ebi.ac.uk/imgt/hla/)). Deux des 3 TagSNPs sont présents sur l'exon 2 du gène *HLA-C* (rs1050414 et rs1131123) et un sur l'exon 3 (rs1131118). En raison d'une grande variabilité de la région HLA, le génotypage de ces 3 TagSNPs dans les 45 familles est obtenu par le séquençage des exons 2 et 3 du gène *HLA-C*.

3.2.2 Principe

La technique employée pour le séquençage est la technique de Sanger utilisant des didésoxyribonucléotides (ddNTPs). Cette technique est basée sur la synthèse d'un brin d'ADN par une polymérase et par l'incorporation aléatoire de ddNTPs, chacun marqué par des fluorophores de 4 couleurs différentes. L'incorporation de ddNTPs entraînera l'arrêt de l'extension de la chaîne nouvellement synthétisée par leur manque du groupement OH en 3'. Les fragments d'ADN marqués de tailles différentes sont séparés sur un gel de polyacrylamide (Figure 2.4).

3.2.3 Technique

Le séquençage des deux exons, réalisé avec les séquenceurs automatiques ABI PRISM 3730 ou 3700, nécessite une étape d'amplification de l'ADN par PCR. Pour cela, des couples d'amorce doivent être choisis afin de pouvoir amplifier les parties exoniques d'intérêt.

Choix des amorces

Le choix des couples d'amorces a été réalisé avec difficulté, dû à la grande variabilité connue de cette région. Nous avons donc sélectionné, après l'étude de la structure des introns et des exons du gène *HLA-C*, les parties peu polymorphes du gène de façon à pouvoir séquencer l'intégralité de la région. La sélection précise des deux couples d'amorces pour séquencer l'exon 2 et 3 a été réalisée par le programme "Primer 3" (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) en tenant compte de certains critères comme la température d'hybridation optimale de 60 °c (avec la formule $4GC+2AT-4$) et la taille de l'amorce d'une vingtaine de nucléotides (20 mers) [Rozen and Skaletsky, 2000](Tableau 3.2.1).

Les couples d'amorces définis par cet outil sont ensuite testés, grâce à un gra-

TAB. 2.6: Conditions choisies pour l'amplification des exons 2 et 3 du gène HLA-C

	Taille du fragment (en pb)	Température d'hybridation (en °c)
HLA-C_exon2	411	57
HLA-C_exon3	488	55

TAB. 2.7: Mélange réactionnel pour une amplification individuelle des exons 2 et 3 par PCR sur une plaque de 96 puits

(pour l'exon 3 : une deuxième amplification était souvent nécessaire)

Produits	Quantité (en μ l)
ADNg non amplifié à 5ng/ μ l	5
Tampon 10X	2.5
Amorces 2F à 10mM	0.5
Amorces 2R à 10mM	0.5
dNTP à 2mM	2.5
Eau	12.6
MgCl ₂ à 25mM	1.3
Enzyme Taq GOLD	0.1
Volume final	25

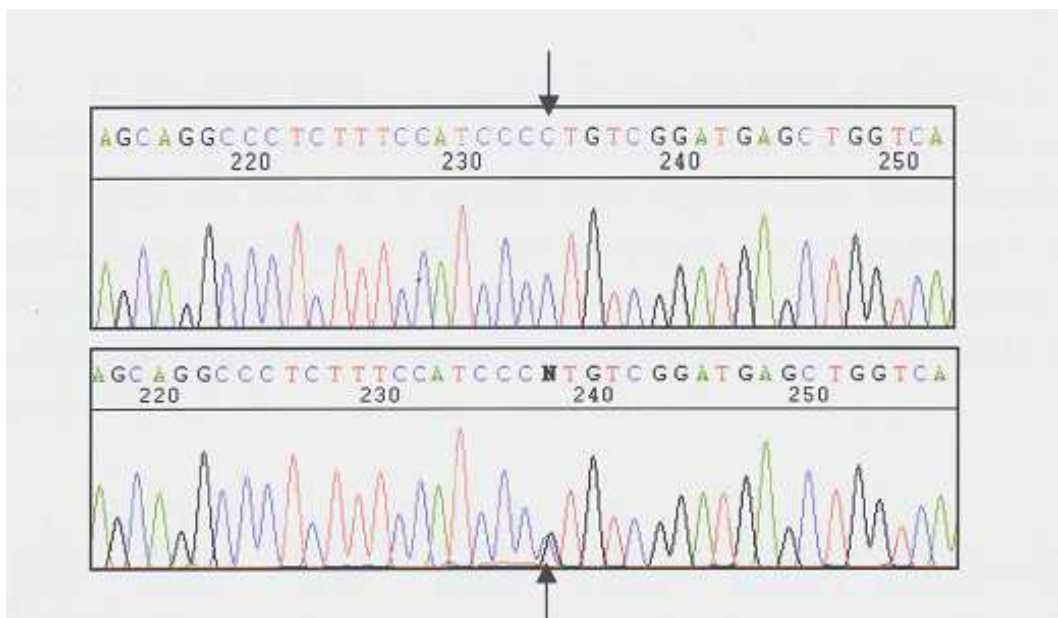
TAB. 2.8: Différentes étapes du cycle de la PCR, variant selon la température d'hybridation des amorces pour chaque exon

Température en °c	Temps	Cycles
96	5 min	X1
94	40 sec.	X40
57/55	40 sec.	
72	1 min.	
72	5 min.	X1
15	∞	

dient de température, sur un témoin "test" provenant de familles du CEPH, afin de vérifier si l'hybridation entre les amorces et l'ADN est spécifique et quelle est la température optimale. L'analyse des produits amplifiés déposés sur gel d'agarose à 2% permet de vérifier la taille des fragments obtenus et de contrôler l'amplification, en comparaison avec un témoin négatif (l'eau à la place de l'ADN) et un marqueur de taille (MXIV). S'il n'y a pas eu d'amplification ou amplification non spécifique, les amorces seront remplacées par d'autres plus performantes. Le protocole optimisé pour chaque exon est décrit dans les tableaux 2.6, 2.7 et 2.8. Après contrôle de l'amplification de l'ADN par dépôt sur gel d'agarose à 2%, une purification des produits de PCR doit être effectuée. Cette étape s'effectue en déposant chaque produit de PCR sur une colonne contenant du Bio-Gel P-100 Gel (Bio-Rad) et en les centrifugeant 4 minutes à 500g. Ceci permet d'obtenir une solution dépourvue de toute impureté comme les amorces, les dNTPs, l'enzyme. On obtient ainsi de l'ADN amplifié et purifié. La réaction de séquençage est effectuée selon le type de séquenceur utilisé dans un volume final de $15\mu\text{l}$ ($10\mu\text{l}$ dans le cas du séquenceur 3730) à partir de 1 à 2 ou $3\mu\text{l}$ de produit de PCR purifié (selon les résultats quantitatifs de l'amplification), $1\mu\text{l}$ de l'amorce sens ($5' \rightarrow 3'$) ou antisens ($3' \rightarrow 5'$) à 10 mM , selon le séquençage dans les sens $5' \rightarrow 3'$ ou le sens $3' \rightarrow 5'$, et $2\mu\text{l}$ ($1\mu\text{l}$) d'un mélange réactionnel de séquençage, le Big Dye (PE Biosystems, ABI prism). Il contient les ddNTPs, les dNTPs, le MgCl_2 , le tampon et la Taq polymérase. L'absence d'activité nucléasique permet d'obtenir des fragments de taille différente puisque les ddNTPs ne sont pas excisés par le système de réparation. Pour vérifier le bon fonctionnement des réactions de séquence, un témoin, est séquencé en même temps que les individus étudiés. Le témoin utilisé est le plasmide PGEM ($2\mu\text{l}$ à $0.2\mu\text{g}/\mu\text{l}$) séquencé à l'aide du primer M13 ($1\mu\text{l}$ à $0.8\text{ pmole}/\mu\text{l}$). Les conditions pour les réactions de séquence sont les suivantes : 96°C 5 min, 96°C 10 s, 55 ou 57°C 5 s et 60°C 4 min répété durant 25 cycles (20 cycles). Avant d'analyser les produits de la réaction de séquence sur le séquenceur, il est nécessaire de les purifier puis de les diluer. Cette purification se fait en déposant chacun de ces produits sur une colonne contenant du Sephadex G-50 Superfine (Amersham Pharmacia Biotech AB) et en les centrifugeant 2 minutes à 1100g. La dilution, permettant d'éviter un phénomène de saturation des pics lors de l'analyse, est effectuée en ajoutant $20\mu\text{l}$ d' H_2O pure au produit de séquence purifié. Les microplaques contenant les produits de séquences purifiés sont installées sur des séquenceurs à 96 capillaires, les 3700 ou 3730 DNA Analyser d'ABI-PRISM. Le traitement des résultats est réalisé par le programme GenalysWin [Takahashi et al., 2003]. Les résultats sont traduits en séquences sous forme d'une succession de pics des quatre couleurs représentant l'alternance des nucléotides au sein de la séquence (Figure 2.5). Les séquences obtenues sont comparées à la séquence de référence du gène HLA-C, extraite d'une base de données (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>).

FIG. 2.5: Exemple d'une séquence visualisée par Genalys

Un polymorphisme est indiqué par une flèche. Un individu est homozygote pour la variation (en haut) et un autre individu est hétérozygote (en bas).



Ce programme permet de présenter les résultats sous forme d'un tableau récapitulatif indiquant, pour chaque TagSNP d'intérêt, le génotype des 45 familles.

3.3 Génotypage par la méthode Taqman

3.3.1 Contexte

Contexte sur le locus HLA-C

Après confirmation de l'existence d'un locus majeur sur le chromosome 6p21 (*PSORS1*) dans notre étude de liaison sur les familles françaises, nous avons voulu montrer l'implication de manière indirecte de l'allèle *HLA-Cw6* dans le psoriasis par une étude d'association avec quatre TagSNPs (rs130076, rs130079, rs1576 et rs1062470) présents sur deux gènes *HCR* et *CDSN*, connus pour être en fort déséquilibre de liaison avec cet allèle du *HLA-C* [Asumalahti et al., 2002, Capon et al., 2004a].

Contexte sur le locus 20p

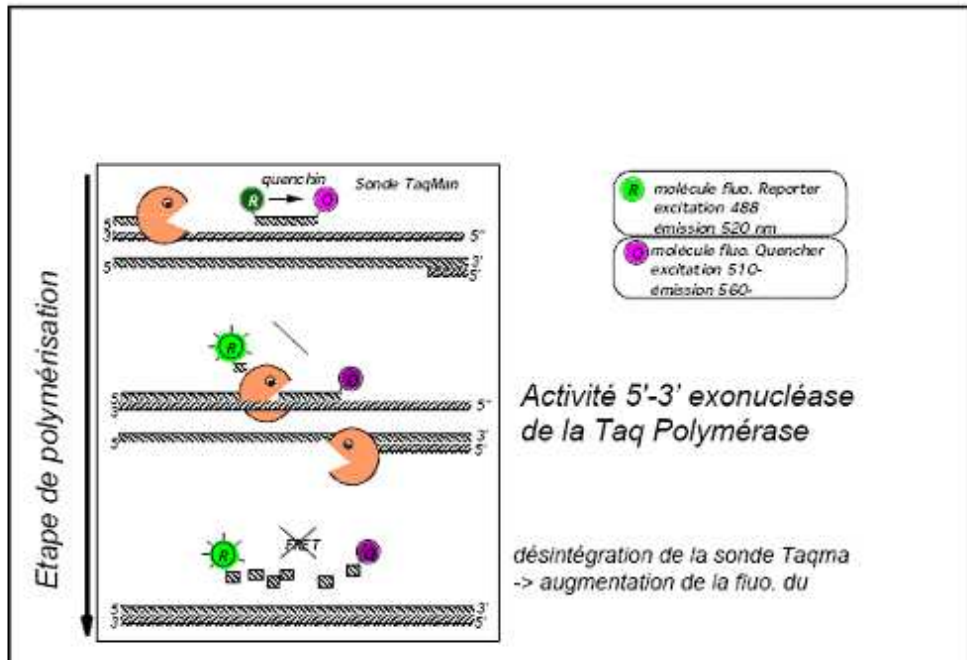
Premier criblage

Après la découverte d'un locus de prédisposition au psoriasis sur le chromosome 20p13 dans notre étude de liaison, nous avons réalisé une étude de cartographie fine de ce large locus de 17Mb sur nos 45 familles afin d'identifier le gène de prédisposition parmi les nombreux gènes de la région. Pour réaliser un premier criblage de l'intervalle avec un nombre limité de SNPs, les SNPs ont été sélectionnés en fonction de plusieurs critères : 1- ils sont identifiés dans la population d'origine européenne CEU du projet HapMap (30 trios résidents des États-Unis originaires de l'Europe du Nord et de l'Ouest, recueillis par le Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) ([Consortium, 2003]), [http : //www.hapmap.org/](http://www.hapmap.org/)), 2- ils doivent avoir une fréquence de l'allèle mineur supérieur (MAF) à 20% dans cette population d'origine européenne, 3- ils sont présents dans ou proches des gènes connus (+10kb en amont et en aval des gènes connus), 4- ils ont des séquences flanquantes non ambiguës. Au total, 85 SNPs, décrits dans le premier tableau supplémentaire de l'article, sont sélectionnés pour le premier criblage et ne sont pas en DL entre eux (1 SNP/137 kb en moyenne).

Deuxième criblage

Une étude plus approfondie de trois régions distinctes (*locus DEFB*, *locus ADAM33* et *locus AK125948*), dont proviennent 4 SNPs montrés associés dans le premier criblage, a été réalisée en majorité par une approche "TagSNPs". Cette stratégie a été utilisée lorsque la couverture du gène en SNPs est suffisante dans la base de données Hapmap car elle se base sur le DL au sein du gène pour choisir le minimum suffisant de SNPs spécifiques, nommés les "TagSNPs", pour représenter

FIG. 2.6: Représentation des étapes de polymérisation dans la technique TAQMAN (D'après le site : <http://www1.montpellier.inra.fr/biochimie/td/UB/TD/VMJ-taqman.pdf>)



toute la diversité haplotypique commune du gène [Consortium, 2005, de Bakker et al., 2005]. Ce fut le cas pour les gènes *SIGLEC1* (17 TagSNPs sélectionnés) et *AK125945* (5 TagSNPs sélectionnés). Pour ces deux gènes, deux SNPs communs absents dans la base de données HapMap (rs1018493 dans l'exon 6 de *SIGLEC1* et rs1060236, dans la région UTR de *AK125945*) ont été rajoutés dans l'analyse des 45 familles.

Lorsque la densité en SNPs connus par HapMap n'est pas suffisante au sein du gène candidat, ce qui est le cas pour le gène *ADAM33*, nous avons augmenté le nombre de SNPs à analyser en intégrant les SNPs validés dans la base de données dbSNP ou dans la littérature. Le gène *ADAM33* a été préalablement séquencé lors de plusieurs études et certains SNPs décrits n'existaient pas dans la base HapMap [Van Eerdewegh et al., 2002, Chae et al., 2003]. Ainsi, en plus des 8 TagSNPs de HapMap, 15 autres marqueurs ont été pris en compte lors de cette analyse. Parmi ces SNPs, 9 SNPs (rs3918392, rs511898, rs612709, rs3918396, rs44707, rs574174, rs628977, rs543749 et rs2787094) ont été montrés associés avec l'asthme [Van Eerdewegh et al., 2002]. Pour *GFR4*, peu de SNPs ont été identifiés et sélectionnés (4 SNPs), bien que la séquence codante entière du gène ait été re-séquencée [Cebrian et al., 2005]. En raison des faibles données dans les bases de données sur les gènes *DEFB125*, *DEFB126*, *DEFB127*, *DEFB128*, *DEFB129* et *DEFB32*, nous avons reséquencé la région codante et les jonctions exon/intron de ces gènes chez 58 témoins caucasiens indépendants. L'identification des TagSNPs au sein de ces gènes a été réalisée à partir du programme tagsnps [Stram, 2004].

Au total, 63 SNPs supplémentaires ont été analysés pour l'étude fine de la région.

3.3.2 Principe

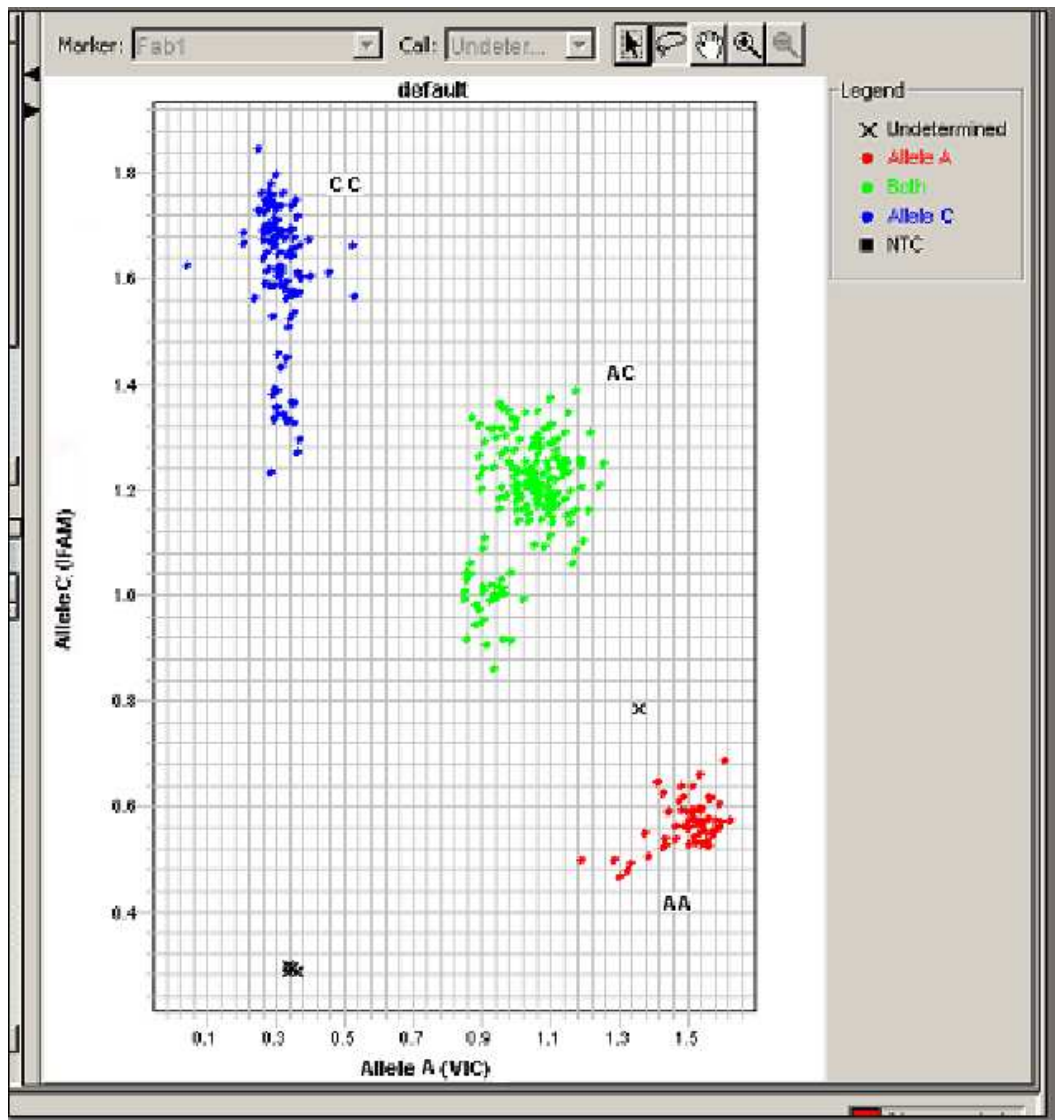
Le génotypage par Taqman repose sur deux principes (Figure 2.6) :

- sur une PCR qui utilise une sonde oligonucléotidique spécifique de la séquence à amplifier et marquée par deux fluorophores dont l'émission de l'un, nommé "le rapporteur", placé en 5' (comme les molécules VIC ou FAM), est "quenché" (atténué) par la proximité de l'autre en 3' dit "le quencher", dû au chevauchement de leur spectre d'émission pour l'un et d'excitation pour l'autre
- sur l'activité exonucléasique 5'→3' de la Taq Polymérase qui va permettre le clivage de la sonde et provoquera ainsi la libération du rapporteur, par une séparation physique, de l'effet du quencher, ce qui aura pour conséquence d'augmenter la fluorescence émise par le rapporteur (FAM ou VIC), détectable par la machine Taqman.

L'augmentation d'intensité du signal est proportionnelle à l'accumulation des produits de PCR.

FIG. 2.7: Représentation graphique des résultats du génotypage d'un SNP bi-allélique obtenu par Taqman

Les trois nuages de points correspondent respectivement (de gauche à droite et de haut en bas) à l'homozygotie d'un premier allèle, l'hétérozygotie des allèles et l'homozygotie du deuxième allèle.



3.3.3 Technique

Cette technique a été réalisée sur des plaques de 384 puits. En raison des imprécisions lors de la manipulation de petits volumes, le robot TAP (*The Automation Partnership*) a été utilisé pour répartir, de manière organisée, l'ADN des individus ($1 \mu\text{l}$ à $10\text{ng}/\mu\text{l}$) dans 3 plaques de 384 puits ainsi que pour distribuer le mélange réactionnel. Une plaque "test" regroupe également une douzaine d'individus pris au hasard par plaque de 384 puits, des "doublons", servant de contrôle de qualité du génotypage. Chaque plaque contient de plus une moyenne de 4 témoins négatifs (sans ADN).

Pour chaque SNP, les amorces et les sondes ont été désignés ("Assays-by-Design") et fournis par le service ABI (Applied Biosystems). La réaction est réalisée dans un volume final de $5 \mu\text{l}$ à partir de 10 ng d'ADN, $2.5 \mu\text{l}$ de "master mix taqman UNG" (2X), $0.075 \mu\text{l}$ de "Assay mix" (40X). Les conditions pour les réactions d'amplification par PCR sur les thermocycleurs Dual 96-Well GeneAmp PCR system 9700 sont les suivantes : 92°C 10 min, puis 92°C 15 s, 60 ou 54°C (varie selon la qualité du génotypage) 1 min répétée durant 50 cycles (varie selon la qualité du génotypage final) et 15°C infini. Les conditions restent spécifiques du SNP étudié et sont choisies en fonction des meilleures conditions obtenues après des tests sur 32 individus du panel du CEPH.

La collecte des signaux de fluorescence suivie du traitement des résultats, obtenus sur ABI PRISM 7900 HT, est réalisée par le logiciel SDS Sequence Detector Software (SDSv2.0, Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Ce programme permet, à partir des proportions calculées de la fluorescence émise par chaque rapporteur (FAM et VIC) spécifique d'un allèle du marqueur étudié, de représenter les génotypes de l'ensemble des individus sous forme de 3 nuages de points représentant tous les génotypes possibles pour un SNP biallélique : les individus homozygotes pour l'allèle X (X/X) (émission d'un seul fluorophore), les individus hétérozygotes pour l'allèle X et Y (X/Y) (émission des deux fluorophores) et les individus homozygotes pour l'allèle Y (Y/Y), Figure 2.7.

3.4 Génotypage par la méthode SNPlex

3.4.1 Contexte sur les gènes candidats

La stratégie "gènes candidats" consiste à étudier des gènes dont la fonction pourrait être impliqué dans l'étiologie de la maladie. Les gènes candidats évidents pour une maladie auto-immune et inflammatoire telle que le psoriasis sont les gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire et de l'inflammation. De plus, le psoriasis étant une maladie de peau, cela inclut un rôle particulier des kératinocytes. Les autres candidats potentiels sont les gènes intervenant dans la survie, la prolifération et la différenciation des kératinocytes mais également intervenant de manière générale dans la structure de la peau.

L'observation d'une physiopathologie commune entre diverses maladies et celle d'une forte agrégation des maladies dans certaines familles suggère fortement l'existence de mécanismes communs, impliquant entre autres des facteurs génétiques. Ceci fut d'ailleurs constaté avec l'identification de loci communs à plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires. Ainsi, 22 gènes (*PTPN22*, *CARD15*, *CYLD*, *FLG*, *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *SLC12A8*, *SLC22A4*, *SLC22A5*, *NAT9*, *SLC9A3R1*, *raptor*, *IL12RB1*, *TGM1*, *TGM3*, *TGM5*, *TGM6*, *JUN*, *JUNB* et *STAT3*) ont été sélectionnés en fonction de leur rôle dans les processus métaboliques de l'immunité ou de la peau ainsi qu'en fonction de l'existence de leur association avec d'autres maladies auto-immunes ou d'autres maladies de la peau incluant le psoriasis.

L'implication d'un gène commun dans différentes maladies ne signifie pas l'existence d'un même variant causal ; une approche systémique "Tagging SNP" a été entreprise pour tester tous les gènes éventuellement en cause. Comme précédemment décrit, cette approche utilise l'information d'un minimum de SNPs qui sont représentatifs de la diversité allélique dans la région du gène, nommé "Tag-SNPs". Le choix de ces SNPs "représentatifs" dépend du niveau de déséquilibre de liaison (DL) entre les polymorphismes de la région étudiée (ou "structure DL"). Pour sélectionner les "TagSNPs", nous avons procédé de différentes manières qui ont dépendu de la disponibilité de données génétiques sur les SNPs présents dans les différents gènes et de la procédure technique employée à ce moment-là. Pour la plupart des gènes, les SNPs sont identifiés dans la base de données HapMap et choisis selon les critères suivants :1- ils doivent être "validés" dans la base HapMap ([Consortium, 2005]) -2 ils doivent être des polymorphismes bi-alléliques dans la population caucasienne (CEU) répertoriés dans cette base (précédemment décrite) et ils doivent avoir aussi des séquences flanquantes non ambiguës pour des raisons techniques dues aux méthodes de génotypage employées (Taqman et SNPlex),-3 ils doivent avoir une fréquence de l'allèle mineur (MAF) supérieure ou égale à 5% dans la population caucasienne (CEU). Le choix de ce seuil reste indicatif. Afin d'identifier une association entre le SNP et la maladie, il est nécessaire de choisir des SNPs assez communs dans la population générale pour obtenir une puissance d'analyse suffisante. Si le SNP est trop rare, la plupart des individus étudiés seront homozygotes pour ce marqueur, et par conséquent, il sera difficile d'avoir suffisamment de familles nucléaires informatives pour une étude de type TDT qui repose sur la transmission d'allèles d'un parent hétérozygote à son enfant atteint, -4 ils doivent être présents dans le gène candidat lui-même (c'est le cas pour les gènes : *PTPN22*, *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *SLC12A8*, *SLC22A5*, *TGM1*, *TGM3*, *TGM5*, *TGM6* et *CARD15*) ou présents autour et dans le gène (par exemple, +10 kb en amont et aval des gènes *JUN*, *JUNB* et *STAT3*, ou +

20 kb pour les gènes *CYLD* et *FLG*).

Après cette première sélection, nous avons limité au minimum le nombre de SNPs à génotyper en tenant compte, par gène, du déséquilibre de liaison entre les SNPs pris deux à deux. Lorsque la couverture du gène en SNPs est suffisante dans la base de données Hapmap, nous avons sélectionné, par le programme Haploview, les SNPs représentatifs de la variation allélique commune ($MAF \geq 0.05$) en se basant sur la présence d'un fort DL entre deux variants pour un $r^2 > 0.8$ [de Bakker et al., 2005]. Les données HapMap sont disponibles *via* <http://www.hapmap.org> (provenant de Janvier 2007 pour *FLG* et *CYLD*, Octobre 2005 pour *JUN*, *JUNB* et *Stat3* et enfin, Juin 2005 pour les autres gènes).

Dans le cas d'une couverture insuffisante du gène, la densité de marqueur est augmentée en ajoutant dans l'analyse des SNPs validés dans les populations caucasiennes provenant d'autres bases de données comme dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) et Perlegen (<http://genome.perlegen.com/>).

En parallèle, nous avons incorporé les SNPs montrés associés avec des maladies auto-immunes ou des maladies de la peau. C'est le cas de *PTPN22* où un SNP fonctionnel (rs2476601) a été trouvé associé avec différentes maladies auto-immunes comme le diabète de type 1, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique (méta-analyse [Lee et al., 2007]). Pour le gène de la filagrine (*FLG*), trois mutations à type de "perte de fonction" R501X, 2282del4, et 3702delG sont associées avec la dermatite atopique, l'asthme associé avec l'eczéma et l'ichtyose vulgaire dans plusieurs populations européennes [Palmer et al., 2006, Palmer et al., 2007, Sandilands et al., 2006, Smith et al., 2006]. Pour le gène *IL1A*, le SNP rs1800587 confère une prédisposition à la spondylarthrite ankylosante [Wu and Gu, 2007]. Pour le gène *SLC12A8*, 5 SNPs (rs651630, rs9831295, rs9813946, rs28986275 (ss35527511), rs28986277 (ss35527513)) sont montrés fortement associés avec le psoriasis dans une population allemande [Huffmeier et al., 2005a]. Pour le gène *CARD15*, 3 SNPs (SNP 8 (rs2066844), SNP12 (rs2066845), SNP13 (rs2066847)) prédisposent à la maladie de Crohn et également (pour un) à l'arthrite psoriasique (PsA) [Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001, Rahman et al., 2003]. Trois autres SNPs ont été associés avec une augmentation du risque de développer l'asthme (rs3135500) ou avec une diminution du risque de développer l'asthme (rs1077861) ou la rhino-conjonctivite allergique (rs2076752) [Weidinger et al., 2005].

Pour 4 des gènes candidats (*SLC22A4*, *SLC9A3R1/NAT9*, *raptor*, *IL12RB1*), nous avons répliqué les SNPs étudiés dans des études d'association réalisées sur des maladies auto-immunes. Pour *SLC22A4*, 5 SNPs (individuellement (rs3792876)

et sous forme d'un haplotype (rs3763112, rs1007602, rs2073838, rs2269822)) sont associés avec la polyarthrite rhumatoïde dans une population japonaise [Tokuhira et al., 2003]. En plus, deux SNPs (rs1050152, rs2631367), présents à l'intérieur du gène *SLC22A4* et l'autre dans le promoteur du gène *SLC22A5* ont été intégrés dans cette étude car ils forment un haplotype associé avec la maladie de Crohn [Peltekova et al., 2004]. Pour la région *SLC9A3R1/NAT9*, 5 SNPs (rs7420, rs734232, rs895691, rs12797 et rs2305214), et trois autres SNPs (rs1564864, rs2019154, rs869190) présents au niveau du gène *RAPTOR*, ont été sélectionnés pour leurs associations avec le psoriasis [Helms et al., 2003]. Pour le gène *IL12RB1*, nous avons intégré directement les 8 TagSNPs (rs404733, rs383483, rs17882636, rs375947, rs11086087, rs2305743, rs436857, rs393548) décrits dont deux sont associés dans une précédente étude de prédisposition à la dermatite atopique [Takahashi et al., 2005].

Les provenances des 153 SNPs choisis pour être génotypés dans le Lot I sont indiquées dans les tableaux du chapitre 3 (Analyse d'association : Etude de gènes candidats).

3.4.2 Principe

Principe général

Le système de génotypage par Snplex utilise la technique OLA (ligation d'oligonucléotide) combinée avec la technologie de PCR multiplex pour permettre l'amplification simultanée des séquences cibles et ainsi, la discrimination allélique de 48 SNPs sur un même échantillon.

Ce génotypage complexe se fait grâce à un ensemble de 3 sondes spécifiques aux SNPs, qui donne la spécificité du génotypage, d'amorces dites "linkers" universelles permettant l'amplification universelle de nombreuses séquences cibles, et de sondes "ZipChutes" qui aident à l'identification des différents allèles des SNPs étudiés.

Principe détaillé

Pour chaque SNP à génotyper, 3 sondes spécifiques aux SNPs sont nécessaires pour la spécificité de la réaction SNplex. Les 2 premières sondes sont des oligonucléotides spécifiques des allèles du SNP, dites "ASOs", désignées pour avoir le nucléotide discriminant en 3'. Chaque sonde "ASO" contient une des 96 séquences uniques dites "ZipCode" qui permettra par la suite la liaison avec la sonde "Zip-Chute". La troisième sonde est un oligonucléotide spécifique au locus ("LSO"). La séquence de cette sonde qui est commune aux deux allèles du locus donné et se fixe donc du côté adjacent du site SNP. Ainsi, pour l'étude de 48 SNPs, il est nécessaire d'avoir 96 sondes "ASO" (2 pour chaque allèle des SNPs) avec 96 séquences "ZipCodes" différentes et 48 sondes "LSO".

Pour permettre une amplification universelle de l'ensemble de ces SNPs, un jeu

d'amorces universelles d'"ASO/LSO", appelé "linkers" est utilisé. Un "linker spécifique à chaque ASO" contenant une séquence "ZipCode" partielle permet une liaison avec celle de chaque sonde "ASO" et une séquence complémentaire à l'"amorce PCR sens" universelle (séquence UA). Le deuxième jeu de "linker" est le "linker LSO" qui se lie au "LSO" par une séquence compatible avec les différents "LSOs". Ce "linker" contient aussi une séquence complémentaire à une amorce anti-sens universelle.

Lorsque l'ensemble des sondes "ASO /LSO" et les "linkers" respectifs sont liés et fixés aux différents sites des SNPs, les séquences complémentaires aux amorces PCR, présentes sur les linkers, permettent l'amplification par PCR des régions spécifiques contenant les 48 SNPs cibles. L'ensemble de ces amplicons obtenus par PCR est ensuite révélé grâce à des sondes rapportrices, les "ZipChutes". Cette sonde clé possède une séquence se liant sur la séquence simple brin du "ZipCode". Des modificateurs de mobilité différents selon les sondes "ZipChutes" permettent la séparation par taille durant l'électrophorèse et enfin un marqueur fluorescent pour la détection du fragment.

Ayant la même couleur pour chaque allèle par SNP, la méthode utilise à la fois la taille et la couleur des sondes "ZipChutes" pour identifier les différents allèles des SNPs.

3.4.3 Technique

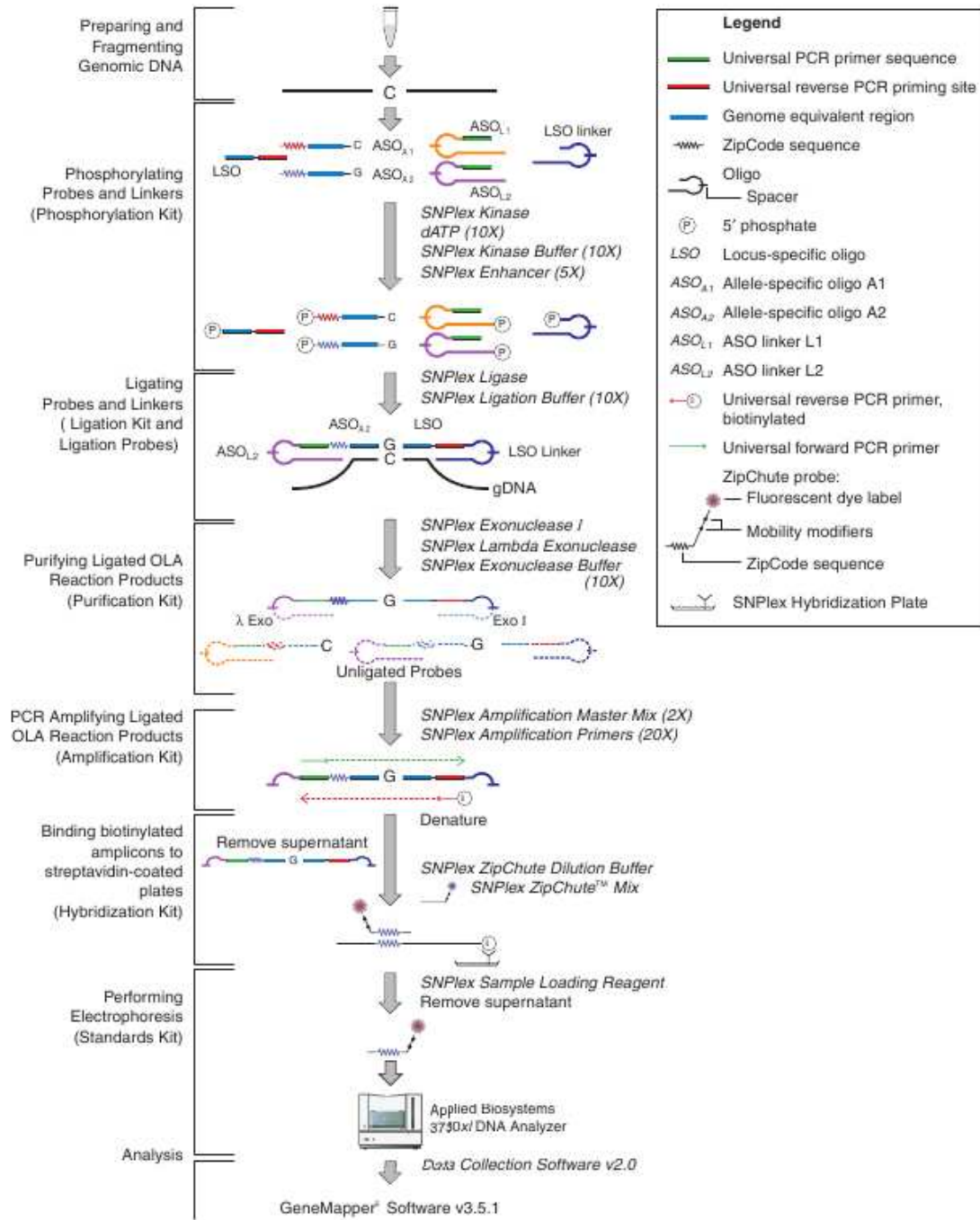
La plupart du génotypage des SNPs étudiés a été réalisée en utilisant la technique SNPlexTM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Deux panels ont été ainsi effectués pour le génotypage de 93 SNPs. Le génotypage des SNPs des gènes *FLG*, *CYLD*, *SLC9A3R1*, *NAT9*, *raptor*, *IL12RB1*, *TGM3* et *TGM6*, ainsi que celui d'une vingtaine de SNPs non possibles par la méthode SNPlex ont été réalisés par la technique Taqman®.

Le choix de la combinaison optimale des 48 SNPs, pour être dans les meilleures conditions pour la réaction multiplex, ainsi que l'ensemble des sondes SNPlex spécifiques des SNPs des deux panels (93 SNPs) ont été déterminés et obtenus par le service en ligne "online SNP selection" de Applied Biosystems (<http://m-science.appliedbiosystems.com>). Dans cette technique, le génotypage est réalisé à partir de 50 ng d'ADN fragmenté et séché dans des plaques 384, en suivant les instructions du fournisseur Applied Biosystems. Cette technique SNPlex se fait en plusieurs étapes, résumées sur la figure 2.8 :

- La **première étape** est l'étape de préparation des ADN (mise en plaques 384, fragmentation, dilution). Pour chaque plaque de 96 puits de départ, nous utilisons deux ADN CEPH comme témoins positifs, un témoin négatif

FIG. 2.8: **Résumé des différentes étapes de la méthode SNPLex**

(D'après le site : http://www.rockefeller.edu/genomics/pdf/Applied_Biosystems_SNPLex_Genotyping_Manual.pdf)



- (l'eau) et deux puits vides (G12, H12) qui seront utilisés lors du SNPlex pour les marqueurs de calibration des sondes "ZipChute".
- La **deuxième étape** consiste à préparer les différentes sondes (96 "ASO"/48 "LSO") et les linkers (96 "ASO"/ 1 "LSO") en les phosphorylant en 5' pour l'étape dite réaction "OLA".
 - La **troisième étape** est de rassembler l'ensemble des sondes activées et l'ADN et de permettre la liaison ciblée des sondes sur celui-ci par une ligase. C'est la réaction "OLA".
 - La **quatrième étape** est de purifier les échantillons en enlevant les produits non liés lors de l'étape de ligation en utilisant deux exonucléases (Exonucléase I et Lambda).
 - La **cinquième étape** est d'amplifier, de façon globale grâce à des amorces universelles, l'ensemble des produits obtenus et purifiés lors de la réaction "OLA". Cette amplification par PCR est rendue possible, par la présence sur les linkers, des deux "ASO" et de "LSO" de séquences complémentaires aux amorces sens et anti-sens universelles, respectivement, utilisées pour amplifier tous les produits obtenus lors de la réaction OLA. L'amorce anti-sens universelle a une particularité, elle est biotinylée, entraînant ainsi une forte affinité pour la streptavidine. Les produits obtenus lors de cette PCR seront donc des amplicons double-brins avec un brin biotinylé.
 - La **dernière étape** est nécessaire pour obtenir les sondes ZipChute dans la plaque à charger. Après fixation des fragments double-brins biotinylés à la streptavidine dans les puits d'une plaque dite "d'hybridation", un lavage aide à enlever le matériel non fixé. Une dénaturation permet de garder un seul brin, celui biotinylé et fixé à la streptavidine. Ceci favorise ainsi la fixation des sondes "ZipChutes" fluorescentes sur la partie "ZipCode" du fragment simple brin biotinylé par complémentarité. Le relargage des sondes "ZipChutes" est ensuite réalisé dans une solution dite de chargement, utilisée pour établir une courbe de calibration de la taille grâce à 11 marqueurs fluorescents afin de pouvoir identifier les différentes sondes "ZipChute". Elles sont enfin chargées dans la machine ABI PRISM[®] 3730XL DNA Analyzer, puis traitées et analysées, grâce au programme d'analyse "GeneMapper", pour avoir le génotype des 48 SNPs par individu (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tous les étapes possèdent une étape de lavage des canules ainsi que l'utilisation de différentes solutions (l'eau milliQ, UNG (uracyl-N-Glycosylase)) dans différentes salles (pré ou post-PCR) afin d'éviter toute contamination.

3.5 Contrôle qualité général

En plus de la vérification des résultats obtenus pour les témoins positifs et négatifs au préalable, l'équilibre de Hardy-Weinberg est vérifié pour chaque SNP

analysé sur 174 individus non apparentés et sur les individus "fondateurs" sains, grâce au programme PEDSTATS [Wigginton and Abecasis, 2005]. Le modèle théorique de Hardy-Weinberg montre que la diversité génétique de la population se maintient après quelques générations et doit tendre vers un équilibre stable de la distribution génotypique sous certaines conditions : 1- la population doit être suffisamment grande pour minimiser les effets de la dérive génétique, 2- la population est panmictique, c'est-à-dire que les unions se font de manière aléatoire, 3- il n'y a pas de mutation, de migration de population pour éviter les pertes ou les gains d'allèles. Dans le cas d'un marqueur à deux allèles A et a avec des fréquences alléliques respectives p et q, les fréquences génotypiques attendues si la population est en équilibre de Hardy-Weinberg sont fonction des fréquences alléliques : $f(A/A) = p^2$, $f(A/a) = 2pq$, $f(a/a) = q^2$. Ces fréquences théoriques pour un SNP donné sont comparées à celles observées dans notre échantillon par un test de χ^2 (1ddl) de conformité afin de vérifier que l'équilibre de Hardy-Weinberg est bien respecté dans les populations testées saines. Si une déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg est observée ($p < 0.05$), cela signifie, si les conditions précédentes sont respectées, qu'il existe un problème technique sur la qualité du génotypage. De manière générale, pour tous les gènes étudiés, les SNPs, dont les fréquences génotypiques montrent une déviation significative de l'équilibre Hardy-Weinberg, ont été retirés de l'analyse. Ils sont indiqués en caractères gras dans les tableaux présentés au cours du chapitre "gènes candidats".

Les erreurs possibles de transmission mendélienne pour chaque marqueur sont contrôlées par le programme FBAT (*Family Based Association Test*), décrit dans la praragraphe suivant [Spielman et al., 1993].

3.6 Méthodes des analyses d'association

3.6.1 Test d'association basé sur les familles : FBAT (*Family-based association test*)

La majorité de nos analyses d'association dans les familles ont été réalisées par le test FBAT [Laird et al., 2000]. C'est un test du déséquilibre de transmission (TDT), développé par Spielman et ses collaborateurs (1993), dans lequel les allèles transmis par des parents hétérozygotes aux descendants atteints sont comparées avec la distribution attendue des allèles parmi les descendants. La statistique générale du test FBAT, nommée U , est donc basée sur une combinaison linéaire des génotypes et des traits des descendants d'une famille :

$$U = S - E[S], S = \sum_{ij} T_{ij} X_{ij}$$

où X_{ij} signifie une fonction du génotype du descendant j de la famille i au locus étudié et T_{ij} signifie une fonction du trait phénotypique du descendant j de la famille i .

Le choix standard est $T_{ij} = 1$ pour les sujets atteints et $T_{ij} = 0$ pour les sujets

non atteints (dans le cas d'un trait dichotomique). La variance est $V = Var(S)$. La forme du test dépend de la codification choisie pour X . Si X est un scalaire, le test est de la forme : $Z = U/\sqrt{V}$. Sous H_0 , la statistique Z obéit approximativement à une loi normale centrée réduite. Mentionnons qu'en élevant Z au carré, sa distribution peut alors être approximée par une loi du χ^2 à un degré de liberté. Si X est un vecteur, on opte pour un test de la forme suivante : $\chi^2 = U'V^{-1}U$. Sous H_0 , la statistique χ^2 obéit approximativement à une loi du χ^2 à v degrés de liberté, où v représente le rang de V . Ce test basé sur les familles permet, comme décrit dans le chapitre Introduction, d'éviter les biais dus entre autres à la stratification de la population [Lazzeroni and Lange, 1998, Rabinowitz and Laird, 2000].

De plus, il permet de tester l'association sous deux hypothèses nulles qui sont "non association et non liaison" ou "non association en présence de liaison" (option -e du programme) [Laird et al., 2000]. La première hypothèse a été utilisée pour tester l'association avec les gènes candidats alors que la deuxième a été utilisée pour tester l'association avec les gènes sur les chromosomes 6 et 20, dû à l'existence d'une liaison entre ces régions et la maladie dans nos familles. Dans l'étude des gènes candidats, l'hypothèse nulle "non association et non liaison" est testée car il n'existe aucune preuve de liaison entre les régions étudiées et la maladie dans nos 45 familles françaises [Lesueur et al., 2007a]. Mais contrairement au cas de la deuxième hypothèse, la première entraîne le traitement indépendant des familles nucléaires, qui sont le produit de la décomposition des familles multiplexes.

Le test peut être réalisé selon différents modèles mais le modèle additif, utilisé dans nos études, reste le modèle le plus puissant quel que soit le réel modèle génétique de la maladie [Knapp, 1999, Tu et al., 2000, Horvath et al., 2001]. Il permet aussi d'étudier l'association entre la maladie et des SNPs soit individuellement, soit sous forme d'haplotypes, dans des familles complexes et plus larges que les trios, même dans le cas de génotypes parentaux incomplets [Lange and Laird, 2002]. Il fournit également l'estimation des fréquences alléliques pour chaque marqueur en utilisant les données de génotypage des individus fondateurs des familles (nucléaires ou non). Dans la majorité des cas, les fréquences alléliques de chaque SNP sont proches de celles décrites dans la population CEU du panel HapMap.

Dans le cas des tests d'association sur les gènes candidats, les résultats suggestifs sont déterminés par une valeur de P limite, choisi à $P=0.08$ pour le premier criblage dans le lot I. En effet, ce seuil est élevé et augmente donc le risque d'obtenir un nombre élevé de faux positifs. Cependant, pour limiter cette dérive, les associations préliminaires sont tentées d'être confirmées par, tout d'abord, une réplification méthodologique, en utilisant une méthode "LNMs" (décrite ultérieurement) puis, une réplification dans un autre lot (Lot 2). Dans toutes les autres analyses, le seuil limite est de $P=0.05$. La correction de Bonferroni pourrait être appliquée mais cette correction pour les tests multiples est trop conservative pour

ce type d'étude, spécialement quand les SNPs dans les régions candidates sont partiellement corrélés. De plus, les maladies complexes étant les résultantes d'interactions de facteurs environnementaux avec de multiples gènes, qui sont souvent des gènes à effet faible, l'utilisation d'une correction trop conservatrice pourrait gêner leur identification.

Les analyses sur les haplotypes, constitués de plusieurs SNPs, ont été réalisées en utilisant la fonction HBAT (*Haplotype Based Association Test*) de FBAT dans les mêmes conditions que pour l'analyse de chaque SNP. Ce test est basé sur l'absence de recombinaison entre les marqueurs qui forment l'haplotype à étudier. Ainsi, la reconstruction des haplotypes est plus facile avec des échantillons familiaux car les haplotypes seront déterminés dans la plupart des cas sans ambiguïté. Cependant, dans le cas où les haplotypes sont difficilement identifiables (cas de données manquantes), ils sont obtenus grâce à l'algorithme EM (*Expectation Maximization*) [Horvath et al., 2004]. Ceci permet d'identifier une association possible soit avec un marqueur non étudié, mais en déséquilibre de liaison avec un SNP ou une combinaison de SNPs testés, soit avec une combinaison de SNPs. Dans certains cas (*ADAM33*, *CARD15*, *CYLD*, *SLC12A8*, *FLG* et *STAT3*), en raison du nombre élevé de TagSNPs choisis à cause d'un faible niveau de déséquilibre de liaison entre les polymorphismes des gènes en question, le test d'association des nombreux haplotypes qui sont générés à partir des TagSNPs sélectionnés est difficilement réalisable. Nous avons donc décidé de tester la transmission préférentielle aux individus atteints de toutes les combinaisons de 2 ou 3 SNPs possibles. Si une association avec un des haplotypes est observée, un test de permutations est réalisé. La valeur exacte de P du Z est calculée *via* la méthode de Monte-Carlo pour 1.000.000 de permutations pour chaque haplotype séparément (nommé "1 000 000 permutations P") et pour le test global (nommé "1 000 000 permutations P_{Tot}") dans l'hypothèse d'une non liaison et non association (option -p).

3.6.2 Test d'association basé sur les modèles logistiques à effets mixtes (LNMs : *Logistic-Normal Models*)

Afin de confirmer nos données obtenues par FBAT, nous avons utilisé une autre méthode qui applique les modèles logistiques normales, aussi appelé "LNMs" pour des études d'association basées sur les populations, permettant l'étude de familles de différentes tailles [Xu and Shete, 2007]. En effet, contrairement à FBAT, cette méthode permet de prendre en compte toutes les structures familiales, complexes ou non complexes, sans les décomposer en familles nucléaires (en incluant les individus atteints et non atteints), c'est-à-dire en tenant compte des corrélations entre les membres de la famille. Le partage IBD des allèles influence l'erreur de type I et peut amener à des résultats faux positifs [Newman et al., 2001]. Chaque

famille définit un groupe et la corrélation entre les membres de la famille est expliquée par l'introduction

d'un effet aléatoire correspondant. Cette méthode assume donc une hétérogénéité normale à travers des familles dues à IBD ou au partage d'environnement. Si y_{it} signifie le sujet t dans la famille i avec $t = 1, \dots, T_i$ variant selon le nombre de sujets par famille. La valeur Y_{it} est égale à 0 (si le sujet est sain) ou 1 (si le sujet est malade). Ainsi x_{it} est un vecteur de valeurs de variables explicatives, pour des paramètres du modèle à effet fixe, b . Notons u_i pour l'effet aléatoire univariable pour le groupe i . Notons A pour l'allèle majeur, l'allèle de référence et a l'allèle mineur. Le test peut être réalisé selon différents modèles mais dans notre étude, le modèle additif est appliqué. Ainsi, x_{it} est égale à 0 pour le génotype aa , 1 pour le génotype Aa et 2 pour le génotype AA . La forme LNM est :

$$\log_{it}(P(Y_{it} = 1|u_i)) = x'_{it}b + u_i$$

où $\{u_i\}$ sont indépendants des variables aléatoires $N(0, \sigma^2)$. En incluant seulement l'effet aléatoire u_i et en gardant l'effet du locus à risque fixé, nous supposons qu'une probabilité spécifique d'être atteint existe dans chaque famille mais que l'effet de ce locus est identique à travers les familles. L'interprétation des paramètres est analogue au modèle de régression logistique standard. Le coefficient de régression transformé $\exp(x_{it}b)$ est un rapport de chance d'être affecté pour des individus avec un génotype (Aa ou aa) comparé aux individus avec un génotype le plus fréquent (AA) comme le référent au locus à risque. La variance σ^2 mesure le degré d'hétérogénéité de la probabilité d'être affecté qui ne peut pas être expliquée par le locus à risque. Ce test est réalisé à partir du logiciel R.

Cette approche a été utilisée pour confirmer les associations trouvées suggestives entre la maladie et certains SNPs de quelques gènes candidats. Elle a été préalablement validée pour son utilisation dans notre étude par l'identification d'une forte association avec le locus majeur du psoriasis, *PSORS1* (Tableau 3.2).

3.6.3 Analyse après stratification des familles selon le locus *PSORS1*

L'association entre le psoriasis et le gène candidat est également testée en prenant en compte des porteurs ou non du facteur génétique majeur de risque du psoriasis, l'allèle HLA-*Cw6* (*PSORS1*), dans le premier lot de familles. Cette analyse permet de conclure si l'association observée lors de la première analyse est indépendante ou non du locus majeur *PSORS1* et permet aussi d'identifier de nouvelles associations dans un des deux sous-groupes stratifiés selon l'allèle à risque HLA-*Cw6*. Pour cela, nous avons testé, par le programme FBAT, les SNPs en stratifiant nos familles selon un haplotype à risque formé par 4 SNPs (nommés HCR-325 C>T (rs130076), HCR-1723 G>T (rs130079), HCR-2327 C>G (rs1576) et CDSN971 C>T (rs1062470)), connu pour être en déséquilibre de liaison avec l'allèle à risque HLA-*Cw6* [Asumalahti et al., 2002, Capon et al., 2004a]. La reconstruction des haplotypes avec ces 4 marqueurs pour chaque individu de nos

familles a été réalisée par le programme MERLIN [Abecasis et al., 2002]. La stratification de ces familles a été faite selon la présence ou l'absence de cet haplotype à risque, c'est-à-dire, par deux analyses : dans la première, seuls les individus atteints portant l'haplotype HLA-*Cw6* sont pris en compte, et dans la seconde, seulement les individus atteints ne portant pas l'haplotype à risque sont étudiés.

Chapitre 3

RESULTATS ET DISCUSSION

1 ANALYSE DE LIAISON : IDENTIFICATION DE LOCI

1.1 Première étude : Présentation de l'article 1 : Confirmation de deux loci de prédisposition au psoriasis sur les chromosomes 6p21 et 20p13 dans les familles françaises

1.1.1 Introduction

Comme détaillé précédemment, une des premières étapes lors de l'étude d'une "maladie complexe" est d'identifier, par l'analyse de nombreux marqueurs (microsatellites ou SNPs) répartis régulièrement au sein du génome, les régions chromosomiques contenant les gènes potentiellement impliqués dans l'apparition de la maladie.

Dans le cas du psoriasis, diverses études de liaison et d'association ont été réalisées au cours de ces dix dernières années, sur des populations différentes (des familles ou des cas isolés) atteintes de psoriasis et de nombreuses régions ont été suggérées comme étant des loci de prédisposition à cette "maladie complexe" (Tableau 1.10). Néanmoins, peu de ces régions ont pu être confirmées dans une seconde étude indépendante. Seule la liaison entre le locus du chromosome 6p21 au niveau de la région HLA, appelé *PSORS1*, et le psoriasis a été confirmée dans de nombreuses populations de manière significative. Notre équipe s'est intéressée à la prédisposition génétique au psoriasis dans une population encore peu analysée, la population française. Une campagne médiatique de 5 ans a permis de collecter de nombreuses familles françaises atteintes de psoriasis [Mahe et al., 2002]. Parmi ces familles, certaines comportent au moins 8 individus atteints de psoriasis et s'étendent parfois sur 3 générations ou plus. Afin d'identifier les loci de prédisposition au psoriasis dans cette population, un balayage du génome avec 260 microsatellites (~1 marqueur tous les 15 cM) a d'abord été réalisé sur 14

d'entre elles. La densité en microsatellites a été augmentée dans 14 régions candidates déjà rapportées dans la littérature. Lorsqu'une liaison suggestive entre une région et la maladie a été obtenue dans ce premier groupe de familles ($P < 0.01$), le locus d'intérêt a été analysé dans un deuxième groupe de 32 autres grandes familles. L'ensemble des familles étudiées ont une structure familiale et des caractéristiques cliniques similaires, permettant ainsi l'homogénéité de l'étude. De plus, les familles sont également homogènes sur le plan phénotypique puisque la majorité des patients (96%) est atteinte de psoriasis en plaques.

Confirmation of Psoriasis Susceptibility Loci on Chromosome 6p21 and 20p13 in French Families

Fabienne Lesueur¹, Caroline Lefèvre¹, Cristina Has¹, Michel Guilloud-Bataille^{2,3}, Tiphaine Oudot¹, Emmanuel Mahé⁴, Morad Lahfa⁴, Samira Mansouri⁴, Haydeh Mosharraf-Olmolk⁴, Eric Sobel⁵, Simon Heath¹, Mark Lathrop¹, Marie-Hélène Dizier^{2,3}, Jean-François Prud'homme⁴ and Judith Fischer¹

Plaque psoriasis is a chronic inflammatory disorder of the skin. It is inherited as a multifactorial trait, with a strong genetic component. Linkage studies have identified a large number of disease loci, but very few could be replicated in independent family sets. In this study, we present the results of a genome-wide scan carried out in 14 French extended families. Candidate regions were then tested in a second set of 32 families. Analysis of the pooled samples confirmed linkage to chromosomes 6p21 (Z_{MLB} score = 3.5, $P = 0.0002$) and 20p13 (Z_{MLB} score = 2.9, $P = 0.002$), although there was little contribution of the second family set to the 20p13 linkage signal. Moreover, we identified four additional loci potentially linked to psoriasis. The major histocompatibility complex region on 6p21 is a major susceptibility locus, referred to as *PSORS1*, which has been found in most of the studies published to date. The 20p13 locus segregates independently of *PSORS1* in psoriasis families. It has previously been thought to be involved in the predisposition to psoriasis and other inflammatory disorders such as atopic dermatitis (AD) and asthma. Although psoriasis and AD rarely occur together, this reinforces the hypothesis that psoriasis is influenced by genes with general effects on inflammation and immunity.

Journal of Investigative Dermatology (2007) **127**, 1403–1409. doi:10.1038/sj.jid.5700749; published online 8 March 2007

INTRODUCTION

Psoriasis is a chronic inflammatory dermatosis that affects 2–4% of the Caucasian population (Nevitt and Hutchinson, 1996). Clinically, the disorder is characterized by well-defined, inflammatory, indurated, scaly plaques generally occurring on extensor surfaces and in most cases on the scalp. Typically, the lesions wax and wane over the years. Based on the clinical aspects of the lesions, seven different subtypes have been defined (Krueger and Duvic, 1994). Plaque psoriasis is the most common type, accounting for more than 80% of all psoriasis cases. Although the prognosis is rarely fatal, psoriasis has a significant adverse effect on patients' quality of life (Krueger *et al.*, 2001). The impact for health care and cost are considerable (Elder *et al.*, 2001). Psoriasis is a multifactorial disease arising through a combination of both environmental and genetic risk factors,

which have been extensively documented (Bhalerao and Bowcock, 1998; Camp, 1998). Segregation analyses of families from large epidemiological studies show no clear pattern of inheritance (Pietrzyk *et al.*, 1982). The estimated sibling-recurrence risk ratio λ_s ranges from 4 to 11.5 (Hellgren, 1967; Farber *et al.*, 1974). Disease concordance rates are much higher in monozygotic twins (65–72%) than in dizygotic twins (15–30%), consistent with genetic factors playing a significant part in disease pathogenesis (Bhalerao and Bowcock, 1998).

All genome-wide studies have revealed highly significant linkage to a region on the major histocompatibility complex (MHC) at 6p21.3, referred to as *PSORS1* (psoriasis susceptibility 1, Nair *et al.*, 1997; Trembath *et al.*, 1997; Leder *et al.*, 1998; Samuelsson *et al.*, 1999; Enlund *et al.*, 1999a; Veal *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Sagoo *et al.*, 2004). Allele sharing between sib-pairs estimated the contribution to the familial clustering of disease (λ) to be $33 < \lambda < 50\%$ (Trembath *et al.*, 1997; The International Psoriasis Genetics Consortium, 2003). Therefore, although linkage to *PSORS1* is the strongest and most replicable, this locus does not explain the entire genetic predisposition and several genome-wide scans have been conducted in the search for additional psoriasis susceptibility loci. Seven additional susceptibility loci have been identified, namely *PSORS2* to *PSORS7* and *PSORS9*, respectively, on chromosomes 17q25 (Tomfohrde *et al.*, 1994), 4q34 (Matthews *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 1997), 1q21 (Capon *et al.*, 1999), 3q21 (Enlund *et al.*, 1999b), 19p13 (Lee *et al.*, 2000), 1p32 (Veal *et al.*, 2001), and 4q31 (Zhang

¹Centre National de Génotypage, Evry, France; ²INSERM, U535, Villejuif, France; ³Université Paris-Sud, IFR69, Villejuif, France; ⁴Généthon, Evry, France and ⁵Department of Human Genetics, University of California, Los Angeles, California, USA

Correspondence: Fabienne Lesueur, FRE2939, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Université Paris-Sud, 94805 Villejuif, France.

E-mail: flesueur@igr.fr or Judith Fischer, Centre Nationale de Génotypage, 2 rue Gaston Crémieux, 91057 Evry Cedex, France. E-mail: fischer@cng.fr

Abbreviations: *PSORS1*, psoriasis susceptibility 1; *MLB* method, maximum likelihood binomial method; *MHC*, major histocompatibility complex; *HLA*, human leukocyte antigen; *NPL* statistic, non parametric linkage statistic; *SNP*, single nucleotide polymorphism; *AD*, atopic dermatitis

Received 3 August 2006; revised 30 November 2006; accepted 7 December 2006; published online 8 March 2007

et al., 2002). Suggestive linkages have also been found on chromosomes 2q, 8q24, 20p13 (Nair et al., 1997; Trembath et al., 1997), 16q23 (Karason et al., 2003), 3p21–23, 4q13, 5q31, 15q11 (Samuelsson et al., 1999), 21q11–q21 (Lee et al., 2000), 2p12–p14, 7, 14q22–q32 (Veal et al., 2001), 9q33 (Zhang et al., 2002), and 18p11 (Asumalahti et al., 2003). More recently, a meta-analysis was conducted of the previous linkage scans for psoriasis susceptibility loci (Sagoo et al., 2004). Apart from the major susceptibility locus *PSORS1*, only *PSORS2* (Tomfohrde et al., 1994; Nair et al., 1997; Samuelsson et al., 1999; Zheng et al., 2003), *PSORS3* (Matthews et al., 1996; Nair et al., 1997), *PSORS6* (Lee et al., 2000; Veal et al., 2001), *PSORS4* (Capon et al., 2001), and the regions 3q21 (Samuelsson et al., 1999), 5q31 (Friberg et al., 2006), 16q12–q23 (Nair et al., 1997; Karason et al., 2003), and 20p13 (Nair et al., 1997; Trembath et al., 1997) have been detected in at least two studies.

Here we present the results of a linkage analysis performed on extended families collected in France. As a first step, a genome-wide scan with markers every 15 cM was carried out on 14 multigenerational kindreds. A higher density of microsatellite markers was used at some candidate loci reported in the literature. All markers suggesting linkage ($P < 0.01$) were then tested in a second set of 32 extended families. Our results confirm previous findings of linkage to *PSORS1* and support the presence of a susceptibility locus on chromosome 20p13, a region previously thought to be involved in the predisposition to psoriasis (Nair et al., 1997; Trembath et al., 1997) and other inflammatory disorders such as atopic dermatitis (AD) and asthma (Cookson et al., 2001).

RESULTS

A genome-wide scan was conducted in a first set of 14 multigenerational psoriasis families (Table 1). Additional microsatellites were added to the 15 cM linkage panel at

some previously published candidate loci (Table S1). Multi-point linkage analysis using the maximum likelihood binomial (MLB) method allowed detection of linkage with $P \leq 0.001$, at *PSORS1* locus on 6p21 (maximum Z_{MLB} score = 3.6, $P = 0.0002$) and on chromosome 20p13 (maximum Z_{MLB} score = 3.1, $P = 0.001$). In addition, we found indication of linkage (with $P < 0.01$) to chromosomes 10q, 13q, 14q, and 16p (Table 2). To further characterize the linkage signal, a second set of 32 large families was genotyped at these six loci for a replication study. The structure of the families and the clinical characteristics of the patients of the two sets are summarized in Table 1 and are similar in the two groups. Furthermore, the distributions of affected sibships, presented in Table S2, do not differ in the two sets.

In set 2, the strongest indication of linkage was obtained at the *PSORS1* locus (Z_{MLB} score = 1.5, $P = 0.06$), but the suggested linkage to the 10q, 13q, 14q, and 20p regions in set 1 was not confirmed. However, analyses of the pooled samples confirmed linkage to both 6p21 and 20p13 (Z_{MLB} score = 3.5, $P = 0.0002$; and Z_{MLB} score = 2.9, $P = 0.002$, Table 2).

Second, we investigated the presence of interactions or genetic heterogeneity between regions retained as being potentially linked to psoriasis in the whole sample. We found no significant correlation between the max Z_{MLB} scores obtained in the six detected regions (6p21, 10q, 13q, 14q, 16p, and 20p13), when these were analyzed two by two. Similarly, the conditional MLB analyses did not reveal any significant interaction or heterogeneity between markers of the detected regions, including the 6p21 (data not shown).

DISCUSSION

In this study, the regions 6p21, 10q, 13q, 14q, 16p, and 20p13 were detected as susceptibility loci in a first set of 14

Table 1. Clinical characteristics of the 46 psoriasis families

	Set 1	Set 2	Total
Number of families	14	32	46
Number of affected individuals	163	205	368
Male/female ratio of affected	1.01	0.93	0.97
Total family members (genotyped)	556 (466)	618 (540)	1174 (1006)
Consanguineous family	—	1	1
Two-generation families	—	7	7
Three-generation families	10	23	33
Four-generation families	4	1	5
Mean number of affected by family	11.6	6.4	8.0
Mean/median age of onset	19.9/14.0	19.3/12.7	19.5/13.3
Mean/median age at examination	41.9/18.5	43.3/17.6	42.7/18.0
Patients with plaque psoriasis (%)	97	95	96
Confirmation of the diagnosis by an independent physician (%)	79.9	70.2	74.7

Table 2. Multipoint linkage analysis (performed with MLB and MERLIN programs)

Region	Marker	Distance from pter. (cM)	Z_{MLB} score (P-value)			Z_{MERLIN} score (P-value)
			Set 1	Set 2	Set 1+Set 2	Set 1+Set 2
6p	D6S1542	47.7	3.4 (0.0003)	1.5 (-)	3.5 (0.0002)	1.31 (-)
	D6S1568	47.7	3.4 (0.0003)	1.5 (-)	3.5 (0.0002)	1.49 (-)
	TNF α	47.7	2.9 (0.002)	1.3 (-)	3.0 (0.001)	1.31 (-)
	D6S1560	47.7	2.9 (0.002)	1.1 (-)	2.8 (0.003)	1.31 (-)
	D6S1618	47.7	3.1 (0.001)	1.0 (-)	3.0 (0.003)	1.31 (-)
	D6S439	48.2	3.6 (0.0002)	0.8 (-)	3.2 (0.0007)	1.24 (-)
10q	D10S603	124	0.7 (-)	1.1 (-)	1.3 (-)	1.70 (0.04)
	D10S1731	134	2.3 (0.01)	0.4 (-)	1.9 (0.03)	2.20 (0.01)
	D10S587	148	0.3 (-)	0.3 (-)	0.4 (-)	0.65 (-)
13q	D13S154	75	1.2 (-)	0.6 (-)	1.3 (-)	0.37 (-)
	D13S280	85	2.9 (0.002)	0.5 (-)	2.4 (0.008)	1.65 (0.05)
	D13S286	94	1.2 (-)	1.2 (-)	1.7 (0.04)	1.10 (-)
14q	D14S63	69	1.6 (0.05)	0.0 (-)	1.1 (-)	1.06 (-)
	D14S1028	81	2.3 (0.01)	0.0 (-)	1.6 (0.05)	1.20 (-)
	D14S1052	94	1.7 (0.04)	0.0 (-)	0.5 (-)	-0.02 (-)
16p	D16S423	10	1.0 (-)	0.0 (-)	0.2 (-)	0.14 (-)
	D16S3075	23	2.4 (0.008)	0.8 (-)	2.3 (0.01)	0.67 (-)
	D16S3103	32	1.7 (0.04)	0.6 (-)	1.6 (0.05)	0.92 (-)
20p	D20S864	0	3.1 (0.001)	0.9 (-)	2.9 (0.002)	1.62 (0.05)
	D20S116	11	2.8 (0.003)	0.6 (-)	2.4 (0.008)	1.48 (-)

(-): $P > 0.05$.

psoriasis families. Despite the absence or weak replication in a second set of 32 families, the results in the whole sample set for the 6p21 and 20p13 regions, which showed the highest Z_{MLB} scores, remained unchanged when compared with those in the first set of data. The fact that the second set of families does not provide evidence for linkage when analyzed on its own may be because of a false detection of linkage in the first set owing to multiple testing or to heterogeneity between samples, which however was non-significant when tested in the predivided sample set (data not shown). Note that this test, as all tests of heterogeneity, is not very powerful. The lack of replication may be also due to the complexity of the disease depending on numerous genes with major genetic heterogeneity; different genes would then be detected from one study to another. Finally, it may simply be because of a lack of power of replication due to the variability of the statistic as has been shown for the Maximum Lod Score statistic (Clerget-Darpoux *et al.*, 2001).

Those loci that have been identified as potentially involved in psoriasis susceptibility in only one or two studies but are not picked up in other studies may be false positives, be peculiar to the population used, or other studies may just lack the power to detect them. It has also been shown that some of these loci are linked to a particular subphenotype of psoriasis. For example, the 16q locus was recently shown to

be a "psoriasis arthritis" locus in the Iceland study (Karason *et al.*, 2005). In this study, more than 95% of patients suffer from plaque psoriasis, and there was no evidence of linkage at the 16q locus.

Another possible reason for the lack of replication of some results could be the large effect of the *PSORS1* locus masking the other loci involved in psoriasis. Because of this potentially strong effect, it has been suggested that studies should condition on the effect of the *PSORS1* locus. This was carried out here by using the conditional MLB method, which, however, did not lead to significant increase of linkage score when conditioning on *PSORS1* in any regions detected by the previous linkage analyses. Moreover, neither interaction nor heterogeneity was shown here between any of these regions.

For linkage analysis the pedigrees were broken into nuclear families because of facility of computing, and we chose the MLB method because it uses simultaneous information on the entire set of affected sibships. Moreover, for complex diseases depending on numerous genes and using an outbred population, it may be more appropriate to use small familial structures such as nuclear families rather than large pedigrees (Abel *et al.*, 1998). When analyzing whole pedigrees, the power to detect linkage may be decreased by genetic heterogeneity within pedigrees. However, for the regions 6p and 20p, for which linkage to

psoriasis could be confirmed by using the MLB method on pedigrees separated into nuclear families, we also applied the program SIMWALK (Sobel and Lange, 1996) using the non parametric linkage (NPL) statistic on the whole pedigrees, because this program makes it possible to analyze pedigrees as large as those present in our sample. With this analysis, there was weak indication of linkage to the 6p region and there was no indication of linkage to the 20p region (data not shown).

In addition, we also performed NPL analyses using the affected sib-pairs (ASP) method implemented in MERLIN (Abecasis *et al.*, 2002). Families were too large to perform multipoint linkage analyses on the whole pedigrees using this program, and they too had to be cut into nuclear families. No significant linkage was detected with this method on any chromosome. Results obtained with MERLIN for the regions 6p21, 10q, 13q, 14q, 16p, and 20p13 are presented in Table 2. Apart from locus on chromosome 10q, the NPL statistic generated by MERLIN suggested weaker linkage signals than the Z_{MLB} scores. The power to detect linkage depends on the informativity of the data including the familial structures of the pedigrees. In particular, for the MLB method, this informativity depends mostly on the number and size of the affected sibships present in the sample. Thus, the loss of power with MERLIN may be attributable to the fact that this program cannot use simultaneous information on the entire set of affected sibships as does the MLB method. Therefore, the MLB method seems more appropriate here, as there were extended affected sibships in the pedigrees included in this study.

The number of genes involved in the pathogenesis of psoriasis and their chromosomal location are presently unknown and only the MHC region (*PSORS1* locus) has met the accepted criteria for genome-wide significance and has been consistently replicated in independent studies (Elder *et al.*, 2001). Refinement of the interval using single-nucleotide polymorphisms (SNPs) has been carried out by several teams, and associations between psoriasis and SNPs have been reported without clear identification of a gene in which mutations or polymorphisms could explain the disorders, although some alleles in the MHC region are good candidates, particularly human leukocyte antigen (HLA)-Cw0602 (Jenisch *et al.*, 1998; Balendran *et al.*, 1999; Oka *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2000; Helms *et al.*, 2005; Holm *et al.*, 2005). Association between HCR*WWCC (Asumalahti *et al.*, 2000, 2002) and CDSN*5 (Ishihara *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999; Jenisch *et al.*, 1999; Capon *et al.*, 2004; Lench *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006) in strong linkage disequilibrium with (HLA)-Cw0602, and psoriasis has also been demonstrated. We also confirmed the associations with these three tightly linked susceptibility alleles and psoriasis in our family set (data not shown). Based on the linkage and association studies, the *PSORS1* locus seems to explain 30–50% of psoriasis susceptibility. Other minor susceptibility loci are thus likely to exist. The detection of the minor loci has, however, proved to be difficult because of locus heterogeneity, which makes the replication of the linkage difficult in different ethnic groups (Capon *et al.*, 2002).

The 10q region has been reported previously in a meta-analysis performed on six psoriasis genome-wide scans (Sagoo *et al.*, 2004), but in our study Z_{MLB} score did not reach a significant value when analyzing the whole sample. Although showing weaker linkage in this study, the 13q and 14q regions have been reported to be linked to psoriasis (Veal *et al.*, 2001; Sagoo *et al.*, 2004). However, for replication studies of published regions, thresholds for the detection of linkage may be less stringent. The 16p region, which has not been reported elsewhere, is of borderline significance and could be a false positive result or be peculiar to the French population used. To conclude, the most significant non-MHC locus in French patients was on chromosome 20p. Our finding is reinforced by the implication of this region in two other independent genome-wide studies. The first one was carried out on 41 multiplex European families (Trembath *et al.*, 1997) and the second on 115 American and German families (Nair *et al.*, 1997).

A genetic component to autoimmune susceptibility has been clearly shown by twin and adoption studies and by increased risk to siblings (Vyse and Todd, 1996). The 20p locus was not found initially among the non-MHC loci that could collectively contribute to disease susceptibility in human autoimmune diseases (Becker *et al.*, 1998), but it is also of note that a linkage to this locus has been found afterwards in a genome screen for childhood AD (Cookson *et al.*, 2001). Although immunologic processes of psoriasis and AD are quite different (psoriasis is TH-1 mediated and AD is a TH-2 reaction), both diseases are characterized by dry, scaly skin, disturbed epidermal differentiation, and an inflammation that is responsive to T-cell-specific agents. The two diseases rarely occur together in the same patient. However, linkage of both diseases to the 20p13 locus indicates that psoriasis and AD are influenced by genes with general effects on cutaneous inflammation and immunity.

The 17 Mb interval on chromosome 20 contains 428 known genes. A refinement of this interval is obviously needed before any relationship between psoriasis and a particular gene in this region could be considered, even though the β -defensin genes, known to be implicated in immunologic defense against bacteria, fungi, and some enveloped viruses (Ganz 2002; Yang *et al.*, 2002) and *TGM3* encoding a transglutaminase, for which the transcript is upregulated in psoriatic skin *versus* normal skin (Bowcock *et al.*, 2001), are good candidates. But there are undoubtedly additional compelling candidates. Replication of our findings is necessary and linkage disequilibrium studies using SNPs across this interval for positional cloning may ultimately identify the causative gene.

MATERIALS AND METHODS

Families

Families with psoriasis were recruited through a media campaign between 1996 and 2001 at G en ethon, using posters in the Paris M etro and information in news magazines, radio, and television (Mah e *et al.*, 2002). From 50,000 phone calls received by a toll-free telephone number, 108 families with at least eight putative affected members were identified, most of them with an apparent autosomal

dominant mode of inheritance of psoriasis. Clinical diagnoses were checked by systematic telephone calls to every family member, affected or non-affected, for each family, at least twice during 4 years by dermatologists using a standard questionnaire available on request. The attending physician of each patient was also contacted, mainly by mail, which led to confirmation of the diagnosis in over 75% of cases. Material was available for 46 families from France. They were split into two sets to reduce the genotyping effort. The structure of the 46 families and the clinical characteristics of the patients are summarized in Table 1. This study was approved by the Ethics Committee of Le Kremlin-Bicêtre Hospital in 1995 (CCPRB). All subjects participating in this study provided informed consent. The study was conducted in concordance with the Declaration of Helsinki Principles.

Genotyping

DNA was extracted from whole blood using the standard phenol/chloroform procedure. A genome-wide scan using 260 polymorphic microsatellite markers from Généthon (Evry, France) was carried out as described previously (Dib *et al.*, 1996). The marker map position was based on the Marshfield map (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>). Markers were spaced at an average distance of 15 cM. When suggestive linkage was found in the first set of 14 families, the locus was analyzed in the second set using 2–6 adjacent microsatellite markers with the exception of the 6p21 region (13 markers) and the 8q24 region (nine markers). The characteristics of these markers are described in Table S1.

Linkage analysis

Because of their large size, the complete pedigrees could not be analyzed by the computer programs currently used for linkage analysis, such as GENEHUNTER (Kruglyak *et al.*, 1996), Allegro (Gudbjartsson *et al.*, 2000), or MERLIN (Abecasis *et al.*, 2002), which have shown to be comparable (Abecasis *et al.*, 2002; Dudbridge, 2003). Other programs such as LINKAGE (Lathrop *et al.*, 1984) and SIMWALK (Sobel and Lange, 1996) could be used, but only for a limited number of markers or using a very long computing time.

When using the MLB method (Majumder and Pal, 1987, Satsangi *et al.*, 1996, Abel and Muller-Myhsok, 1998) or MERLIN, the pedigrees were therefore broken into nuclear families using the Mega2 program (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). The first set of 14 pedigrees and the second set of 32 pedigrees produced 32 and 45 nuclear families, respectively, each with at least two affected sibs, which were used for linkage analyses. The distribution of sibships according to the number of affected sibs for each set of the 46 pedigrees is shown in Table S2.

Multipoint NPL analyses were performed on the ASP using MERLIN (Abecasis *et al.*, 2002). The ASP method calculates inheritance distribution for sets of affected pairs and then uses a score function to determine significance of linkage. We used the NPL_{All} statistic, which estimates identical-by-descent allele sharing among all affected members and is averaged over all possible inheritance patterns, normalized, and weighted across pedigrees. Under the null hypothesis of no linkage, the NPL statistic is distributed asymptotically as a standard normal random variable. Results are reported in terms of an NPL Z score (Z_{MERLIN}) and its associated one-sided *P*-value.

Because most of the pedigrees included in this study were complicated and their information may not be fully utilized by the NPL statistics, we applied another multipoint analysis using the MLB model-free method (Majumder and Pal, 1987; Satsangi *et al.*, 1996; Abel and Muller-Myhsok, 1998); this method does not require specification of the underlying genetic model for the trait investigated, and has the additional advantage of being applicable to complete sibships of affected individuals. The principle of the method is based on the binomial distribution of the number of affected sibs receiving a given parental allele. The likelihood contribution for meioses from a heterozygous parent with *n* affected offspring of which *m* inherited one marker allele and *n*–*m* the other is equal to $[\alpha^m(1-\alpha)^{n-m} + \alpha^{n-m}(1-\alpha)^m]$. For the whole family, the contribution is the product of the two parental contributions. The product of the likelihoods over all families is maximised over α , with α being the probability for an affected sib to receive the marker allele transmitted with the disease allele. The test for linkage is performed using a likelihood ratio test statistic, $\Lambda = 2 \ln[L(\alpha)/L(\alpha = 0.5)]$, with α being equal to 0.5 under the null hypothesis of no linkage and $\alpha > 0.5$ under the hypothesis of linkage. The statistic Λ is distributed asymptotically as a mixture distribution of $0.5 \chi^2_{0\text{df}}$ and $0.5 \chi^2_{1\text{df}}$, and $Z_{\text{MLB}} = \Lambda^{0.5}$ is a one-sided standard normal deviate. All these analyses were conducted using the multipoint approach with the program MLBGH (Abel *et al.*, 1998). Allelic frequencies of the markers were estimated from the founders and unrelated individuals from pedigrees.

Results from the different data sets and for the whole sample were not corrected for multiple testing. It is known that correction for multiple testing of a genome scan is generally difficult to apply. A simple correction of Bonferroni type according to the total number of analyzed markers is conservative, because of linkage between the markers, particularly when the mapping was very fine in some regions, which is the case in our study. The linkage thresholds as proposed by Lander and Kruglyak (1995) are also conservative, as they have been computed under the assumption of a complete dense genome map.

Two loci and heterogeneity model analysis

Correlations between Z_{MLB} scores of loci with the maximum scores in the regions detected by previous linkage analyses were computed. In the case of significant correlation, linkage analysis with the MLB method at one of the loci was performed conditionally to the other locus, following a similar approach to the one developed by Cox *et al.* (1999) using the NPL score. Conditional linkage analysis was performed by setting a weight of 1 to the families with a Z_{MLB} score > 0 at the second locus and a weight of 0 to families with a Z_{MLB} score = 0 in the case of positive correlation (interaction model). Conversely, a weight of 0 was assigned to families with a Z_{MLB} score > 0 and a weight of 1 to the other families in the case of negative correlation (heterogeneity model). Absence of interaction or of heterogeneity is tested by measuring the significance of the increase of the MLB score using the non-conditional *versus* the conditional approach, the difference between the $(Z_{\text{MLB}})^2$ following asymptotically a χ^2 test with 1 df (Figure 1).

Electronic database information

Online Mendelian Inheritance in Man: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.html> for psoriasis susceptibility 1 (PSORS1),

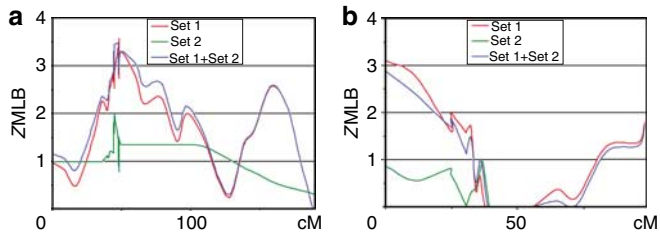


Figure 1. Graphical representation of the linkage signal for the two most significant regions (MLB method). (a) Result for chromosome 6. (b) Result for chromosome 20.

OMIM 177900); psoriasis susceptibility 2 (PSORS2, OMIM 602723); psoriasis susceptibility 3 (PSORS3, OMIM 601454); psoriasis susceptibility 4 (PSORS4, OMIM 603935); psoriasis susceptibility 5 (PSORS5, OMIM 604316); psoriasis susceptibility 6 (PSORS6, OMIM 605364); psoriasis susceptibility 7 (PSORS7, OMIM 605606); psoriasis susceptibility 9 (PSORS9, OMIM 607857).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the families who have so willingly participated in this study. We are also indebted to the Association Pour la Lutte Contre le Psoriasis (APLCP), especially Michèle Corvest, and the National Psoriasis Foundation (NPF) for its support. We also thank Susan Cure for her help in writing this paper. We would like to acknowledge the continuous technical support of the Généthron DNA bank. This study was supported by the Centre National de Génotypage (CNG), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and Généthron. F.L. and C.H. were recipients of a fellowship from Génopole.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Additional microsatellites genotyped at candidate loci in Set1 or in set1 + set2 (6p, 10q, 13q, 14q, 16p, and 20p).

Table S2. Distribution of families according to the number of affected sibs used for linkage analyses (i.e. families with at least two affected sibs).

REFERENCES

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin – rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30:97–101
- Abel L, Muller-Myhsok B (1998) Robustness and power of the maximum-likelihood-binomial and maximum-likelihood-score methods, in multipoint linkage analysis of affected-sibship data. *Am J Hum Genet* 63:638–47
- Abel L, Alcais A, Mallet A (1998) Comparison of four sib-pair linkage methods for analyzing sibships with more than two affecteds: interest of the binomial maximum likelihood approach. *Genet Epidemiol* 15:371–90
- Allen MH, Veal C, Faassen A, Powis SH, Vaughan RW, Trembath RC *et al.* (1999) A non-HLA gene within the MHC in psoriasis. *Lancet* 353:1589–90
- Asumalahti K, Laitinen T, Itkonen-Vatjus R, Lokki ML, Suomela S, Snellman E *et al.* (2000) A candidate gene for psoriasis near HLA-C, HCR (Pg8), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele. *Hum Mol Genet* 9:1533–42
- Asumalahti K, Laitinen T, Lahermo P, Suomela S, Itkonen-Vatjus R, Jansen C *et al.* (2003) Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in Finnish families not associated with PSORS1. *J Invest Dermatol* 121:735–40
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, Elomaa O *et al.* (2002) Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 11:589–97
- Balendran N, Clough RL, Arguello JR, Barber R, Veal C, Jones AB *et al.* (1999) Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol* 113:322–8
- Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, McFarland HF *et al.* (1998) Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9979–84
- Bhalerao J, Bowcock AM (1998) The genetics of psoriasis: a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet* 7:1537–45
- Bowcock AM, Shannon W, Du F, Duncan J, Cao K, Aftergut K *et al.* (2001) Insights into psoriasis and other inflammatory diseases from large-scale gene expression studies. *Hum Mol Genet* 10:1793–805
- Camp RDR (1998) Rook/Wilkinson/Ebiling. in: (Champion RH, Burton JL, Burns DA, Breathnach SM, eds), 6th ed *Textbook of dermatology*, 1589–649. Oxford: Blackwell Science
- Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN *et al.* (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* 13:2361–8
- Capon F, Munro M, Barker J, Trembath R (2002) Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol* 118:745–51
- Capon F, Semprini S, Chimenti S, Fabrizi G, Zambruno G, Murgia S *et al.* (2001) Fine mapping of the PSORS4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 116:728–30
- Capon F, Semprini S, Dallapiccola B, Novelli G (1999) Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *Am J Hum Genet* 65:1798–800
- Chang YT, Chou CT, Shiao YM, Lin MW, Yu CW, Chen CC *et al.* (2006) Psoriasis vulgaris in Chinese individuals is associated with PSORS1C3 and CDSN genes. *Br J Dermatol* 155:663–9
- Clerget-Darpoux F, Selinger-Leneman H, Babron MC (2001) Why do complex traits resist DNA analysis? *Inter J Hum Genet* 1:55–63
- Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE *et al.* (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27:372–3
- Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI *et al.* (1999) Loci on chromosome 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility diabetes in Mexican Americans. *Nat Genet* 21:213–5
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A *et al.* (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380:152–4
- Dudbridge F (2003) A survey of current software for linkage analysis. *Hum Genomics* 1:63–5
- Elder JT, Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Chia N *et al.* (2001) The genetics of psoriasis 2001: the odyssey continues. *Arch Dermatol* 137:1447–54
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M *et al.* (1999a) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered* 49:2–8
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M *et al.* (1999b) Psoriasis susceptibility locus in chromosome 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* 7:783–90
- Farber EM, Nall ML, Watson W (1974) Natural history of psoriasis in 61 twin pairs. *Arch Dermatol* 109:207–11
- Friberg C, Bjorck K, Nilsson S, Inerot A, Wahlstrom J, Samuelsson L (2006) Analysis of chromosome 5q31–32 and psoriasis: confirmation of a susceptibility locus but no association with SNPs within SLC22A4 and SLC22A5. *J Invest Dermatol* 126:998–1002
- Ganz T (2002) Immunology. Versatile defensins. *Science* 298:977–9
- Gudbjartsson DF, Jonasson K, Frigge ML, Kong A (2000) Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet* 25:12–3
- Hellgren L (1967) *Psoriasis*. Almqvist & Wiksell: Stockholm
- Helms C, Saccone NL, Cao L, Daw JA, Cao K, Hsu TM *et al.* (2005) Localization of PSORS1 to a haplotype block harboring HLA-C and distinct from corneodesmosin and HCR. *Hum Genet* 118:466–76

- Holm SJ, Sanchez F, Carlen LM, Mallbris L, Stahle M, O'Brien KP (2005) HLA-Cw*0602 associates more strongly to psoriasis in the Swedish population than variants of the novel 6p21.3 gene PSORS1C3. *Acta Derm Venereol* 85:2-8
- Ishihara M, Yamagata N, Ohno S, Naruse T, Ando A, Kawata H et al. (1996) Genetic polymorphisms in the keratin-like S gene within the human major histocompatibility complex and association analysis on the susceptibility to psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 48:182-6
- Jenisch S, Henseler T, Nair RP, Guo SW, Westphal E, Stuart P et al. (1998) Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/C region. *Am J Hum Genet* 63:191-9
- Jenisch S, Koch S, Henseler T, Nair RP, Elder JT, Watts CE et al. (1999) Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage disequilibrium with HLA and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 54:439-49
- Karason A, Gudjonsson JE, Jonsson HH, Hauksson VB, Runarsdottir EH, Stefansson K et al. (2005) Genetics of psoriasis in Iceland: evidence for linkage of subphenotypes to distinct loci. *J Invest Dermatol* 124:1177-85
- Karason A, Gudjonsson JE, Upmanyu R, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Runarsdottir EH et al. (2003) A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome 16q: evidence for imprinting. *Am J Hum Genet* 72:125-31
- Krueger G, Koo J, Lebwohl M, Menter A, Stern RS, Rolstad T (2001) The impact of psoriasis on quality of life: results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient-membership survey. *Arch Dermatol* 137:280-4
- Krueger GG, Duvic M (1994) Epidemiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 102:14S-8S
- Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 58:1347-63
- Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11:241-7
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J (1984) Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3443-6
- Leder RO, Mansbridge JN, Hallmayer J, Hodge SE (1998) Familial psoriasis and HLA-B: unambiguous support for linkage in 97 published families. *Hum Hered* 48:198-211
- Lee YA, Ruschendorf F, Windemuth C, Schmitt-Egenolf M, Stadelmann A, Nurnberg G et al. (2000) Genomewide scan in German families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet* 67:1020-4
- Lench N, Iles MM, Mackay I, Patel R, Sagoo GS, Ward SJ (2005) Single-point haplotype scores telomeric to human leukocyte antigen-C give a high susceptibility major histocompatibility complex haplotype for psoriasis in a caucasian population. *J Invest Dermatol* 124:545-52
- Mahé E, Lahfa M, Mansouri S, Mosharraf-Olmolk H, Le Rebours J, Prud'homme JF et al. (2002) Physicians' response to a letter to confirm diagnosis in a genetic study of psoriasis. *Eur J Dermatol* 12:66-9
- Majumder PP, Pal N (1987) Nonrandom segregation: uniformly most powerful test and related considerations. *Genet Epidemiol* 4:277-87
- Matthews D, Fry L, Powles A, Weber J, McCarthy M, Fisher E et al. (1996) Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet* 14:231-3
- Mukhopadhyay N, Almasy L, Schroeder M, Mulvihill WP, Weeks DE (2005) Mega2: data-handling for facilitating genetic linkage and association analyses. *Bioinformatics* 21:2556-7
- Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W et al. (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 6:1349-56
- Nair RP, Stuart P, Henseler T, Jenisch S, Chia NV, Westphal E et al. (2000) Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 66:1833-44
- Nevitt GJ, Hutchinson PE (1996) Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 135:533-7
- Oka A, Tamiya G, Tomizawa M, Ota M, Katsuyama Y, Makino S et al. (1999) Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 8:2165-70
- Pietrzyk JJ, Turowski G, Kapinska-Mrowka M, Rozanski B (1982) Family studies in psoriasis. I. Complex segregation analysis. *Arch Dermatol Res* 273:287-94
- Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L et al. (2004) Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol* 122:1401-5
- Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A, Yhr M, Inerot A, Enerback C et al. (1999) A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 105:523-9
- Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K et al. (1996) Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 14:199-202
- Sobel E, Lange K (1996) Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58:1323-37
- The International Psoriasis Genetics Study (2003) Assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet* 73:430-7
- Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez-Vina MA, Young M, Lory D et al. (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264:1141-5
- Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A et al. (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6:813-20
- Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B et al. (2001) Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* 38:7-13
- Vyse TJ, Todd JA (1996) Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85:311-8
- Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291-6
- Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY et al. (2002) Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese Hans. *J Invest Dermatol* 119:1361-6
- Zheng J, Jin S, Shi R (2003) Confirmation of PSORS psoriasis susceptibility loci in a Chinese population. *Arch Dermatol Res* 295:14-8

Supplementary Table S1. Additional microsatellites genotyped at candidate loci in Set1 or in set1+set2 (6p, 10q, 13q, 14q, 16p and 20p).

Region and Marker	Heterozygosity	Distance from p-telomere (cM)	References
1p12-p13 (PSORS7)			Veal <i>et al.</i> (2001)
D1S2726	0.75	144	
D1S252	0.82	150	
D1S514	0.76	152	
1q21 (PSORS4)			Capon <i>et al.</i> (1999)
D1S498	0.82	155	
D1S305	0.83	159	
D1S2721	0.74	161	
D1S2635	0.86	166	
2p12-p16			Veal <i>et al.</i> (2001)
D2S357	0.79	80	
D2S380	0.83	84	
D2S286	0.67	94	
D2S139	0.82	102	
4qter (PSORS3)			Matthews <i>et al.</i> (1996) ; Nair <i>et al.</i> (1997) ; Sagoo <i>et al.</i> (2004)
D4S1607	0.82	184	
D4S1535	0.75	195	
D4S408	0.78	195	
D4S3032	0.67	200	
6p21 (PSORS1)			Nair <i>et al.</i> (1997) ; Trembath <i>et al.</i> (1997) ; Samuelsson <i>et al.</i> (1999) ; Veal <i>et al.</i> (2001) ; Zhang <i>et al.</i> (2002) ; Sagoo <i>et al.</i> (2004)
D6S1686	0.61	39	
D6S1663	0.68	40	
D6S299	0.80	42	
D6S276	0.83	42	
D6S1554	0.71	42	
D6S258	0.77	44	
D6S1542	0.46	47.7	
D6S1568	0.87	47.7	
TNF α	0.27	47.7	
D6S1560	0.85	47.7	
D6S1618	0.85	47.7	
D6S439	0.60	48.2	
D6S291	0.70	49.5	
8q24			Trembath <i>et al.</i> (1997)
D8S1832	0.70	132	
D8S263	0.68	142	
D8S284	0.83	144	
D8S1712	0.72	144	
D8S1740	0.64	147	
D8S529	0.81	148	
D8S256	0.83	148	
D8S537	0.89	151	
D8S1753	0.86	154	

10q23-q26			Sagoo <i>et al.</i> (2004)
D10S583	0.83	115	
D10S603	0.75	124	
D10S1731	0.82	134	
D10S587	0.81	148	
D10S217	0.81	158	
12p13			Veal <i>et al.</i> (2001)
D12S1652	0.81	8	
D12S314	0.80	11	
D12S77	0.89	20	
13q31-q34			
D13S265	0.68	69	
D13S154	0.87	75	
D13S280	0.88	85	
D13S286	0.78	94	
D13S1315	0.80	103	
14q11-q32			Veal <i>et al.</i> (2001)
D14S72	0.82	9	
D14S50	0.77	13	
D14S283	0.82	14	
D14S1057	0.80	56	
D14S63	0.77	69	
D14S1028	0.82	81	
D14S1052	0.74	94	
D14I066	0.64	99	
16p13			
D16S521	0.71	1	
D16S423	0.73	10	
D16S3075	0.78	23	
D16S3103	0.82	32	
D16S499	0.69	33	
16q12-23			Nair <i>et al.</i> (1997) ; Karason <i>et al.</i> (2003) ; Sagoo <i>et al.</i> (2004)
D16S415	0.74	68	
D16S3039	0.74	74	
D16S516	0.73	100	
D16S422	0.79	111	
D16S3037	0.72	121	
17q25 (PSORS2)			Tomfohrde <i>et al.</i> (1994) ; Nair <i>et al.</i> (1997) ; Samuelsson <i>et al.</i> (1999)
D17S939	0.83	106	
D17S784	0.77	117	
D17S928	0.77	127	
20p13			Nair <i>et al.</i> (1997); Trembath <i>et al.</i> (1997)
D20S864	0.50	0	
D20S116	0.80	11	
D20S851	0.73	25	
D20S917	0.81	25	
D20S189	0.75	31	
D20S112	0.80	39	

Supplementary Table S2. Distribution of families according to the number of affected sibs used for linkage analyses (*i.e.* families with at least two affected sibs)

Number of affected sibs	2	3	4	5	6	7	8	9	Total
Set 1	17	5	4	3	2	1	0	0	32
Set 2	25	13	3	2	1	0	0	1	45
Total	42	18	7	5	3	1	0	1	77

1.1.2 Conclusion

Six régions (6p21, 10q, 13q, 14q, 16p et 20p13) ont été identifiées lors de l'analyse des 14 premières familles avec des valeurs de p comprises entre 0.0002 et 0.05. Outre le locus majeur *PSORS1* (6p21), quatre régions (10q, 13q, 14q et 20p13) ont déjà été détectées dans une étude [Nair et al., 1997, Trembath et al., 1997, Veal et al., 2001, Sagoo et al., 2004]. Lors de l'analyse de l'ensemble des familles, deux régions ségrégeant de manière indépendante, 6p21 ($Z_{MLBnorm}=3.5$, $P=0.0002$) et 20p13 ($Z_{MLBnorm}=2.9$, $P=0.002$) ont été confirmées, en dépit de l'absence ou de la faible répliation dans 32 autres familles. Cette étude confirme, dans une nouvelle population, l'existence d'un rôle majeur, déjà connu, du locus HLA (6p21) dans la prédisposition au psoriasis. Il renforce également l'implication dans la maladie d'un locus non-HLA sur le chromosome 20p. Cette région a été initialement identifiée dans deux autres études indépendantes, la première sur 115 familles américaines et germaniques ($Z_{ILINKmax}=2.62$) et la seconde sur 41 familles européennes ($NPL=2.01$) [Nair et al., 1997, Trembath et al., 1997]. La région sur le chromosome 20p est d'autant plus intéressante qu'elle est commune à une autre maladie auto-immune et inflammatoire de la peau, la dermatite atopique [Cookson et al., 2001]. De nombreux gènes (428 gènes) sont présents dans ce large locus d'intérêt (D20S864-D20S112, 17Mb). Afin d'identifier le gène causal, une étude d'association a été réalisée sur l'ensemble de cet intervalle, amenant ainsi à une publication qui sera détaillée ultérieurement.

1.2 Approfondissement de l'étude : Criblage du génome sur toutes les familles

1.2.1 Introduction

Plus de 15 criblages du génome de familles de structures différentes, atteintes de psoriasis, ont été réalisés. Parmi les nombreuses régions candidates décrites, seul le locus HLA a été confirmé de manière significative dans diverses études. Cette discordance entre les études, réalisées sur différentes populations, a conduit notre équipe à s'intéresser à la prédisposition génétique au psoriasis dans la population française, en particulier dans des grandes familles. De nombreux paramètres peuvent expliquer l'absence de répliation parmi ces études. Par exemple, la puissance de détection peut être diminuée par l'hétérogénéité génétique et phénotypique de la maladie, par un faible effet génétique des gènes à identifier, et par la petite taille des échantillons testés, souvent non suffisante pour détecter des gènes à effet faible ou modéré. Or, la plupart des études ont été réalisées sur des échantillons de structure et de taille très variables, pouvant expliquer ce défaut de répliation. Dans notre première étude, le premier criblage décrit précédemment a été réalisé tout d'abord sur 14 grandes familles françaises atteintes de psoriasis, s'étendant parfois sur 3 générations. L'utilisation de grandes familles permet de

TAB. 3.1: Résumé des résultats les plus significatifs ($Z > 2$) de l'analyse de liaison paramétrique réalisé sur la totalité des marqueurs (Criblage 1+2) sur les 46 familles françaises par MLINK

Chr.	Marqueurs	Position (cM)	Modèle	$Z(\theta)$ max	θ
6p21	D6S1615	44.96	récessif	3.15	0.3
	D6S1560	47.71		3.22	0.3
	D6S1583	47.71		2.66	0.3
	D6S1629	47.71		2.75	0.3
	D6S1542	47.71		4.31	0.2
	D6S1568	47.71		2.36	0.3
	D6S1618	47.71		3.06	0.3
	D6S1701	47.71		2.89	0.3
	D6S1611	47.71		2.73	0.3
	D6S439	48.26		3.62	0.3
7p14	D7S510	59.93	dominant	2.11	0.3
18p11	D18S1132	11.21	dominant	2.76	0.2
20p13	D20S116	11.20	dominant	2.06	0.3
22q13	D22S423	46.42	récessif	2.49	0.3

limiter, au sein d'une famille, l'hétérogénéité génétique puisqu'il est plus probable que peu de facteurs génétiques ségrègent dans chaque famille et que les allèles correspondants soient les mêmes pour tous les patients de la famille. En contrepartie, ce choix ne permet pas de détecter tous les loci de prédisposition au psoriasis. De plus, dans ces grandes familles, il est observé un mode de transmission mendélien de type autosomique dominant, pouvant être le reflet de la transmission d'un gène majeur. L'étude de ces familles a permis l'identification de six régions dont cinq d'entre elles (6p21, 10q, 13q, 14q et 20p13) déjà détectées dans au moins une autre étude [Nair et al., 1997, Trembath et al., 1997, Veal et al., 2001, Sagoo et al., 2004]. Ces loci ont été analysés dans 32 autres grandes familles, sur lesquelles le criblage du génome entier n'avait pas été réalisé. Ceci a permis de confirmer les régions 6p21 et 20p13.

Afin de rechercher d'autres régions candidates, un deuxième criblage avec une couverture plus dense du génome (370 microsatellites, environ 1 tous les 10 cM) a été réalisé sur l'ensemble des 46 familles au CNG (nommé par la suite "Criblage 2").

1.2.2 Résultats

En raison d'un mode de transmission de type mendélien observé pour certaines des familles, la première analyse faite a été une étude de liaison paramétrique bipoint sous deux modèles (mode de transmission dominant ou récessif), combinée sur les données des deux criblages du génome (nommé "Criblage 1+2") (soit un total de 679 marqueurs). Cette étude de liaison diffère de celle non paramétrique par l'obligation de définir précisément des paramètres comme le mode de transmission, la pénétrance et les fréquences alléliques. Comme attendu dans le cas d'une maladie multifactorielle, cette étude préliminaire donne peu de résultats probants ($Z > 2$) exceptée pour la région 6p21 (Tableau 3.1). Plusieurs marqueurs (à 47.7 cM) sont montrés liés au psoriasis, sous un modèle récessif, avec des valeurs proches ou atteignant parfois le seuil significatif pour ce type d'étude d'après Lander ($\text{lod}=3.3$) mais avec une valeur du taux de recombinaison θ variant entre 0.2 et 0.3 [Lander and Kruglyak, 1995]. Même s'il n'y a pas de preuve significative pour une liaison avec des valeurs de $-2 < Z(\theta) < 3$, certaines régions semblent être d'intérêt telles que les régions sur les chromosomes 7, 18, 20 et 22 avec un modèle dominant (Tableau 3.1). Le manque de puissance dans ce type d'analyse est souvent dû à la difficulté de définir correctement les paramètres nécessaires.

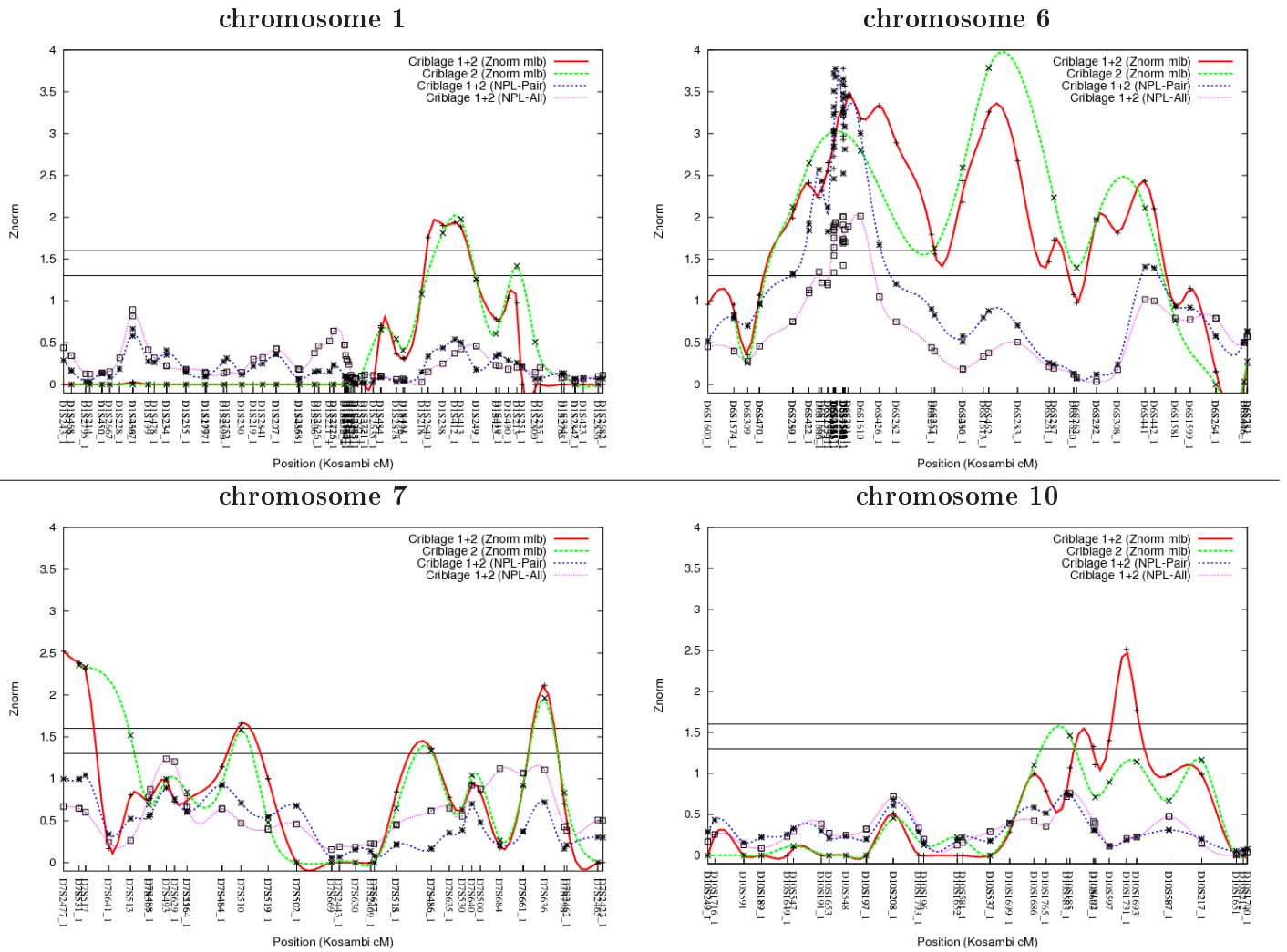
Par la suite, deux analyses non paramétriques et multipoints (MLB et NPL) ont été réalisées, à l'aide des logiciels MLBGH et SIMWALK, sur le deuxième panel de 371 marqueurs sur les 46 familles (Criblage 2), suivies d'une analyse combinée sur l'ensemble des marqueurs génotypés lors des deux criblages sur ces mêmes familles (Criblage 1+2). Les résultats les plus significatifs de ces deux

types d'analyses par les deux méthodes sont présentés dans la figure 3.1. Dans le cas de l'analyse non paramétrique par la méthode MLB, les résultats sont assez similaires entre l'étude du deuxième panel et celle combinée des deux panels. Ainsi, l'augmentation de la densité en marqueurs ne semble pas influencer l'analyse. En accord avec notre première étude, six régions 6p21, 10q, 13q, 14q, 16p et 20p13 sont retrouvées liées avec la maladie dans les 45 familles ($P < 0.05$ ou $Z_{norm} = 1.6$). Des liaisons de deux locus larges sur le chromosome 6, un en 6p23-12 (30-79 cM) et un autre en 6p12-q22 (80-130 cM) sont observées, avec des valeurs de P variant de 0.02 à 7.9×10^{-5} . La valeur de P la plus faible est obtenue pour un marqueur en 6p21 avec $Z_{norm} = 3.78$, proche du seuil théorique de significativité décrit par Lander et Kruglyak (1995) ($P = 2.2 \times 10^{-5}$) [Lander and Kruglyak, 1995]. Pour les autres régions, les résultats restent similaires à ceux obtenus lors de notre première étude non paramétrique. Quatre loci potentiels sont suggérés lors des deux analyses (criblage 2 ou criblage 1+2) pour les régions 10q23-26 ($Z_{norm} = 2.5$, $P_{max} = 0.006$), 13q22-34 ($Z_{norm} = 2.6$, $P_{max} = 0.005$), 14q23-32 ($Z_{norm} = 3.0$, $P_{max} = 0.001$), 16p13-12 ($Z_{norm} = 2.1$, $P_{max} = 0.02$) et 20p13 ($Z_{norm} = 2.2$, $P_{max} = 0.01$). Cinq nouveaux loci sur les chromosomes 1q, 7, 12q, 17q, 20p12, 20q13 et 22q sont également suggérés avec des valeurs de P_{max} égales à 0.03 ($Z_{norm} = 1.9$), 0.006 ($Z_{norm} = 2.5$), 0.03 ($Z_{norm} = 1.9$), 0.008 ($Z_{norm} = 2.4$), 0.009 ($Z_{norm} = 2.3$), 0.003 ($Z_{norm} = 2.7$) et 0.002 ($Z_{norm} = 2.9$) respectivement.

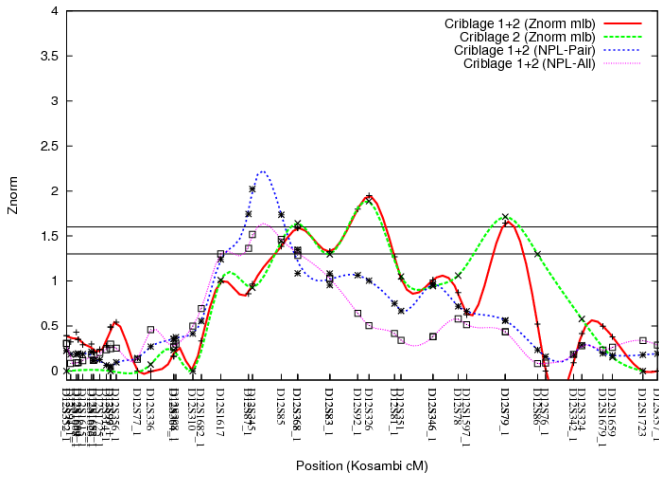
Dans le cas de l'analyse non paramétrique avec la méthode NPL, les résultats pour les deux statistiques (NPL_{pair} et NPL_{all}) par SIMWALK2 sont assez similaires, excepté pour les régions des chromosomes 6, 16, 17 et 20, où de meilleurs résultats sont observés avec la statistique NPL_{pair} . L'analyse du deuxième panel seul (371 marqueurs) sur les familles entières ne montre aucun résultat significatif ($P < 0.05$ ou $NPL = 1.3$) (données non montrées). La réduction de l'espacement entre marqueurs permet dans cette analyse multipoint d'augmenter la puissance de notre étude et d'identifier ou parfois de restreindre la localisation des loci d'intérêt, comparée à l'étude MLB.

Lors de l'analyse globale des panels (679 marqueurs), la région 6p23-p21 est montrée fortement liée au psoriasis, particulièrement au niveau d'une région restreinte en 6p21 ($NPL_{pairmax} = 3.78$, $P = 1.66 \times 10^{-4}$). Quatre autres régions sur les chromosomes 12, 14, 16 et 20 sont également retrouvées liées à la maladie mais de manière suggestive. Les régions correspondantes ($p < 0.05$) sont néanmoins un peu différentes des analyses précédentes. Par exemple, les régions liées sont 12p12-q13 ($NPL_{pairmax} = 2.02$, $P = 0.01$), 14q32 ($NPL_{allmax} = 1.73$, $P = 0.02$), 16p12-q12 ($NPL_{pairmax} = 1.99$, $P = 0.01$) et 20p12 ($NPL_{pairmax} = 1.45$, $P = 0.04$) au lieu de 12q13-q21, 14q24-32, 16p13-p12 et 20p13-p12. Aucune liaison significative n'est retrouvée pour les chromosomes 1, 7, 10, 13, 17 et 22.

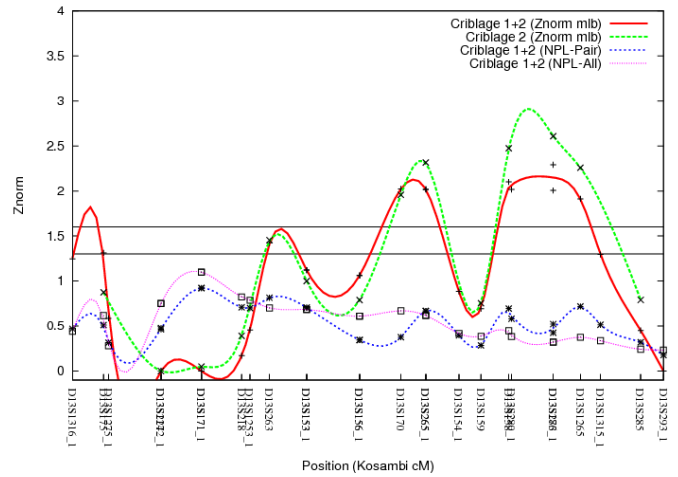
FIG. 3.1: Résumé des résultats les plus significatifs obtenus lors des analyses non paramétriques des données des criblages 1 et/ou 2 par MLB (Z_{norm}) et SIMWALK (NPL_{all} et NPL_{pair})



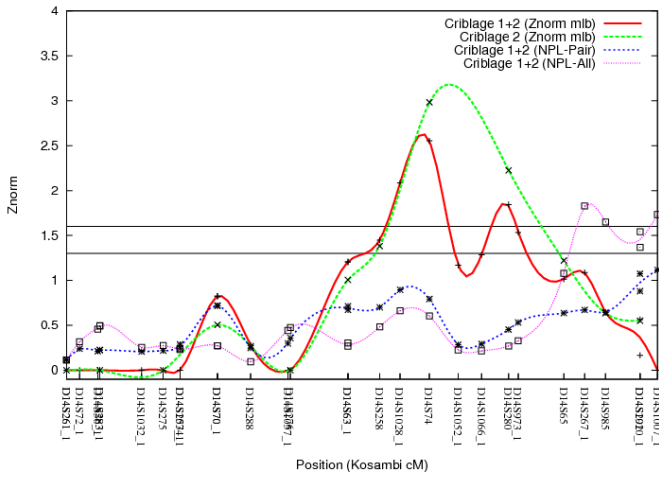
chromosome 12



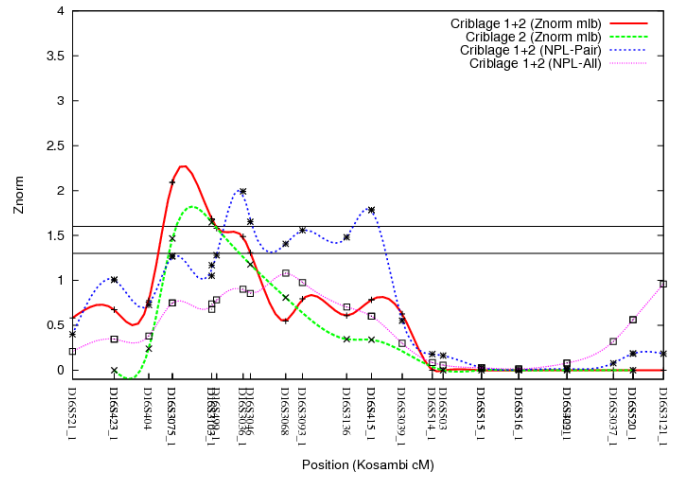
chromosome 13



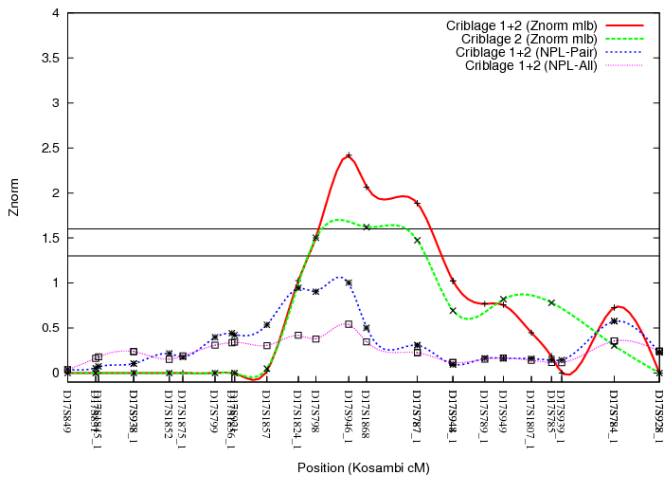
chromosome 14



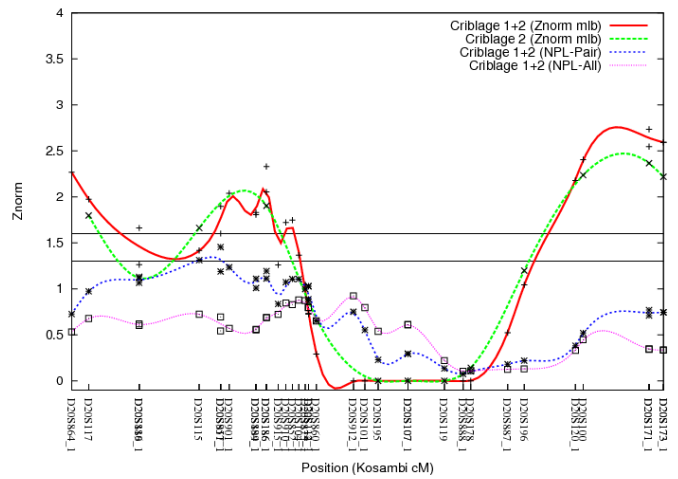
chromosome 16



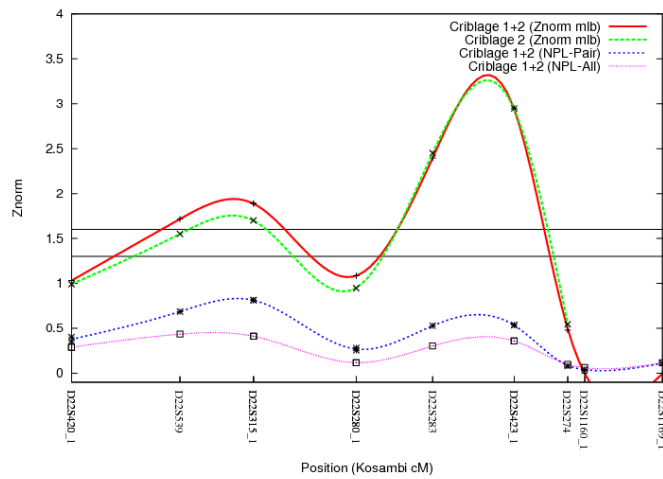
chromosome 17



chromosome 20



chromosome 22



1.2.3 Conclusion

L'ensemble des analyses de liaison non paramétriques multipoints sur la totalité des familles confirme la liaison trouvée lors du premier criblage entre les régions 6p21, 14q, 16p, 20p et le psoriasis et révèle une nouvelle région en 12q. Les régions sur les chromosomes 1q25-32, 7p22-14, 10q23-26, 13q22-34, 17q11-23, 20q13 et 22q12-13 sont seulement montrées liées à la maladie lors de l'analyse MLB. Une liaison avec les loci 6p21, 7p14, 20p13 et 22q13 a également été trouvée lors des analyses paramétriques.

En raison du nombre théorique élevé de faux-positifs occasionnés lors des nombreux tests de criblages du génome, ces données doivent être interprétées avec précaution. Cependant, il est intéressant de noter que certains de ces loci soient révélés par deux méthodes différentes et/ou qu'ils aient été préalablement identifiés comme d'éventuels loci de prédisposition au psoriasis (en atteignant un seuil de $P < 0.05$) dans au moins une autre étude indépendante.

Le pouvoir de détecter la liaison dépend de l'informativité des données, incluant celles obtenues par les structures des familles. Or, chaque méthode prend en compte différemment l'information familiale. Par exemple, la méthode MLB utilise l'information de tous les germains atteints prise globalement, ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de grandes familles. L'application de cette méthode nécessite cependant la coupure des familles en familles nucléaires, ce qui n'est pas le cas avec le programme SIMWALK. L'analyse des familles entières permet d'augmenter la puissance de l'étude car l'analyse tient compte de la structure familiale pour estimer correctement le partage IBD. Ce pouvoir de détection peut cependant être diminué dans le cas d'une hétérogénéité génétique à l'intérieur des familles.

Sans détailler le rôle majeur du locus en 6p21 bien établi à l'heure actuelle, les régions 14q et 20p ont été déjà rapportées comme étant liées au psoriasis [Nair et al., 1997, Trembath et al., 1997, Veal et al., 2001, Karason et al., 2005, Liu et al., 2008].

Dans le cas du chromosome 14, une preuve suggestive de liaison a été initialement obtenue lors d'un criblage du génome de 158 familles anglaises ($NPL_{all}=2$) au niveau de la région 14q32 pour un microsatellite, qui a également été retrouvée liée dans notre étude lors de l'analyse NPL [Veal et al., 2001]. Un autre criblage du génome de 259 patients de 98 familles islandaises, avec un psoriasis sensible aux traumatismes superficiels, a montré une liaison entre cette région 14q32 et le psoriasis (lod score=3.1) [Karason et al., 2005]. Dans une étude américaine récente d'association cas-témoins (810 *versus* 1256), réalisée sur l'ensemble du génome, une association avec un SNP dans le gène *CLMN* (calponin-like transmembrane domain protein) présent dans la région 14q32 ($P=0.003$) a été décrite [Liu et al.,

2008].

La région 20p était, dans notre précédente étude, la deuxième région liée le plus fortement au psoriasis après la région en 6p21. L'implication de ce locus a été déjà décrite dans deux autres études indépendantes : une première, sur 68 familles européennes, avec un marqueur en position 20p12 ($P=0.0012$, lod score=2.01) [Trembath et al., 1997]. Ceci a été confirmé par l'existence d'une liaison avec plusieurs marqueurs de la région 20p13-12 lors d'une autre étude réalisée sur 115 familles américaines et allemandes [Nair et al., 1997]. Le meilleur résultat est obtenu lors d'une analyse paramétrique sous le modèle récessif ($Z_{max}=2.6$), ce qui est différent de notre étude paramétrique où la "liaison" est suggérée sous un modèle dominant [Nair et al., 1997]. Cependant, la meilleure preuve de liaison avec le chromosome 6 est observée lors de l'analyse paramétrique sous le modèle récessif des 115 familles ($Z_{max}=2.6$), ce qui est en accord avec notre étude. La région 20p, particulièrement 20p13, a par conséquent été la première région étudiée par notre équipe à la suite du premier criblage des familles françaises, conduisant par la suite à la découverte d'une association avec un gène commun à d'autres maladies auto-immunes.

Aucune étude n'a été publiée pour une liaison significative entre le psoriasis et les régions 12q et 16p.

Parmi les autres régions suggérées lors de l'une de nos études, les régions 10q et 13q sont similaires aux régions identifiées lors d'une méta-analyse qui intègre les données de six criblages de génomes réalisés sur des populations différentes (422 familles caucasiennes et chinoises de structure différente) [Sagoo et al., 2004]. En plus de confirmer des régions déjà suggérées, cette méta-analyse a permis de trouver de nouveaux loci (dont 10q et 13q) où l'effet génétique était trop petit pour être détecté de manière significative par une seule de ces études. Dans le cas de la région 13q, le meilleur résultat est obtenu lors de l'étude de 61 familles chinoises (NPL=2.44, $P=0.008$) [Zhang et al., 2002]. Deux autres études, réalisées sur 710 familles caucasiennes et 79 familles islandaises, ont montrées une liaison entre la même région en 10q et le psoriasis (MLS=1.1 et lod score=3.1, respectivement) [Karason et al., 2005, Allen et al., 2003]. Il est également intéressant de noter que lors de cette méta-analyse, une deuxième région sur le chromosome 6 (66-99 cM), avec une liaison moins significative que le premier locus en 6p21, a été identifiée qui correspond à la région révélée par la méthode MLB, 6p12-q22 (80-130 cM).

La région en 22q12-13, montrée liée lors de nos analyses paramétriques et non paramétriques (avec MLB), a été également suggérée comme locus (NPL=2.2, $P=0.02$) lors d'une étude finlandaise de 31 familles [Asumalahti et al., 2003b]. De plus, cette étude montre un nouveau locus sur le chromosome 18p11 (NPL=3.58, $P=0.003$), qui contient le marqueur retrouvé lié dans notre étude paramétrique.

Cette région a aussi été identifiée dans une population anglaise (NPL=1.97). Cette dernière étude montre également une liaison avec une région commune entre plusieurs maladies auto-immunes en 7p15-q11 (NPL=2.1, P=0.0167), contenant le seul marqueur observé lié dans notre étude en 7p14 (D7S510) [Veal et al., 2001]. Dans notre analyse, deux des régions 1q25-32 et 17q11-23 sont proches des régions de prédisposition du psoriasis connues *PSORS4* (1q21) et *PSORS2* (17q25) [Nair et al., 1997, Capon et al., 1999b]. Les régions 7p22, 20q13 ne sont *a priori* pas décrites dans une autre étude.

Ces régions, caractérisées comme contenant un ou des gènes potentiellement impliqués dans la maladie, sont seulement répliquées dans une ou deux études et ces études ne montrent, dans la plupart des cas, qu'une liaison suggestive avec une valeur de P non corrigée proche du seuil de 5%. Le seul locus, retrouvé dans la majorité des études, est le locus HLA et, dans notre étude il est le seul locus à être fortement lié au psoriasis avec une valeur de P <0.001 dans l'ensemble de nos analyses.

Pour l'identification de régions d'intérêt, une preuve de liaison obtenue dans de nombreuses études peut être plus éloquente qu'une seule liaison significative non répliquée.

Pour les autres loci, l'absence de répllication dans d'autres études peut indiquer que ces loci peuvent être des faux-positifs (dus aux multiples tests), être spécifiques à une population ou être la conséquence d'un manque de puissance pour les détecter. La puissance d'une étude est dépendante entre autres de la taille de l'échantillon étudié, de la contribution du gène à identifier (effet majeur ou mineur), de la présence d'une hétérogénéité (phénotypique ou génétique), de l'informativité des marqueurs. Dans le cas du psoriasis, l'hétérogénéité phénotypique ou génétique au sein d'un échantillon peut être importante et peu d'études ont été réalisées sur de grands échantillons, pouvant limiter l'identification de gènes à effet mineur. L'hétérogénéité phénotypique est théoriquement réduite dans notre étude, concernant 45 grandes familles avec une grande majorité des malades (environ 96%) atteints de psoriasis en plaques. Néanmoins, en raison de la fréquence élevée de la maladie en France (4%), une hétérogénéité génétique au sein d'une même famille peut exister, par suite d'un mariage entre un individu atteint de la famille étudiée et un conjoint lui-même malade. Ce dernier cas a d'ailleurs été noté dans certaines de nos familles. De plus, la plupart des études discutées précédemment ne présentent que les résultats d'un criblage à maille large du génome. Peu de ces régions ont été étudiées de manière plus précises, en augmentant par exemple la densité des marqueurs. Comme observé lors d'une de nos études non-paramétriques, l'analyse de marqueurs supplémentaires pour réaliser un criblage plus fin peut permettre une meilleure exploitation des données, surtout dans le

cas d'une analyse multipoint.

Ainsi, l'ensemble des ces résultats doit nécessairement être répliqué par plusieurs études et, si possible dans les meilleures conditions, telles que l'étude d'échantillons de plus grande taille.

2 ANALYSE D'ASSOCIATION : ETUDE DE DEUX REGIONS MAJEURES

2.1 Locus HLA en 6p : association avec l'allèle HLA-*Cw6*

2.1.1 Association indirecte

Notre étude de liaison sur les familles françaises confirme l'implication de la région sur le chromosome 6p21 dans le psoriasis. De nombreuses études réalisées dans plusieurs populations ont affirmé que cette région, et plus particulièrement celle du locus HLA, est un locus majeur de prédisposition au psoriasis (*PSORS1*), conférant un risque significatif dans la maladie de 33 à 50%. Comme décrit dans l'introduction, ce locus a été réduit à un intervalle d'environ 300kb, contenant de nombreux gènes dont *HLA-C*, *CDSN* et *HCR*. Depuis une vingtaine d'années, plusieurs études montrent une forte association entre un allèle de l'antigène de classe I, le HLA-*Cw6* et la maladie, soutenant fortement que celui-ci est l'allèle à risque de *PSORS1* [Nair et al., 2006, Fan et al., 2008]. Néanmoins, un fort déséquilibre de liaison au niveau de cet intervalle peut expliquer les associations observées entre le psoriasis et d'autres gènes de la région tels que *HCR* et *CDSN*. En effet, une association significative est observée entre le psoriasis et un haplotype du gène *HCR*, *HCR*WWCC*. Cet haplotype est constitué par 4 variants codants non-synonymes (rs130065 (307T), rs130076 (325T), rs130079 (1723T) et rs1576 (2327G)) dont les trois premiers sont prédits changer la structure secondaire de la protéine HCR [Asumalahti et al., 2002]. Une autre étude plus détaillée sur le rôle de *CDSN* montre l'impact fonctionnel d'un allèle du gène *CDSN* (rs1062470 (971T)), retrouvé dans de nombreux haplotypes à risque [Capon et al., 2004a]. Après identification du locus de prédisposition *PSORS1* dans les familles françaises, nous avons voulu confirmer l'association entre l'allèle à risque HLA-*Cw6* et le psoriasis dans l'ensemble de nos familles : Lot I (45 familles) et Lot II (81 familles). En raison du fort déséquilibre de liaison entre les gènes *HCR* et *CDSN* et cet allèle, un test d'association sur les familles a été réalisé pour 4 des SNPs précédemment décrits (rs130076, rs130079, rs1576 et rs1062470). L'analyse par FBAT montre une forte association entre ces polymorphismes et le psoriasis dans nos deux lots (Tableau 3.2). Un autre test appliquant les modèles logistiques, la méthode "LNMs" (Logistic-Normal Models), est également réalisée et confirme l'association (Tableau 3.2). En raison de ce résultat significatif pour le locus à

TAB. 3.2: Résultats de l'analyse de 4 Tag SNPs de l'allèle HLA-Cw6 (le locus PSORS1) par les méthodes FBAT et LNNMs

Gène	SNP ^a	Autre nom	Acide aminé	MAF ^b	FBAT						LNNMs						
					Set I		Set II		Set I + Set II		Set I + Set II		P ^e	ORAa [95% CI] ^e	ORaa [95% CI] ^e		
					Nbre de familles informatives ^c	Z ^d	P ^d	Nbre de familles informatives ^c	Z ^d	P ^d	Z ^d	P ^d					
HCR	Rs130076	-325 C>T	R109W	0.22	38	3.58	0.0004	34	3.17	0.001	4.74	0.000002	1.36x10 ⁻¹⁴	2.00	[1.68-2.39]	4.01	[3.37-4.78]
	Rs130079	-1723 G>T	G575C	0.24	38	3.91	0.0001	34	3.22	0.001	5.05	<0.000001	6.22 x10 ⁻¹⁵	2.03	[1.70-2.43]	4.14	[3.47-4.93]
	Rs1576	-2327 C>G	S776C	0.33	38	3.63	0.0003	36	2.13	0.03	4.17	0.00003	6.47 x10 ⁻¹²	1.79	[1.52-2.12]	3.22	[2.73-3.79]
CDSN	Rs1062470	971C>T	UTR	0.37	39	3.90	0.0001	41	2.38	0.02	4.52	0.000006	3.15 x10 ⁻⁷	1.54	[1.30-1.81]	2.36	[2.00-2.78]

A. Analyse par SNP

B. Analyse par Haplotype (haplotypes $\geq 2\%$)

Haplotypes ^a	Fréquence	Set I			Set II			Set I + Set II				
		Nbre de familles informatives ^c	Z ^d	P ^d	Nbre de familles informatives ^b	Z ^d	P ^d	Nbre de familles informatives ^c	Z ^d	P ^d		
H1 CGCC	0.39	165.8	(-)2.93	0.003	66.4	(-)1.45	0.15	0.10	(-)3.17	0.002	1,000,000 permutations ^f	0.001
H2 TTGT	0.22	117.0	4.30	0.00002	57.1	3.84	0.0001	0.000004	5.70	<0.000001	1,000,000 permutations ^f	<0.000001
H3 CGCT	0.18	91.5	(-)1.95	0.05	40.6	(-)2.43	0.01	0.01	(-)3.06	0.002	0.003	0.003
H4 TTGC	0.09	62.5	(-)0.73	0.47	29.1	(-)0.99	0.32	0.25	(-)0.98	0.33	0.27	0.27
H5 CGGC	0.08	43.0	(-)1.50	0.13	12.7	(-)0.75	0.45	0.40	(-)1.76	0.08	0.05	0.05
H6 CTGT	0.02	11.0	0.88	0.38	11.0	0.94	0.35	0.40	1.26	0.21	0.36	0.36

^a L'allèle le plus fréquent, selon NCBI, est donné en premier et les 4 SNPs utilisés pour l'analyse sont étudiés dans l'ordre suivant : rs130076, rs130079, rs1576, rs1062470

^b La fréquence de l'allèle mineur (%) est estimé par FBAT (Family-Based Association Test) dans les deux lots

^c Nombre de familles informatives estimé par FBAT

^d Les valeurs du score Z et de P sont données par le test de l'allèle mineur sous l'hypothèse de liaison réalisé par FBAT. Une valeur positive de Z indique un excès de transmission de l'allèle mineur des parents aux enfants atteints (le risque est augmenté pour le psoriasis).

^e Le test d'association (P-value, OR (Odds ratio) et 95% CI (intervalle de confiance)) est obtenu par la méthode utilisant les modèles

logistiques à effets mixtes. Le terme A indique l'allèle majeur qui est l'allèle de référence et a, l'allèle mineur. ^f La valeur exacte de P

du Z est calculée *via* la méthode de Monte-Carlo pour 1,000,000 de permutations pour chaque haplotype séparément (nommé "1 000 000

permutations P⁽ⁱ⁾).

effet majeur, ce test sera utilisé par la suite pour l'étude des gènes candidats. L'analyse haplotypique par HBAT a comme attendu confirmé une association entre le psoriasis et l'haplotype H2 (TTGT) ($P < 0.000001$ sur les deux lots, basé sur les 1000000 permutations). Cette étude confirme ainsi indirectement la forte association du psoriasis avec l'allèle HLA-*Cw6* dans l'ensemble de nos familles françaises.

2.1.2 Association directe

En parallèle de l'étude précédente, nous avons voulu confirmer l'association de l'allèle HLA-*Cw6* avec le psoriasis de manière plus directe, c'est-à-dire en étudiant des polymorphismes du gène *HLA-C*. La difficulté de cette étude repose sur la complexité de la région du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) car le CMH représente le système génétique le plus polymorphe des systèmes biologiques. Tous les gènes, et à un degré plus important ceux de classe I et II, sont caractérisés par un polymorphisme important, caractéristique principale du système, qui en conditionne la fonction. Néanmoins, il existe un fort déséquilibre de liaison dans la sous-région contenant le gène *HLA-C* [Walsh et al., 2003].

Pour limiter les analyses, nous avons étudié seulement les variants qui caractérisent spécifiquement l'allèle HLA-*Cw6*. Un SNP en position 213 (rs1050414) ou 341 (rs1131123) sur le transcript permet, avec le SNP en position 361 (rs1131118), de typer *HLA-C* en distinguant tous les sous allèles de HLA-*Cw6* (HLA-Cw602-11) (résumé dans le tableau 3.3).

En raison de difficultés techniques, le SNP 361 n'a pas pu être génotypé. Les résultats obtenus lors des tests d'association par le programme FBAT, sur les 45 familles, des deux TagSNPs restants, seuls ou en combinaison avec les 4 autres TagSNPs du HLA-*Cw6* (rs130076, rs130079, rs1576 et rs1062470) précédemment étudiés sont résumés dans le tableau 3.4. Cette étude montre des associations significatives des différentes combinaisons de ces 6 TagSNPs avec le psoriasis. Les meilleures associations sont observées lors de l'analyse de rs1050414 avec ou sans rs1131123, et les 4 TagSNPs des gènes *HCR* et *CDSN* analysés ensemble ($P = 0.00002$) (Tableau 3.4).

Une étude supplémentaire avec reconstitution des haplotypes les plus probables pour chaque individu de nos familles par le programme MERLIN montre comme attendu lors de l'existence d'un fort LD entre les gènes étudiés que 98% des chromosomes portant l'allèle C pour rs1050414 portent également l'allèle A pour rs1131123, expliquant que la même valeur de P est obtenue lors du test de rs1050414 avec ou sans rs1131123. De plus, environ 96% des chromosomes portant l'haplotype TTGT au niveau des deux gènes *HCR* et *CDSN* portent aussi l'haplotype CA pour le gène *HLA-C*. L'ensemble de ces résultats montre un fort déséquilibre de liaison entre ces 6 SNPs dans nos familles et que l'haplotype associé a une fréquence d'environ 20%. Cinquante neuf pourcent des patients génotypés

TAB. 3.3: Caractéristiques des TagSNPs marquant spécifiquement l'allèle HLA-Cw6

TagSNP	Région ^a	Acide aminé	Position ^b	Autre position ^c	Allèles	Allèles du HLA-C ciblés ^d	Allèles du HLA-C ciblés ^e
rs1050414	Exon 2	P71P	22097757	213	G>C	HLA-Cw0602-0611,0704,0711-12,1802	HLA-Cw0602-0616, 0704, 0711-12,0745, 1801-03
rs1050414	Exon 2	P71P	22097757	213	G>C		
rs1131118	Exon 3	R121W	22097359	361	A>T		
rs1131123	Exon 2	D341A	22097629	341	A>C		
rs1131118	Exon 3	R121W	22097359	361	A>T		

^a Position selon la séquence de référence : NM_002117, ^b NT_007592, ^c NM_002117.4, ^d d'après la base de données : IMGT/HLA (Avril 2004 version 2.5), ^e IMGT/HLA (Avril 2008 version 2.21)

TAB. 3.4: Résultats des différentes combinaisons des Tag SNPs de l'allèle HLA-Cw6 par analyse FBAT

Gène	HLA-C	Lot I										
		HCR		CDSN	Fréquence	Nbre de familles informatives	Z	P	1,000,000 permutations P			
SNP ID	rs1050414	rs130076	rs130079	rs1576	rs1062470							
	C					0.13	4.32	0.00002				
	A					0.54	2.42	0.01				
	A					0.24	4.24	0.00002				<0.000001
		T	T	G	T	0.22	4.30	0.00002				<0.000001
		T	T	G	T	0.22	3.95	0.00008				<0.000001
	A	T	T	G	T	0.21	3.87	0.0001				<0.000001
	A	T	T	G	T	0.21	3.81	0.0001				<0.000001

portent au moins l'haplotype à risque (CATTGT) qui n'est retrouvé que chez 31% des sujets sains. Néanmoins, n'ayant pas pu génotyper un des TagSNPs de *HLA-C* (rs1131118), nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les deux autres SNPs du gène *HLA-C* caractérisent d'autres allèles que *HLA-Cw6* dans nos familles. En effet, d'après une étude récente des différents allèles du *HLA-C*, 7 allèles supplémentaires (*HLA-Cw0704*, *0711*, *0712*, *0745*, *1801*, *1802* et *1803*) sont caractérisés par le SNP rs1050414 ou l'haplotype CA. Cependant, ces allèles semblent peu présents dans la population française, excepté pour l'allèle *HLA-Cw07* avec une fréquence moyenne de 2% [Bois and Jollet, 2004, Dubois and Gebuhrer, 2004]. De plus, le typage complet de *HLA-C* de quelques individus, réalisé par la méthode PCR-SSP, confirme bien la relation entre les porteurs *HLA-Cw6* et les porteurs de l'haplotype à risque décrit par les TagSNPs. Ainsi, cette étude confirme de manière directe l'association du psoriasis avec l'allèle *HLA-Cw6* dans l'ensemble des familles françaises.

2.2 Locus 20p : association avec le gène *ADAM33*

2.2.1 Présentation de l'article 2 : *ADAM33*, un nouveau gène candidat de prédisposition au psoriasis

L'étude de liaison effectuée par notre équipe sur des familles françaises confirme l'existence d'un locus de prédisposition au psoriasis sur le chromosome 20p13 ($Z_{MLBscore}=2.9$, $P=0.002$). Ce large locus de 17Mb contient de nombreux gènes. Afin de réduire l'intervalle critique, une cartographie fine a été réalisée par le biais d'études d'associations de 85 polymorphismes (SNPs) répartis le long du locus dans 45 familles. Lorsqu'une association suggestive entre un marqueur et la maladie est observée ($P<0.05$), l'évaluation du déséquilibre de liaison autour de ce marqueur est effectuée pour définir les blocs de déséquilibre de liaison et ainsi, déterminer les SNPs supplémentaires à analyser pour une étude globale des gènes candidats. Une représentation graphique de la structure de la région et de la position des SNPs étudiés est présente en annexes.

ADAM33, a New Candidate for Psoriasis Susceptibility

Fabienne Lesueur^{1*}, Tiphaine Oudot¹, Simon Heath¹, Mario Foglio¹, Mark Lathrop¹, Jean-François Prud'homme², Judith Fischer^{1*}

1 Centre National de Génotypage, Evry, France, 2 Généthon, Evry, France

Psoriasis is a chronic skin disorder with multifactorial etiology. In a recent study, we reported results of a genome-wide scan on 46 French extended families presenting with plaque psoriasis. In addition to unambiguous linkage to the major susceptibility locus *PSORS1* on Chromosome 6p21, we provided evidence for a susceptibility locus on Chromosome 20p13. To follow up this novel psoriasis susceptibility locus we used a family-based association test (FBAT) for an association scan over the 17 Mb candidate region. A total of 85 uncorrelated SNP markers located in 65 genes of the region were initially investigated in the same set of large families used for the genome wide search, which consisted of 295 nuclear families. When positive association was obtained for a SNP, candidate genes nearby were explored more in detail using a denser set of SNPs. Thus, the gene *ADAM33* was found to be significantly associated with psoriasis in this family set (The best association was on a 3-SNP haplotype $P=0.00004$, based on 1,000,000 permutations). This association was independent of *PSORS1*. *ADAM33* has been previously associated with asthma, which demonstrates that immune system diseases may be controlled by common susceptibility genes with general effects on dermal inflammation and immunity. The identification of *ADAM33* as a psoriasis susceptibility gene identified by positional cloning in an outbred population should provide insights into the pathogenesis and natural history of this common disease.

Citation: Lesueur F, Oudot T, Heath S, Foglio M, Lathrop M, et al (2007) *ADAM33*, a New Candidate for Psoriasis Susceptibility. PLoS ONE 2(9): e906. doi:10.1371/journal.pone.0000906

INTRODUCTION

Psoriasis [MIM 177900] is a common hyperproliferative and chronic inflammatory skin disease with a prevalence of about 2–4% in Caucasian populations [1]. Plaque psoriasis, also known as psoriasis *vulgaris*, is by far the most common type of psoriasis, accounting for 80%–90% of all psoriasis patients. It appears as raised red scaling patches, most frequently on the elbows, knees, scalp and lower back.

This autoimmune disease is regarded as a multifactorial trait involving environmental factors such as intake of certain drugs, psychosocial stress, smoking, or climate conditions, all of which are well known triggering factors for primary manifestations or exacerbation in susceptible individuals [2]. On the other hand, evidence for a strong genetic component is provided by twin and family studies, which have shown a concordance rate of psoriasis in monozygotic twins of 65–72% vs 15–30% in dizygotic twins and a heritability of 80% [3].

In an attempt to elucidate the genetic basis of psoriasis, a number of genome-wide linkage studies have been undertaken. Overwhelming evidence for a susceptibility locus has been found for Chromosome 6p21 within the HLA region [4–11]. In particular, association studies employing linkage disequilibrium (LD) mapping have been successful in narrowing the locus to a 300kb interval [12–16] and then in identifying HLA-Cw6 as the disease allele at the 6p21 locus [16,17]. This locus, referred as *PSORS1* (Psoriasis Susceptibility 1, [MIM 177900] contributes to the familial clustering of disease (λ) to $33 < \lambda < 50\%$ [5,18]. Therefore, other susceptibility genes are likely to exist. Genome-wide linkage analyses have highlighted a number of disease loci on at least 15 chromosomes (see [11] for review). Elucidation of the disease genes in these candidate loci is hampered by their large size and by the large number of candidates in each region.

We have recently confirmed the presence of a psoriasis susceptibility locus on Chromosome 20p13, through a genome-wide scan in French extended families (Peak Z_{MLB} score = 2.9, $P = 0.002$) [11]. This region has been previously thought to be involved in the predisposition to psoriasis [4,5] and to other inflammatory disorders such as atopic dermatitis (AD, also known as eczema) and asthma [19]. Here we follow up this finding by performing fine mapping of the 17Mb region using a family-based association study design. To maximize the chances of success, we investigated the same family set

that was used for the linkage study. A total of 85 intragenic single nucleotide polymorphisms (SNPs) were initially genotyped and tested for association independently. When suggestive association was found for a marker, a denser SNP analysis was carried out to investigate the candidate genes located in the LD block. Thus, we describe the identification of *ADAM33* as being a novel psoriasis susceptibility gene. This gene encodes a member of the disintegrin and metalloprotease domain family of proteins. It has been previously associated with asthma [20–22], which confirms that immune system diseases are controlled by common susceptibility genes with general effects on dermal inflammation and immunity. However, this association could not be replicated in an independent set of 81 smaller families (173 nuclear families, Set II) also originating from France, indicating that different genetic factors may be involved in the predisposition to psoriasis in our population.

RESULTS

Stage I: Preliminary screen for SNP-based association on Chromosome 20p13

The 17Mb candidate locus on 20p13 extended from the telomere of the short arm of Chromosome 20 (D20S864) to the microsatellite D20S112 (Figure 1A), and contains 428 known

.....
Academic Editor: Juergen Kroymann, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Germany

Received May 17, 2007; **Accepted** August 23, 2007; **Published** September 19, 2007

Copyright: © 2007 Lesueur et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Centre National de Génotypage (CNG), the Association Française contre les Myopathies (AFM), and Généthon. FL was recipient of a fellowship from GénopA1e.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* **To whom correspondence should be addressed.** E-mail: lesueurf@iarc.fr (FL); fischer@cng.fr (JF)

genes. We aimed to define the boundaries of this region of linkage and to identify the causative variants. We initially selected 85 SNPs across the region for genotyping. For all SNPs, genotypes in founders satisfied the Hardy-Weinberg equilibrium. Figure 1B illustrates the results of the family-based association test (FBAT) under the assumption of linkage [23] for the 85 SNPs genotyped in 45 multigenerational families (corresponding to 295 nuclear families). Position, minor allele frequency, and FBAT results for all SNPs are given in Supplementary Table S1. Four SNPs showed some evidence for association to psoriasis ($P < 0.05$): rs12480529 located in the promoter of *DEFB127*, rs6110460 located in intron 1 of *DEFB129*, rs512625 located in the 3'UTR of *ADAM33*, and rs6053417 located in the promoter of *AK125948* encoding a hypothetical protein (Figure 1C).

Stage II: Haplotype analyses of candidate genes at the 3 loci

We used data from the International HapMap project to look at patterns of LD surrounding the SNPs showing some association with psoriasis in the CEPH Caucasian sample set [18]. The *Defensin B* (*DEFB*) gene cluster, *ADAM33* and *AK125948* were located in 3 distinct regions (Figure 1C) and the associated markers were not in LD. To capture most of the genetic variation at the

three loci, and to potentially identify allelic variant(s) predisposing to psoriasis, a tagging SNP approach was undertaken to test the candidate genes in the 3 regions (see Patients, Materials and Methods section for SNP selection). A total of 63 additional SNPs were genotyped in the same family set. Sixteen SNPs were genotyped within Region 1, 45 SNPs within Region 2 and 6 SNPs within Region 3 (Figure 1C). There was no evidence for association between the *DEFB* genes and psoriasis, nor between *AK125948* and psoriasis in the univariate SNP analyses and in the haplotypes analyses (Supplementary Table S2). However, association was observed for four additional SNPs genotyped within Region 2: three of them were *ADAM33* intronic SNPs (rs677044, rs597980, rs44707), and the fourth one (rs6076542) was in intron 3 of *SIGLEC1*, a gene located 5kb from *ADAM33*. Results of the association tests for the 45 SNPs in Region 2 are presented in Table 1.

Evidence for effects of combinations of *ADAM33* SNPs on the risk of psoriasis

Due to the low pairwise LD (Supplementary Table S3) and to the elevated number of haplotypes generated at the *ADAM33* locus, haplotypes covering the whole region could not be constructed. However, because multiple SNPs may act in combination to alter the risk of psoriasis, transmissions of all possible 2- or 3-SNP

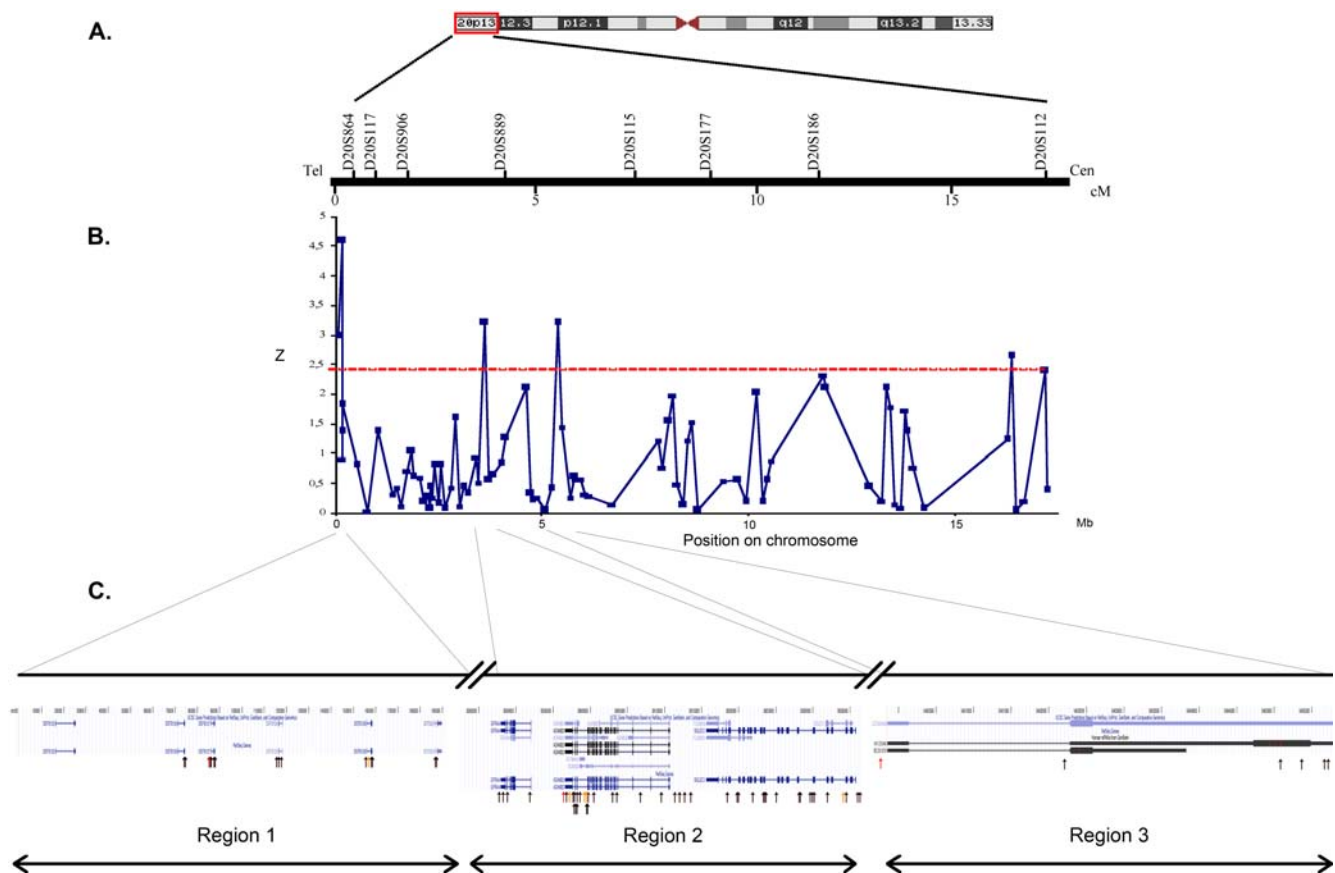


Figure 1. Schematic representation of the psoriasis susceptibility locus on Chromosome 20p13. A. Genetic map of the linkage interval (tel, telomere; cen, centromere). Position of microsatellites used in the linkage analysis is indicated in centimorgans (cM). B. Z plot for association tests performed with FBAT under the assumption of linkage, for SNPs selected in Stage I. Position of SNPs is indicated in megabases (Mb). The dotted line indicates the threshold for significance of the association test (a Z score > 3 corresponds to a $P < 0.05$). C. Detailed physical map on the contig NT_011387.8 at the 3 candidate loci. Positions of the SNPs genotyped in stage I and in stage II are shown with arrows. Red arrows indicate SNPs showing evidence for association ($P \leq 0.05$) in stage I; orange arrows indicate SNPs showing evidence for association ($P \leq 0.05$) in stage II; black arrows indicate SNPs showing no evidence for association in the univariate analysis.
doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001

Table 1. SNPs genotyped at the ADAM33 locus and FBAT results for the univariate analysis.

SNP number	SNP ID	Other name ^a	Region ^b	Amino acid	Position ^c	Nucleotide change ^d	MAF ^e	P^f	Database
1	rs692862		GFRA4 IVS6+1828 bp		3578110	G>A	0.14	0.26	dbSNP
2	rs633924		GFRA4 exon 6, 3'UTR		3580057	T>C	0.33	0.36	dbSNP
3	rs2853208		GFRA4 exon 5	P237P	3580823	T>C	0.48	0.26	dbSNP
4	rs6084432		GFRA4 IVS1+347 bp		3583653	G>A	0.16	0.93	HapMap
5	rs512625		ADAM33 IVS22+243 bp		3588378	G>A	0.30	0.04	HapMap
6	rs2787094	V_4	ADAM33 exon 22, 3'UTR		3589161	G>C	0.22	0.43	dbSNP
7	rs677044		ADAM33 exon 22, 3'UTR		3589431	A>G	0.22	0.03	HapMap
8	rs543749	V_-1	ADAM33 IVS22-33 bp		3589679	G>T	0.12	0.56	dbSNP
9	rs628977	V_-2	ADAM33 IVS22-75 bp		3589721	C>T	0.39	0.17	dbSNP
10	rs2280089	T_+1	ADAM33 IVS20+66 bp		3590127	G>A	0.13	0.74	HapMap
11	rs2280090	T_2	ADAM33 exon 20	P774S	3590205	G>A	0.13	0.58	dbSNP
12	rs2280091	T_1	ADAM33 exon 20	M764T	3590234	A>G	0.14	0.61	HapMap
13	rs574174	ST_+7	ADAM33 IVS20-498 bp		3590694	C>T	0.18	0.35	dbSNP
14	rs597980	ST_+5	ADAM33 IVS19+400 bp		3591165	C>T	0.45	0.04	dbSNP
15	rs44707	ST_+4	ADAM33 IVS19+339 bp		3591226	A>C	0.41	0.01	dbSNP
16	rs598418		ADAM33 IVS19+296 bp		3591269	T>C	0.39	0.12	dbSNP
17	rs2853209	S_+1	ADAM33 IVS19+93 bp		3591472	T>A	0.48	0.12	dbSNP
18	rs3918396	S_1	ADAM33 exon 19	V710I	3591765	G>A	0.09	0.88	dbSNP
19	rs612709	Q_-1	ADAM33 IVS16+21 bp		3592207	G>A	0.13	0.85	dbSNP
20	rs511898	F_+1	ADAM33 IVS6+66 bp		3595085	C>T	0.34	0.29	dbSNP
21	rs2787095		ADAM33 IVS4-191 bp		3595943	G>C	0.39	0.21	HapMap
22	rs487377		ADAM33 IVS2+3808 bp		3598931	G>A	0.19	0.47	dbSNP
23	rs2853213		ADAM33 IVS1+899 bp		3601840	C>G	0.35	0.16	dbSNP
24	rs2853215		ADAM33 IVS1-3516 bp		3606255	G>A	0.27	0.87	HapMap
25	rs535964		ADAM33 IVS1-3747 bp		3606486	C>T	0.35	0.84	dbSNP
26	rs1046919		ADAM33 IVS1-5086 bp		3607825	T>C	0.19	0.09	HapMap
27	rs656635		ADAM33 IVS1-5343 bp		3608082	G>T	0.50	0.70	HapMap
28	rs17701662		SIGLEC1 IVS18+97 bp		3610512	A>T	0.05	0.19	HapMap
29	rs4815596		SIGLEC1 IVS17+186 bp		3611800	G>A	0.14	0.13	HapMap
30	rs3859664		SIGLEC1 IVS17+96 bp		3611891	C>T	0.40	0.46	HapMap
31	rs3827110		SIGLEC1 IVS13+30 bp		3614064	G>C	0.08	0.95	HapMap
32	rs3746638		SIGLEC1 exon 11	A974V	3615333	A>G	0.46	0.63	HapMap
33	rs709012		SIGLEC1 exon 11	P919H	3615498	G>T	0.38	0.80	HapMap
34	rs754526		SIGLEC1 IVS11-330 bp		3615899	A>T	0.05	0.20	HapMap
35	rs525339		SIGLEC1 IVS10+218 bp		3617014	A>G	0.38	0.47	HapMap
36	rs12624921		SIGLEC1 IVS7-153 bp		3620259	A>G	0.05	0.29	HapMap
37	rs12624922		SIGLEC1 IVS7-174 bp		3620280	A>G	0.05	0.20	HapMap
38	rs6139180		SIGLEC1 IVS6+705 bp		3621283	A>G	0.11	0.72	HapMap
39	rs4813636		SIGLEC1 IVS6+280 bp		3621708	A>G	0.37	0.46	HapMap
40	rs1018493		SIGLEC1 exon 6	S502S	3622011	T>C	0.36	0.44	dbSNP
41	rs611847		SIGLEC1 exon 5	N350N	3624022	C>T	0.32	0.85	HapMap
42	rs6076542		SIGLEC1 IVS3+423 bp		3625997	T>C	0.02	0.04	HapMap
43	rs6037651		SIGLEC1 exon 3	M221V	3626436	T>C	0.37	0.26	HapMap
44	rs735710		SIGLEC1 IVS1-5063 bp		3632839	A>G	0.07	0.61	HapMap
45	rs4815597		SIGLEC1 IVS1-9842 bp		3637618	C>T	0.27	0.55	HapMap

^aName according to Van Eerdewegh et al. [20]^bPosition according to reference sequence NM_022139 for GFRA4, NM_025220 for ADAM33 and NM_023068 for SIGLEC1^cReference sequence: NT_011387.8, build 36 version 2 of NCBI's genome annotation^dMost common allele is given first^eMinor Allele Frequency in the studied sample set^fFBAT association test P-value under assumption of linkage

doi:10.1371/journal.pone.0000906.t001

haplotypes to affected individuals were successively examined. The best association for the 2-SNP haplotypes was obtained for the pair SNP5/SNP23 ($P=0.0005$, based on 1,000,000 permutations). But generally stronger associations were obtained for the 3-SNP haplotypes. The ten best 3-SNP haplotypes are presented in Table 2. Associated haplotypes involved exclusively SNPs within *ADAM33*, and revealed both risk and protective effects of *ADAM33* alleles depending on the SNP combination.

Association of ADAM33 with psoriasis is independent of HLA-Cw6 status

The 20p13 locus is likely to segregate independently of *PSORS1* in the psoriasis families [11]. However, a potential interaction between *ADAM33* and *HLA-Cw6* alleles was tested. *HLA-Cw6* positive patients were identified using SNPs in strong LD with the risk allele (namely HCR-325 C>T (rs130076), HCR-1723 G>T (rs130079), HCR-2327 C>G (rs1576) and CDSN971 C>T (rs1062470) [24,25]. As expected, those markers define a strongly associated haplotype in our population ($P<0.000001$ for haplotype H2, based on 1,000,000 permutations, Supplementary Table S4). Association between *ADAM33* and psoriasis was then monitored using FBAT when stratifying the families according to the presence or absence of this risk haplotype. Although the number of informative families was reduced, the associations between *ADAM33* 3-SNPs haplotypes and psoriasis were still observed in the group of patients not carrying *HLA-Cw6*, indicating that the 2 loci act independently. As expected, the associations were less significant in the group of patients carrying *HLA-Cw6*, due to the stronger contribution of the 6p21 locus to psoriasis susceptibility (Supplementary Table S5).

Genetic heterogeneity between large, multigenerational families and smaller families segregating psoriasis

We attempted to confirm our findings of association between *ADAM33* and psoriasis in a broader family sample. Thus, a second set of 81 smaller French families was investigated (Set II). Those families had not been included in the linkage study due to the low informativity of the pedigrees for such studies. However, they represented 173 nuclear families on which the FBAT transmission disequilibrium test could be performed (Table 3). Therefore, the 15 SNPs contributing to the best combinations were genotyped in Set II (Table 4). No association was found in the individual or combined SNP analyses when analyzing Set II independently, but same 3-SNP haplotype associations were confirmed when combining Set I and Set II. It is likely that the discrepancy between the 2 family sets was due to a lower informativity of Set II because of the difference in the pedigree structures (Table 3). Indeed, the numbers of informative nuclear families for the 3-SNP haplotypes giving the best associations in Set I were lower in Set II than in Set I (Table 2). Moreover, the results of *HLA-C* tagging SNPs, known to be strongly associated with psoriasis, illustrated the weak power of Set II for performing family-based association tests. For example, for SNP rs1062470, a P of 0.0001 was obtained for Set I, which had 86.7% (39/45) of informative families, whereas a P of 0.02 was obtained for Set II but this set had only 50.6% (41/81) of informative families. However, a significant association was observed for the combined sets ($P=0.000006$, Supplementary Table S4).

DISCUSSION

A common genetic component to autoimmune susceptibility had been initially shown by twin and adoption studies and by increased

Table 2. Most significant under- and over-transmitted 3-SNP haplotypes for Region 2.

SNP combination ^a	Haplotype	Set I			Set II			Set I + Set II									
		Frequency %	Number of informative families ^b	Z ^c	P	1,000,000 Permutations	Frequency %	Number of informative families ^b	Z ^c	P	1,000,000 Permutations	Frequency %	Number of informative families ^b	Z ^c	P	1,000,000 Permutations	
SNP 5/10/25	AGT	10	54.6	(-3.32)	0.0009	0.00004	11	37.8	0.90	0.37	0.39	10	37.8	0.90	0.37	0.39	0.01
SNP 5/11/23	AGG	11	70.5	(-3.33)	0.0009	0.0003	10	28.5	1.44	0.15	0.16	11	28.5	1.44	0.15	0.16	0.03
SNP 5/25/26	ATT	10	54.1	(-3.32)	0.0009	0.0007	12	36.4	1.12	0.26	0.29	11	36.4	1.12	0.26	0.29	0.02
SNP 5/26/27	ATG	9	51.2	(-3.32)	0.0009	0.001	9	20.8	0.64	0.52	0.57	9	20.8	0.64	0.52	0.57	0.02
SNP 7/9/23	ACC	32	133.3	3.36	0.0008	0.001	29	46.2	0.91	0.36	0.34	31	46.2	0.91	0.36	0.34	0.002
SNP 7/16/23	ATC	32	127.7	3.31	0.0009	0.002	28	41.1	0.69	0.49	0.47	31	41.1	0.69	0.49	0.47	0.003
SNP 7/21/23	AGC	22	105.7	3.37	0.0008	0.0007	15	32.5	(-10.004)	0.99	0.96	19	32.5	(-10.004)	0.99	0.96	0.003
SNP 15/23/24	ACG	33	125.9	3.45	0.0006	0.002	30	48.8	0.29	0.77	0.78	32	48.8	0.29	0.77	0.78	0.005
SNP 16/23/27	TCG	11	67.8	3.49	0.0005	0.001	11	18.4	(-11.10)	0.27	0.30	11	18.4	(-11.10)	0.27	0.30	0.04
SNP 16/26/27	TCG	10	60.1	3.34	0.0008	0.0006	8	14.7	0.13	0.89	0.95	9	14.7	0.13	0.89	0.95	0.002

^aSNP numbers refer to SNPs in Table 1.
^bNumber of informative families estimated by FBAT
^cScore given by the association test on haplotypes performed by FBAT, under the assumption of linkage. A positive Z indicates an increased risk, whereas a negative Z indicates a protective effect on the expression of psoriasis.
 doi:10.1371/journal.pone.0000906.t002

Table 3. Comparison of Set I and Set II.**A. Description of pedigrees used in the association study**

Family set	Number families	Number of nuclear families	Number of subjects	Average number of subjects per family	Number of genotyped subjects (Affected)	Average number of genotyped subjects per family (Affected)
Set I	45	295	1161	25.80	926 (346)	20.58 (7.69)
Set II	81	173	668	8.25	539 (235)	7.32 (2.90)

B. Distribution of pedigrees according to the number of nuclear families per pedigree

Number of nuclear families per pedigree	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10	Total
Set I	1	5	5	6	2	8	4	1	2	4	7	45
Set II	43	8	16	10	1	2	0	0	1	0	0	81

C. Distribution of nuclear families according to the sibship size

Number of sibships per nuclear families	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	14	Total
Set I	75	91	58	31	10	8	11	5	3	2	1	295
Set II	40	66	47	11	5	4	0	0	0	0	0	173

doi:10.1371/journal.pone.0000906.t003

risk to siblings [26]. Later, linkage studies demonstrated that autoimmune diseases share a limited number of loci [27,28], reinforcing the idea that common susceptibility genes control them. Recently, we identified a susceptibility locus for psoriasis on Chromosome 20p13 [11], a region also linked to AD and asthma, two other inflammatory disorders [19]. Here, using a family-based association design to interrogate the locus, we identified several combinations of SNPs within *ADAM33*, a gene that has been associated with asthma in many studies, to be strongly associated with psoriasis in multigenerational French families.

Due to the large number of all possible 2- and 3-SNP combinations tested, the issue of multiple testing should be addressed here. A Bonferroni correction, although too conservative because the SNPs in the candidate region were all correlated, could be applied. When considering all possible 2-SNP combinations with one of the

5 SNPs associated in the univariate analysis, 110 tests are performed. Therefore, the threshold for a significant *P*-value should be <0.00045. The best 2-SNP combination (SNP5/SNP23) gives a *P*=0.0005, based on 1,000,000 permutations, in favour of a significant association with psoriasis. Moreover, these 2 SNPs are also included in some of the best 3-SNP combinations (Table 2), which is again in favor of a true association.

These associations were not observed in a set of much smaller families. Although statistical type I errors in Set I cannot be totally discarded here, the discrepancy between the 2 family sets could be accounted for by a lack of informativity of Set II families. Another possible explanation could be that the selection of highly predisposed family enriched Set I for individuals carrying risk alleles at a smaller number of loci with stronger effects, whereas psoriasis susceptibility in Set II may be due to a higher number of

Table 4. Univariate SNP analysis in Set II and in combined sets.

SNP number	SNP ID	Gene	Set II		Set I + Set II	
			Number of informatives families	<i>P</i> ^a	Number of informatives families	<i>P</i> ^a
5	rs512625	intergenic	32	0.19	65	0.42
7	rs677044	<i>ADAM33</i>	34	0.98	62	0.10
9	rs628977	<i>ADAM33</i>	35	0.80	69	0.22
10	rs2280089	<i>ADAM33</i>	26	0.62	54	0.96
11	rs2280090	<i>ADAM33</i>	24	0.79	52	0.79
14	rs597980	<i>ADAM33</i>	28	0.50	63	0.17
15	rs44707	<i>ADAM33</i>	35	0.60	71	0.11
16	rs598418	<i>ADAM33</i>	35	0.63	71	0.36
21	rs2787095	<i>ADAM33</i>	36	0.64	70	0.46
23	rs2853213	<i>ADAM33</i>	35	0.84	69	0.34
24	rs2853215	intergenic	30	0.73	61	0.74
25	rs535964	intergenic	32	0.82	67	0.99
26	rs1046919	intergenic	26	0.92	59	0.14
27	rs656635	intergenic	39	0.77	71	0.63
42	rs6076542	<i>SIGLEC1</i>	5	- ^b	15	0.53

Only SNPs showing some association with psoriasis in Set I, in the univariate or in the 3-SNP haplotype analyses, were tested in Set II.

^aFBAT association test *P*-value under assumption of linkage.

^bAssociation test could not be performed due to insufficient number of informative families.

doi:10.1371/journal.pone.0000906.t004

loci with weaker effects. Thus, the contribution of specific *ADAM33* alleles to the familial clustering and individual risk prediction of psoriasis is likely to be relatively small, and these issues of case selection should be addressed in future replication studies.

Nevertheless, our findings can be the source of valuable physiological insights, since several *ADAM33* SNPs have been found to be associated with asthma and with bronchial hyper-responsiveness in Caucasians, in African Americans and in Hispanics [20–22]. An association of *ADAM33* with allergic rhinitis has also been reported in the Japanese population [29]. This first report of an association between *ADAM33* and psoriasis confirms that common biological pathways may be involved in the etiology of psoriasis and other clinically distinct immune-mediated diseases.

Although clinical data on inflammatory and autoimmune diseases other than psoriasis were limited in our family sample, we examined personal or family history of atopy (AD, asthma and allergic rhinitis) and of seborrheic dermatitis (SD) retrospectively from the data available from the questionnaire answered by family members (Set I). SD was reported in 34 families (75.6%, 128 subjects), AD in 25 families (55.6%, 63 subjects), asthma in 22 families (47.8%, 34 subjects), and allergic rhinitis in 5 families (10.9%, 5 subjects). These data indicate a higher incidence of chronic inflammatory diseases in the psoriasis families than in the general population, except for allergic rhinitis (Incidences of SD, AD, asthma and allergic rhinitis in France are respectively: 1–3%, 2–5%, 5–7% and 15%) and support the existence of common genes interacting with other genetic or environmental factors to result in distinct immunologic abnormalities. As in the general population, these diseases rarely occurred in the same patient in our family sample, indicating that susceptibility alleles for these disorders are likely to be different. Indeed, *ADAM33* SNPs that have been associated with asthma are not the SNPs defining protective and risk haplotypes for psoriasis [20]. The recently reported colocalization of the susceptibility loci for psoriasis (*PSORS4*) and atopic dermatitis (*ATOD2*) on Chromosome 1q21 also supports this hypothesis [30]. Although immunologic processes in psoriasis and AD are quite different and the two diseases rarely occur together in the same patient, the possibility of a specific misregulation of the *LOR* gene at 1q21, which is down-regulated in psoriasis, and up-regulated in AD has been suggested [30]. In the light of our data, the involvement of *ADAM33* should be further investigated in AD as well.

Once an allelic association with the disease has been demonstrated, the identification of causal variants is less straightforward. The *ADAM33* gene consists of 22 exons that have been resequenced in different populations for SNP identification [20,31]. Of the numerous SNPs described in the public SNP databases, only 4 validated SNPs occur in the coding region of the gene and, of these, 3 are non-synonymous. We have excluded an association between two of them, T764M (rs2280091) and S774P (rs2280090), and psoriasis (Table 1). The third SNP, A178T (rs3918392), was also genotyped in our family set, but association tests could not be performed due to its low frequency (3%) in our population. In asthma studies, it has been proposed that 3'UTR polymorphisms may be significant [32], although functional investigations of some of them have so far been unsuccessful [33]. Interestingly, SNP 7 (rs677044) in the 3'UTR of *ADAM33* showed some association when analyzed on its own and was present on all 4 most significant protective haplotypes (Table 2). However, this SNP was also present on other haplotypes not associated with the disease. Therefore, a functional role of this SNP in psoriasis susceptibility should be discarded. Finally, *ADAM33* gene undergoes complex alternative splicing with several variant transcripts and their relative functional

significance to each other is not clear [33,34]. It has been suggested that some of the *ADAM33* polymorphisms may affect alternative splicing, splicing efficiency or mRNA turnover [20] but such functional effects for SNP5 (rs512625) in the 3' region of *ADAM33* and for SNP14 (rs597980) and SNP15 (rs44707) in intron 19 of the gene were not investigated in this study.

It has already been noticed that the individual effect of a variant can be too weak to be detected individually and that interactions of multiple SNPs within the same gene can affect a phenotype [35]. In complex situations of gene involvement, Jannot *et al.* showed that testing combinations of SNPs could provide better power than testing each single SNP for association [36]. In type 2 diabetes, *CAPN10* and *NOD2* are two examples where haplotypes made up of non-coding variants have been associated with disease phenotypes in complex fashion while no association was seen in the univariate SNP analyses [37]. The same situation is observed in the case of asthma and psoriasis, where the association with *ADAM33* is stronger when combinations of SNPs are examined.

A recent study confirmed that the *ADAM33* locus shows extended linkage disequilibrium upstream of *ADAM33* to *GFR44*, as well as downstream including *SIGLEC1* (also named sialoadhesin *SM*) [38]. The region can be divided into 5 haplotype blocks, *ADAM33* being situated between block 4 and 5, with an increased recombinatory rates around exons S to V of *ADAM33*. Half of the SNPs included in the associated combinations here lie in exon S or upstream (SNPs 5, 7, 9, 10, 11, 15, 16) and the second half lie downstream exon F (SNP 21, 23, 24, 25, 26, 27). Resolution of LD maps and block definition at *ADAM33* locus is still noisy and it is likely that yet unidentified variant(s) within the *ADAM33* gene or within distant regulatory elements may be responsible for asthma or psoriasis. Deep resequencing of the full region would be required to identify such functional relevant variation.

Psoriasis is a chronic disorder in which T-cell-mediated inflammation causes thickening of the skin. Conversely, it has been also hypothesized that in psoriatic patients, the lack of control of the outer skin cells may lead to the greatly increased production of cells that characterizes psoriasis. This, in turn, may lead to an abnormality of the blood vessels and the inflammation characteristic of psoriasis. Another possibility is that epidermal skin cells fail to mature into the flat, thickened, “cornified” layer they are supposed to. As a result, the epidermis tries to produce more cells than usual leading to the thickened epidermis, which then leads to inflammation. ADAM proteins have a complex organization that includes a signal sequence and the following domains: pro, metalloprotease (including a zinc-binding sequence), disintegrin, cysteine-rich, epidermal growth factor, transmembrane, and cytoplasmic tail domains. The proteins have diverse functions which include adhesion, cell fusion, intracellular signaling and the shedding of the extracellular portion of proteins such as cytokines and growth factors, leading to the soluble forms of these proteins. Expression data suggest that *ADAM33* is expressed in most human tissues, including skin [39]. It is biologically plausible that *ADAM33* is relevant to the development of psoriasis because it may be involved in the inflammatory response, or in cell-cell and cell-matrix interactions that are essential for the development and maintenance of a tissue; likewise, extracellular matrix proteolysis is an important contributor to skin remodeling, which when altered might ultimately lead to significant desquamation or, perhaps, absence of cell maturation.

To conclude with, this is the first report of an association between *ADAM33* and psoriasis. Confirmation of our findings in different populations would represent an important development in understanding susceptibility to psoriasis, allergy, and closely related phenotypes. The importance of this observation should be

evaluated by further delineating the biological role of *ADAM33* in psoriasis.

MATERIALS AND METHODS

Families

The French psoriasis study was approved by the Ethics Committee of Le Kremlin-Bicêtre Hospital in 1995 (CCPPRB) [40]. Briefly, families were identified through a media campaign between 1996 and 2001 at G n thon, using posters in the Paris M tro and information in news magazines, radio and television. Clinical diagnoses were checked by systematic telephone calls to every family member, affected or non-affected, for each family, at least twice during four years by dermatologists using a standard questionnaire. The attending physician of each patient was also contacted, usually by mail, which led to confirmation of the diagnosis in over 75% of cases. Thus, 126 families were enrolled in the genetic study and provided blood samples. These families were divided in two non-homogeneous family sets (Set I and Set II): Set I corresponded to the 45 highly predisposed multigenerational families used for the initial genome-wide scan, and included on average 8 affected members per family [11], whereas Set II corresponded to the 81 remaining smaller families (3 affected members per family on average, Table 3). One inbred large family was reported in Set I, with parents who were first cousins (inbred coefficient for children = 1/16). DNA was extracted from whole blood using standard procedures after written informed consent of subjects. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles.

SNP selection

SNPs were initially identified through the HapMap database. A list of 402 validated SNPs located between the microsatellite markers D20S864 and D20S112 was generated. In order to perform a first scanning of the region with a limited number of SNPs, biallelic markers were filtered according to the following criteria: selected markers had a minor allele frequency (MAF) $\geq 20\%$ in Caucasian populations, were located within known genes or nearby (+10 kb upstream and downstream of known genes), and SNPs with ambiguous flanking sequences were excluded for genotyping. The population frequencies for the SNPs were taken from the CEU HapMap population (CEPH collection of Utah residents of northern and western European ancestry). Thus, 85 SNPs whose position was representative of the overall marker distribution were eligible for genotyping for Stage I. These SNPs were located in or near 65 different genes and were not in linkage disequilibrium with each other (1 SNP/137 kb on average).

To select additional SNPs in the 3 candidate regions on 20p13 (Stage II), different strategies were applied depending on the availability of SNP data for each candidate gene. When coverage of a gene with HapMap SNPs was sufficient, we used the Tagger program to select SNPs that efficiently tagged all common variations of the candidate genes [41]. This was the case for *SIGLEC1* and *AK125945*: 17 HapMap tagging SNPs across *SIGLEC1* (Table 1) and five HapMap tagging SNPs across *AK125945* (Supplementary Table S2) were genotyped in family set I. For these two genes, two additional common SNPs that were absent in HapMap database (rs1018493, located in exon 6 of *SIGLEC1* and rs1060236, located in the untranslated region of *AK125945*) were also genotyped.

When coverage with HapMap SNPs was insufficient, the density of markers across a candidate was increased using validated SNPs from dbSNP database or from the literature. This was the case for *ADAM33*. This gene had been resequenced in

different populations [20,31], and a number of reported SNPs were not present in the HapMap database. Therefore, in addition to 8 HapMap SNPs, 15 other SNPs were selected. Those included all 3 validated nonsynonymous SNPs (with frequency $\geq 5\%$ in Caucasians) and SNPs that had been previously shown to be associated with asthma either in univariate or in haplotype analyses. These SNPs included F_-1 (rs3918392), F_+1 (rs511898), Q_-1 (rs612709), S_1 (rs3918396), ST_+4 (rs44707), ST_+7 (rs574174), V_-2 (rs628977), V_-1 (rs543749) and V_4 (rs2787094) [20] (Table 1). Two additional SNPs previously found to be associated with asthma, V_2 (rs3918400) and V_5 (rs3746631), did not assay successfully; however, given the moderate to strong levels of LD of SNPs previously documented, we expected the studied SNPs across the region to capture most of the haplotypic variation.

Very few SNPs had been identified in *GFR4*, despite the fact that the whole coding sequence of the gene had been resequenced ([42] and personal communication). Therefore, only 4 SNPs were selected for genotyping in our family set.

Finally for genes within Region 1 (*DEFB125*, *DEFB126*, *DEFB127*, *DEFB128*, *DEFB129* and *DEFB32*), incomplete SNP data were available in the public SNP databases when this study was initiated. Therefore, we resequenced the entire coding sequence and the exon/intron junctions of the 6 *DEFB* genes in 58 unrelated Caucasian controls. Tagging SNPs were identified using the tagsnps program [43].

SNP genotyping

Genotyping was carried out using Taqman[®] according to manufacturer's instructions. Primers and probes were supplied directly by Applied Biosystems as Assays-by-Design[™]. All assays were carried out in 384-well plates. Each plate included negative controls (with no DNA) and positive controls were duplicated on a separate quality control plate. Plates were read on the ABI PRISM 7900 using the Sequence Detection Software (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Failed genotypes were not repeated.

Genotypes were checked for Mendelian inheritance errors using FBAT [23] and PEDSTATS was used to discard SNPs which deviate from Hardy-Weinberg Equilibrium in unrelated subjects [44].

Statistical analyses

Family based association analysis was carried out using the FBAT program to examine the transmission rates of marker alleles under the assumption of linkage. The FBAT test is a multiallelic test based on the classic transmission/disequilibrium test (TDT) developed by Spielman *et al.* [45]. It considers parents heterozygous for a certain allele at the marker locus associated with the disease and evaluates the frequency with which that allele is transmitted to affected offspring. In each trio, the untransmitted alleles of the parents serve as controls. The FBAT method permits analysis of family structures larger than trios. It has been shown that, when data on parents are missing, one case and two sibs bring similar power levels to trios and adding sibs when parents are available increases power [23]. The FBAT software decomposes pedigrees into individual nuclear families and treats them as independent in most of the calculations. The pedigree's contribution to the FBAT test statistics is then obtained by summing over all nuclear families within the pedigree. However, in the case where linkage is present and the null hypothesis states "linkage, but no association", the genotypes of the different nuclear families derived from one pedigree are correlated. Even with a single nuclear family, the transmissions to multiple sibs are correlated

when linkage is present. Therefore, when testing for association in an area of known linkage with multiple sibs in a family or when multiple families in pedigree occur, an empirical variance for the test statistics should be used. We used the `-e` option of FBAT to compute the “corrected” test statistic, and gave the *P*-value “*P*” corresponding to this corrected test statistic. Furthermore, haplotype analysis was performed using the HBAT function of FBAT, under the assumption of linkage. This is a method for estimating genetic association from probabilities of haplotype transmission to affected offspring. To circumvent the problem of multiple testing due to the large number of statistical tests performed simultaneously in the association study, the false discovering rate was controlled and permutation *P*-values were computed with FBAT program (1,000,000 permutation tests were performed).

Electronic databases and programs

HapMap data are available at <http://www.hapmap.org> (public data released n° 6 at 2005-03-01). The dbSNP database is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. The University of California Santa Cruz assembly of the genome is available at <http://genome.ucsc.edu/>.

The FBAT program version 1.5.5 is available at <http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/>. PEDSTATS is available at <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/PedStats/>. Tagsnps is available at <http://www.rcf.usc.edu/~stram/tagSNPs.html>. Tagger on Haploview, version 3.2 is available at <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/using.php>.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1 Results of the association tests for SNPs selected in Stage I.

REFERENCES

- Nevitt GJ, Hutchinson PE (1996) Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* 135: 533–537.
- Tagami H (1997) Triggering factors. *Clin Dermatol* 15: 677–685.
- Bowcock AM, Cookson WO (2004) The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1: R43–55.
- Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, et al. (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* 6: 349–1356.
- Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, et al. (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6: 813–820.
- Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A, Yhr M, Inerot A, et al. (1999) A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 105: 523–529.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, et al. (1999) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered* 49: 2–8.
- Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, et al. (2001) Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet*, 38: 7–13.
- Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, et al. (2002) Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans. *J Invest Dermatol* 119: 1361–1366.
- Sagoo GS, Tazi-Ahmini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, et al. (2004) Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol* 122: 1401–1405.
- Lesueur F, Lefèvre C, Has C, Guilloud-Bataille M, Oudot T, et al. (2007) Confirmation of psoriasis susceptibility loci on chromosome 6p21 and 20p13 in French families. *Journal of Investigative Dermatology*, Mar 8 [Epub ahead of print].
- Hewett D, Samuelsson L, Polding J, Enlund F, Smart D, et al. (2002) Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map. *Genomics* 79: 305–314.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001 (0.16 MB DOC)

Table S2 Results for DEFB genes and for AK125948 gene.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001 (0.10 MB DOC)

Table S3 Pairwise LD (*D'*) for the 17 SNPs genotyped in the whole family set.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001 (0.02 MB XLS)

Table S4 Results for HLA-Cw6 tagging SNPs (PSORS1 locus).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001 (0.09 MB DOC)

Table S5 Results for most significant under- and over-transmitted ADAM33 3-SNP haplotypes when stratifying according to HLA-Cw6 status in patients (for Set I).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0000906.g001 (0.07 MB DOC)

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to all the families who have so willingly participated in this study. We are also indebted to the Association Pour la Lutte Contre le Psoriasis (APLCP), and to the National Psoriasis Foundation (NPF) for their support. We would like to thank Alison Dunning for helpful discussions and critical reading of the manuscript and Susan Cure for her help in writing the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JF ML FL. Performed the experiments: FL TO. Analyzed the data: SH FL TO. Contributed reagents/materials/analysis tools: ML SH MF. Wrote the paper: FL. Other: Collected the materials: JP JF.

- Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, et al. (2002) Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 71: 554–564.
- Lench N, Iles MM, Mackay I, Patel R, Sagoo GS, et al. (2005) Single-point haplotype scores telomeric to human leukocyte antigen-C give a high susceptibility major histocompatibility complex haplotype for psoriasis in a caucasian population. *J Invest Dermatol* 124: 545–552.
- Helms C, Saccone NL, Cao L, Daw JA, Cao K, et al. (2005) Localization of PSORS1 to a haplotype block harboring HLA-C and distinct from cornodesmosin and HCR. *Hum Genet* 118: 466–476.
- Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, et al. (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* 78: 827–851.
- Elder JT (2006) PSORS1: linking genetics and immunology. *J Invest Dermatol* 126: 1205–1206.
- The International Psoriasis Genetics Study (2003) Assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet* 73: 430–437.
- Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, et al. (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27: 372–373.
- Van Eerdedewegh P, Little RD, Dupuis J, Del Mastro RG, Falls K, et al. (2002) Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418: 426–430.
- Howard TD, Postma DS, Jongepier H, Moore WC, Koppelman GH, et al. (2003) Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (ADAM33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol* 112: 717–722.
- Werner M, Herbon N, Gohlke H, Altmuller J, Knapp M, et al. (2004) Asthma is associated with single-nucleotide polymorphisms in ADAM33. *Clin Exp Allergy* 34: 26–31.
- Lang C, Laird NM (2002) Power calculations for a general class of families-based association tests: dichotomous traits. *Am J Hum Genet* 71: 575–584.
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, et al. (2002) Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* 11: 589–597.

25. Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, et al. (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* 13: 2361–2368.
26. Vyse TJ, Todd JA (1996) Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85: 311–318.
27. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison WE, et al. (1998) Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9979–9984.
28. Cookson W (1999) The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402: B5–11.
29. Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, et al. (2004) Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. *Clin Exp Allergy* 34: 1192–1201.
30. Giardina E, Sinibaldi C, Chini L, Moschese V, Marulli G, et al. (2006) Co-localization of susceptibility loci for psoriasis (PSORS4) and atopic dermatitis (ATOD2) on human chromosome 1q21. *Hum Hered* 61: 229–236.
31. Chae SC, Yoon KH, Chung HT (2003) Identification of novel polymorphisms in the Adam33 gene. *J Hum Genet* 48: 278–281.
32. Holgate ST, Davies DE, Murphy G, Powell RM, Holloway JW (2003) ADAM 33: just another asthma gene or a breakthrough in understanding the origins of bronchial hyperresponsiveness? *Thorax* 58: 466–469.
33. Umland SP, Garlisi CG, Shah H, Wan Y, Zou J, et al. (2003) Human ADAM33 messenger RNA expression profile and post-transcriptional regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 571–582.
34. Powell RM, Wicks J, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE (2004) The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 13–21.
35. Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, et al. (2000) Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10483–10488.
36. Jannot AS, Essioux L, Reese MG, Clerget-Darpoux F (2003) Improved use of SNP information to detect the role of genes. *Genet Epidemiol* 25: 158–167.
37. Cox NJ, Hayes MG, Roe CA, Tsuchiya T, Bell GI (2004) Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale. *Diabetes* 53: S19–25.
38. Wjst M (2007) Public data mining shows extended linkage disequilibrium around ADAM33. *Allergy* 62: 444–446.
39. Yoshinaka T, Nishii K, Yamada K, Sawada H, Nishiwaki E, et al. (2002) Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene* 282: 227–236.
40. Mahé E, Lahfa M, Mansouri S, Mosharraf-Olmok H, Rebours JL, et al. (2002) Physicians' response to a letter to confirm diagnosis in a genetic study of psoriasis. *Eur J Dermatol* 12: 66–69.
41. de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, et al. (2005) Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 37: 1217–1223.
42. Cebrian A, Lesueur F, Martin S, Leyland J, Ahmed S, et al. (2005) Polymorphisms in the initiators of RET (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 6268–6274.
43. Stram DO (2004) Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol* 27: 365–374.
44. Wigginton JE, Abecasis GR (2005) PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* 21: 3445–3447.
45. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506–516.

Supplementary Table S1. Results of the association tests for SNPs selected in Stage I.

SNP	MAF ^a	Gene	Position ^b	Distance from previous SNP	P ^c
rs12480529	0.32	<i>DEFB127</i>	77454	-	0.05
rs6110460	0.46	<i>DEFB129</i>	148168	70714	0.01
rs1053783	0.07	<i>DEFB129</i>	150306	2138	0.41
rs373225	0.37	<i>DEFB32</i>	178507	28201	0.25
rs399083	0.34	<i>DEFB32</i>	179688	1181	0.16
rs282163	0.17	<i>TCF15</i>	528089	348401	0.44
rs1045410	0.34	<i>C20orf55</i>	766666	238577	0.98
rs6040024	0.19	<i>PSMF1</i>	1048262	281596	0.25
rs3795135	0.22	<i>NSFL1C</i>	1381841	333579	0.74
rs2253429	0.49	<i>PTPNS1L2, SIRPB1</i>	1482954	101113	0.66
rs6110838	0.42	<i>SIRPB2</i>	1585502	102548	0.90
rs200894	0.36	<i>LOC388779</i>	1729827	144325	0.50
rs1884564	0.13	<i>PTPNS1</i>	1812658	82831	0.35
rs2235749	0.24	<i>PDYN</i>	1899939	87281	0.54
rs6075668	0.50	<i>STK35</i>	2043264	143325	0.56
rs6035842	0.30	<i>LOC388780</i>	2123608	80344	0.82
rs214818	0.21	<i>TGM3</i>	2240017	116409	0.75
rs6082805	0.46	<i>TGM3</i>	2267417	27400	0.92
rs2422753	0.26	<i>TGM6</i>	2301684	34267	0.64
rs2076649	0.34	<i>TGM6</i>	2350952	49268	0.79
rs4446127	0.25	<i>SNRPB, MGC10715</i>	2397788	46836	0.44
rs6050260	0.43	<i>TMC2</i>	2495157	97369	0.85
rs6083931	0.44	<i>NOL5A, TMC2</i>	2565120	69963	0.44
rs2073126	0.37	<i>KIAA1442</i>	2668985	103865	0.92
rs600832	0.43	<i>PTPRA</i>	2814086	145101	0.66
rs6084229	0.48	<i>PTPRA</i>	2918928	104842	0.20
rs6084265	0.34	<i>AVP</i>	3010898	91970	0.90
rs6051639	0.38	<i>ITPA, C20orf116</i>	3120283	109385	0.64
rs6139068	0.20	<i>C20orf194</i>	3224393	104110	0.71
rs6076524	0.37	<i>ATRN</i>	3392447	168054	0.40
rs235577	0.22	<i>ATRN</i>	3481633	89186	0.61
rs512625	0.30	<i>GFRA4, ADAM33</i>	3588378	106745	0.04
rs2281479	0.23	<i>CENPB, C20orf28</i>	3702095	113717	0.57
rs6084506	0.40	<i>PANK2</i>	3810932	108837	0.52
rs4813669	0.38	<i>MGC34919</i>	4032860	221928	0.43
rs6084657	0.42	<i>SMOX</i>	4111497	78637	0.28
rs2756271	0.38	<i>PRNP</i>	4605262	493765	0.12
rs2422982	0.29	<i>RASSF2</i>	4706197	100935	0.71
rs1110277	0.40	<i>SLC23A2</i>	4794682	88485	0.80
rs6139593	0.46	<i>SLC23A2</i>	4892923	98241	0.79
rs4239761	0.16	<i>CDS2, PCNA</i>	5054584	161661	0.95
rs6085093	0.44	<i>LOC388785, GPR73L1</i>	5242653	188069	0.65
rs6053417	0.46	<i>AK125948</i>	5387617	144964	0.04
rs6053519	0.39	<i>KIAA1434</i>	5506109	118492	0.24
rs6107689	0.37	<i>FLJ25067</i>	5686348	180239	0.79
rs1287021	0.22	<i>FLJ25067</i>	5764893	78545	0.54
rs236141	0.37	<i>CHGB</i>	5831907	67014	0.58
rs6085352	0.27	<i>C20orf75</i>	5944157	112250	0.58
rs2295435	0.43	<i>C20orf42</i>	6036695	92538	0.74
rs2259248	0.29	<i>LOC219414</i>	6128859	92164	0.76
rs1005464	0.24	<i>BMP2</i>	6696148	567289	0.88

rs6117980	0.29	<i>HAOI</i>	7816255	1120107	0.30
rs6140479	0.26	<i>DJ97IN18.2</i>	7897766	81511	0.47
rs6039040	0.17	<i>PLCB1</i>	8047397	149631	0.21
rs2142669	0.48	<i>PLCB1</i>	8161389	113992	0.14
rs6055745	0.29	<i>PLCB1</i>	8252279	90890	0.63
rs1534968	0.27	<i>PLCB1</i>	8419274	166995	0.87
rs4813865	0.37	<i>PLCB1</i>	8522403	103129	0.30
rs6077412	0.29	<i>PLCB1</i>	8635471	113068	0.22
rs724110	0.17	<i>PLCB1</i>	8750049	114578	0.94
rs1474670	0.35	<i>PLCB4</i>	9396707	646658	0.59
rs926496	0.47	<i>PAK7</i>	9724204	327497	0.57
rs596203	0.25	<i>ANKRD5</i>	9960229	236025	0.82
rs6074113	0.47	<i>SNAP25</i>	10182011	221782	0.13
rs6108571	0.43	<i>LOC128710, MKKS</i>	10350320	168309	0.82
rs6040010	0.38	<i>LOC128710</i>	10451586	101266	0.57
rs2179687	0.36	<i>JAG1</i>	10554295	102709	0.42
rs6033250	0.40	<i>BTBD3</i>	11805731	1251436	0.10
rs3177118	0.45	<i>BTBD3</i>	11845642	39911	0.12
rs3843766	0.47	<i>C20orf38</i>	12921561	1075919	0.64
rs4814218	0.60	<i>C20orf82</i>	13223462	301901	0.83
rs743183	0.31	<i>C20orf13</i>	13337227	113765	0.12
rs6042192	0.30	<i>C20orf13</i>	13436848	99621	0.17
rs6109983	0.43	<i>C20orf13</i>	13552157	115309	0.88
rs6042333	0.14	<i>C20orf6</i>	13667740	115583	0.93
rs998182	0.39	<i>C20orf50</i>	13767653	99913	0.18
rs6079226	0.42	<i>C20orf50</i>	13858640	90987	0.25
rs6074678	0.37	<i>C20orf133</i>	13971392	112752	0.47
rs6079395	0.50	<i>FLRT3</i>	14267899	296507	0.92
rs2180443	0.45	<i>C20orf23</i>	16280836	2012937	0.29
rs6111142	0.27	<i>C20orf23</i>	16384164	103328	0.07
rs6135798	0.38	<i>C20orf23</i>	16485359	101195	0.94
rs4813245	0.46	<i>OTOR, SNRPB2</i>	16664770	179411	0.83
rs6044705	0.42	<i>PCSK2</i>	17180001	515231	0.09
rs926492	0.29	<i>PCSK2</i>	17251577	71576	0.67

^aMinor Allele Frequency in the studied sample set

^bReference sequence: NT_011387.8, build 36 version 2 of NCBI's genome annotation

^cFBAT association test *P*-value under the assumption of linkage

Supplementary Table S2. Results for *DEFB* genes and for *AK125948* gene

A. Univariate analysis								
Gene	SNP ID	Region	Amino acid	Position ^a	Nucleotide change ^b	MAF ^c	<i>P</i> ^d	Database
<i>DEFB126</i>	rs11469647	Exon 2	Q55fs ^e	66163..66166	CAAA>-	0.18	0.57	dbSNP
	rs11467417	Exon 2	P106fs ^e	66314..66315	->CC	0.41	0.71	dbSNP
<i>DEFB127</i>	rs12480529	IVS1-732bp		77454	T>G	0.32	0.05	HapMap
	rs2298108	IVS1-61bp		78125	G>T	0.33	0.10	HapMap
	rs3216039	IVS1-6bp		78180	->C	0.44	0.23	dbSNP
	rs6055460	IVS2-54bp		79362	A>G	0.34	0.12	HapMap
<i>DEFB128</i>	rs12624954	Exon 2	G31R	79454	G>A	0.33	0.11	HapMap
	SNP2 ^f	IVS2-22bp		108675	C>A	0.10	0.86	-
	rs4813043	Exon 2	N27K	108728	A>T	0.36	0.08	HapMap
<i>DEFB129</i>	SNP7 ^f	Exon 2+61bp		108990	T>A	0.49	0.06	-
	rs2298149	Exon 1-41bp		147889	C>T	0.39	0.06	dbSNP
	rs6110460	IVS1+175bp		148168	T>C	0.46	0.01	HapMap
<i>DEFB32</i>	rs1053783	Exon 2	L67L	150061	G>A	0.38	0.11	-
	rs373225	IVS1+30bp	T149S	150306	C>G	0.07	0.41	HapMap
	rs399083	IVS2-31bp		179688	A>G	0.33	0.16	HapMap
<i>AK125948</i>	rs6053417	IVS1-4234bp		5387617	A>G	0.46	0.05	HapMap
	rs8114316	IVS2-372bp		5393914	T>G	0.49	0.32	HapMap
	rs1060236	Exon 2, 5'UTR		5394686	A>G	0.49	0.26	dbSNP
	rs479233	Exon 2, 5'UTR		5395074	A>G	0.34	0.16	HapMap
	rs6053430	IVS2+4533bp		5402313	G>A	0.48	0.66	HapMap
	rs1977170	IVS2+6220bp		5404000	T>G	0.48	0.64	HapMap
B. Haplotype analysis								
Gene	Haplotype ^g		Frequency (%)	<i>P</i> ^d		1,000,000 permutations <i>P</i>		
<i>DEFB126</i>	H1	[CAAA] [-]	42	0.95		0.97		
	H2	[CAAA] [CC]	38	0.94		0.94		
	H3	[-] [-]	20	0.93		0.93		
<i>DEFB127</i>	H1	TG[-]AG	54	0.18		0.31		
	H2	GTCGA	33	0.15		0.17		
	H3	TGCAG	11	0.59		0.58		
<i>DEFB128</i>	H1	CAT	50	0.07		0.10		
	H2	CTA	39	0.10		0.20		
	H3	AAA	8	0.87		0.78		
<i>DEFB129</i>	H1	CTGC	52	0.05		0.08		
	H2	TCAC	41	0.15		0.24		
	H3	CCGG	5	0.22		0.23		
<i>DEFB32</i>	H1	CA	61	0.29		0.34		
	H2	AG	35	0.12		0.24		
<i>AK125948</i>	H1	AGAAAG	43	0.31		0.30		
	H2	GTGGGT	34	0.09		0.09		
	H3	GTGAGT	11	0.48		0.44		
	H4	ATGAGT	8	0.06		0.03		

^aReference sequence: NT_011387.8

^bMost common allele is given first

^cMinor Allele Frequency in the studied sample set

^dFBAT association test *P*-value under the assumption of linkage

^eFrameshift change

^fNew SNP identified at CNG

^gSNP are in same order as in Table S2A. Only haplotypes with frequency $\geq 5\%$ are represented

Supplementary Table S3: Pairwise LD (D') for the 17 SNPs genotyped in the whole family set

	rs512625	rs677044	rs628977	rs2280089	rs2280090	rs597980	rs44707	rs598418	rs2787095	rs2853213	rs2853215	rs535964	rs1046919	rs656635
rs677044	0.026 (0.40)													
rs628977	0.059 (0.31)	-0.104 (0.74)												
rs2280089	0.042 (0.97)	-0.030 (0.97)	0.050 (0.98)											
rs2280090	0.041 (0.96)	-0.030 (0.94)	0.050 (0.97)	0.123 (1.00)										
rs597980	0.043 (0.32)	-0.096 (0.96)	0.161 (0.97)	-0.066 (1.00)	-0.067 (0.98)									
rs44707	0.085 (0.48)	-0.131 (0.98)	0.213 (0.97)	0.058 (1.00)	0.056 (0.96)	0.176 (0.98)								
rs598418	-0.064 (0.34)	0.103 (0.73)	-0.229 (0.99)	-0.053 (1.00)	-0.054 (1.00)	-0.162 (0.97)	-0.216 (0.98)							
rs2787095	0.078 (0.43)	0.024 (0.27)	0.051 (0.23)	-0.085 (0.96)	-0.085 (0.98)	0.159 (0.89)	0.072 (0.31)	-0.056 (0.25)						
rs2853213	-0.000 (0.00)	-0.031 (0.39)	0.061 (0.47)	-0.005 (0.09)	-0.006 (0.12)	0.066 (0.33)	0.063 (0.44)	-0.060 (0.46)	0.042 (0.30)					
rs2853215	-0.013 (0.16)	0.024 (0.40)	-0.035 (0.35)	0.010 (0.25)	0.012 (0.30)	-0.048 (0.32)	-0.039 (0.37)	0.034 (0.35)	-0.036 (0.33)	-0.168 (0.96)				
rs535964	-0.008 (0.08)	0.033 (0.42)	-0.025 (0.19)	0.017 (0.33)	0.019 (0.36)	-0.052 (0.26)	-0.030 (0.21)	0.025 (0.19)	-0.013 (0.09)	-0.139 (0.61)	0.169 (1.00)			
rs1046919	-0.037 (0.27)	-0.024 (0.54)	-0.032 (0.25)	-0.014 (0.49)	-0.015 (0.50)	-0.003 (0.03)	-0.016 (0.13)	0.027 (0.21)	-0.010 (0.08)	-0.072 (0.98)	0.054 (0.98)	0.074 (0.99)		
rs656635	0.029 (0.20)	0.046 (0.41)	-0.014 (0.07)	0.003 (0.04)	0.004 (0.06)	-0.030 (0.14)	-0.025 (0.13)	0.015 (0.08)	0.001 (0.01)	-0.114 (0.65)	0.126 (0.96)	0.084 (0.47)	-0.080 (0.78)	
rs6076542	0.010 (0.46)	-0.003 (0.10)	0.004 (0.21)	-0.000 (0.02)	-0.000 (0.01)	0.009 (0.66)	0.008 (0.40)	-0.004 (0.20)	0.010 (0.52)	-0.019 (0.93)	0.012 (0.52)	0.010 (0.49)	0.007 (1.00)	0.014 (0.92)

Supplementary Table S4. Results for HLA-Cw6 tagging SNPs (*PSORS1* locus)

A. Univariate analysis													
Gene	SNP	Other name	Amino acid	MAF	Set I			Set II			Set I + Set II		
					Nb of informative families	Z ^a	P	Nb of informative families	Z ^a	P	Z ^a	P	Z ^a
<i>HCR</i>	Rs130076	-325 C>T	R109W	0.22	38	3.58	0.0004	34	3.17	0.001	4.74	0.000002	
	Rs130079	-1723 G>T	G575C	0.24	38	3.91	0.0001	34	3.22	0.001	5.05	<0.000001	
	Rs1576	-2327 C>G	C776S	0.33	38	3.63	0.0003	36	2.13	0.03	4.17	0.00003	
<i>CDSN</i>	Rs1062470	971C>T	UTR	0.37	39	3.90	0.0001	41	2.38	0.02	4.52	0.000006	

B. Haplotype analysis (haplotypes $\geq 2\%$)											
Haplotypes ^a	Frequency	Set I			Set II			Set I + Set II			
		Nb of informative families ^b	Z ^c	P	Nb of informative families ^b	Z ^c	P	Nb of informative families ^b	Z ^c	P	1,000,000 permutations P
H1 CGCC	0.39	165.8	(-2.93)	0.003	66.4	(-1.45)	0.15	0.10	(-3.17)	0.002	0.001
H2 TTGT	0.22	117.0	4.30	0.00002	57.1	3.84	0.0001	0.000004	5.70	<0.000001	<0.000001
H3 CGCT	0.18	91.5	(-1.95)	0.05	40.6	(-2.43)	0.01	0.01	(-3.06)	0.002	0.003
H4 TTGC	0.09	62.5	(-0.73)	0.47	29.1	(-0.99)	0.32	0.25	(-0.98)	0.33	0.27
H5 CGGC	0.08	43.0	(-1.50)	0.13	12.7	(-0.75)	0.45	0.40	(-1.76)	0.08	0.05
H6 CTGT	0.02	11.0	0.88	0.38	11.0	0.94	0.35	0.40	1.26	0.21	0.36

^aThe 4 SNPs used for analyses are in the following order: rs130076, rs130079, rs1576, rs1062470

^bNumber of informative families estimated by FBAT

^cScore given by FBAT

Supplementary Table S5. Results for most significant under- and over-transmitted *ADAM33* 3-SNP haplotypes when stratifying according to HLA-Cw6 status in patients (for Set I)

SNP combination ^a	Haplotype	Frequency	Nb of informative families ^b	Z ^c	P	1,000,000 permutations P
<i>A. Association test performed on affected individuals carrying the HLA-Cw6 haplotype</i>						
SNP 5/10/25	AGT	0.10	20.9	(-)2.35	0.02	0.006
SNP 5/11/23	AGG	0.11	35.9	(-)2.64	0.008	0.009
SNP 5/25/26	ATT	0.10	25.4	(-)2.38	0.02	0.007
SNP 5/26/27	ATG	0.09	21.8	(-)1.57	0.12	0.10
SNP 7/9/23	ACC	0.32	76.3	1.76	0.08	0.11
SNP 7/16/23	ATC	0.32	70.4	1.70	0.09	0.16
SNP 7/21/23	AGC	0.22	66.9	1.87	0.06	0.12
SNP 15/23/24	ACG	0.33	75.9	2.17	0.03	0.05
SNP 16/23/27	TCG	0.11	38.2	1.45	0.15	0.19
SNP 16/26/27	TCG	0.10	33.5	1.99	0.05	0.07
<i>B. Association test performed on affected individuals not carrying the HLA-Cw6 haplotype</i>						
SNP 5/10/25	AGT	0.10	36.6	(-)2.76	0.006	0.004
SNP 5/11/23	AGG	0.11	40.9	(-)2.19	0.03	0.02
SNP 5/25/26	ATT	0.10	36.8	(-)2.72	0.006	0.005
SNP 5/26/27	ATG	0.09	33.8	(-)2.61	0.009	0.003
SNP 7/9/23	ACC	0.32	83.1	3.00	0.003	0.002
SNP 7/16/23	ATC	0.32	84.5	2.98	0.003	0.002
SNP 7/21/23	AGC	0.22	61.7	3.33	0.0009	0.0009
SNP 15/23/24	ACG	0.33	81.0	2.50	0.01	0.01
SNP 16/23/27	TCG	0.11	43.4	3.21	0.001	0.0009
SNP 16/26/27	TCG	0.10	46.8	2.61	0.009	0.001

^aSNP numbers refer to SNPs in Table 1.

^bNumber of informative families estimated by FBAT

^cScore given by FBAT

2.2.2 Conclusion

Lors de l'étude d'association préliminaire des 85 SNPs répartis le long du locus d'intérêt, quatre d'entre eux, présents dans trois régions distinctes, ont été montrés associés au psoriasis dans nos familles. Une étude plus approfondie des trois régions (locus *DEFB*, locus *ADAM33* et locus *AK125948*) par l'analyse de 63 SNPs supplémentaires a montré une association entre la maladie et quatre nouveaux polymorphismes du locus *ADAM33*. De plus, une analyse haplotypique de la région a révélé une association de la maladie avec plusieurs combinaisons de SNPs localisés dans le gène *ADAM33*, indépendamment du locus *PSORS1* sur le chromosome 6. La meilleure combinaison est obtenue pour 3 SNPs non codants rs512625/ rs2280089/ rs535964 avec une valeur de P égale à 0.00004. Ces associations n'ont pas été répliquées dans un deuxième groupe de 81 familles de même origine. Ces familles sont néanmoins plus petites et moins informatives que celles du premier groupe, pouvant expliquer cette absence de réplification. Cette étude permet ainsi d'identifier un nouveau gène de prédisposition au psoriasis, le gène *ADAM33*. Même si la fonction de ce gène n'est pas encore bien identifiée, il pourrait être impliqué dans une maladie auto-immune et inflammatoire de la peau telle que le psoriasis. En effet, ce gène est exprimé dans la plupart des tissus humains, incluant la peau [Yoshinaka et al., 2002]. La protéine ADAM33 appartient à une famille de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, ou dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, essentielles pour le développement d'un tissu. Elle aurait un rôle putatif dans la régénération des voies aériennes [Holgate et al., 2006]. Le gène *ADAM33* a été trouvé associé à l'asthme dans différentes populations [Howard et al., 2003], confirmant l'implication de gènes communs de prédisposition à plusieurs maladies auto-immunes. Le rôle biologique exact de ADAM33 dans le psoriasis ainsi que l'identification des variants causals restent à être élucidés.

Récemment, ces résultats ont été répliqués dans deux autres études. La première réalisée sur 150 patients français montre également une association avec rs512625 ($P=0.01$), qui est un des SNPs de *ADAM33*, associés dans notre étude, seul ou en combinaison avec plusieurs SNPs [Siroux et al., 2008]. Dans cette même étude, une analyse après stratification des patients selon l'âge d'apparition du psoriasis (74 patients l'ont eu avant l'âge de 40 ans) révèle une autre association, indépendante de la première, entre le psoriasis à début précoce et un SNP présent dans les haplotypes fortement associés dans notre étude, rs628977 ($P=0.01$). De plus, les auteurs confirment qu'*ADAM33* et *PSORS1* sont impliqués de manière indépendante dans le psoriasis [Siroux et al., 2008]. La deuxième étude, réalisée sur 2025 patients caucasiens (*versus* 1597 sains), confirme l'association que nous avons décrite entre le psoriasis et un des SNPs de *ADAM33*, rs597980 ($P=0.0057$) [Li et al., 2008].

3 ANALYSE D'ASSOCIATION : ETUDE DE GENES CANDIDATS

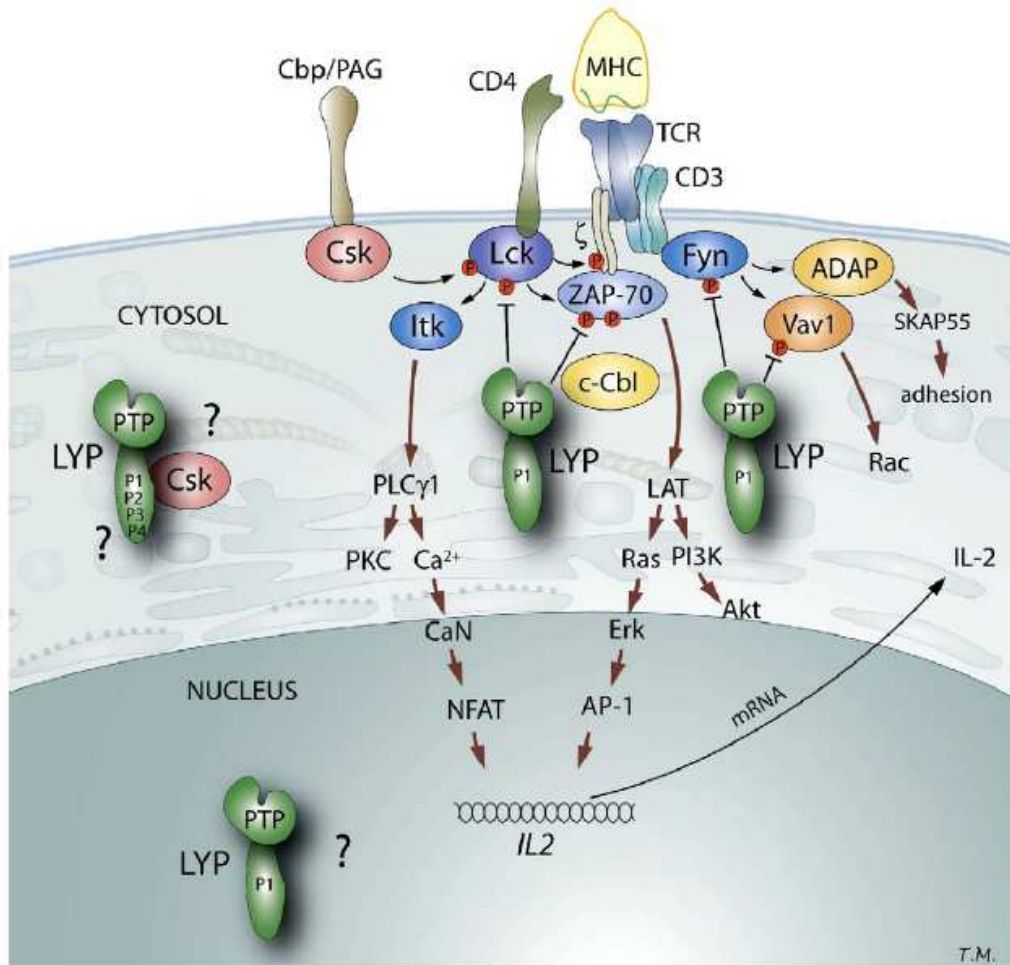
3.1 Introduction (Article 3, manuscrit soumis)

De nombreuses régions ont été suggérées comme loci de prédisposition au psoriasis, cependant peu d'entre elles ont été confirmées. Seul le locus *HLA* est connu comme étant le locus majeur du psoriasis. De plus, peu de gènes ont pu être clairement identifiés comme jouant un rôle dans l'étiologie de cette maladie (Tableau 1.11). Ainsi, une autre approche, l'approche "gènes candidats" est largement utilisée dans le cas des maladies multifactorielles. Elle consiste à choisir un gène candidat en raison de sa fonction, suggérant un rôle dans le processus pathogénique, ou en raison des résultats obtenus dans des modèles animaux ou même d'après les résultats significatifs d'associations de ce gène avec d'autres maladies de pathophysiologies voisines. Ce gène est alors testé par une analyse d'association afin de vérifier s'il constitue bien un facteur de risque pour la maladie étudiée. Cette approche ne dépend donc pas nécessairement de la localisation de ce gène dans un locus d'intérêt, même si cela rend l'implication du gène plus probable. Parallèlement aux études de liaison, une partie de mon travail de thèse a été de réaliser des études d'association de plusieurs gènes "candidats", non situés dans les régions préalablement identifiées lors du premier criblage dans notre population d'étude. Ce type d'étude est plus puissant que les études de liaison et peut permettre de détecter des gènes à risque relatif faible dits "gènes à faible pénétrance". Le psoriasis est une maladie très complexe qui fait intervenir deux types cellulaires : les kératinocytes et les cellules T. Ne pouvant étudier tous les gènes d'intérêt possibles, le choix des candidats a été restreint à leur rôle dans l'immunité et dans la peau ainsi qu'à leur association avec d'autres maladies auto-immunes ou d'autres maladies de la peau incluant le psoriasis. L'observation d'une pathophysiologie commune entre diverses maladies et la co-occurrence de certaines de ces maladies dans des familles font suggérer l'existence de mécanismes communs y compris génétiques dans le développement de ces maladies. Par exemple, le psoriasis peut survenir avec d'autres maladies inflammatoires telles que l'arthrite psoriasique et la maladie de Crohn [Lee et al., 1990, Gladman, 1994]. Cette constatation est supportée par l'identification de plusieurs loci de prédisposition, communs à différentes maladies auto-immunes et inflammatoires. Par exemple, les loci de prédisposition au psoriasis présent en 1q21, 3q21, 17q25, 20p12 sont aussi liés avec la dermatite atopique (AD), en 5q31 avec la polyarthrite rhumatoïde (RA), AD et l'asthme, en 16q12 avec l'arthrite psoriasique, le lupus érythémateux systémique (SLE) et la maladie de Crohn [Cookson et al., 2001, Yamada and Yamamoto, 2005, Bowcock, 2005, Lee et al., 2007]. De même, l'hypothèse de gènes communs à différentes maladies inflammatoires et auto-immunes est renforcée par de nombreuses études, détaillées ultérieure-

ment. Un gène de prédisposition à l'asthme, *ADAM33*, a d'ailleurs été montré associé au psoriasis dans notre précédente étude. Les gènes candidats évidents pour une maladie auto-immune et inflammatoire telle que le psoriasis sont les gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire et de l'inflammation. Cela implique donc les gènes impliqués dans le développement, la prolifération et l'activation des lymphocytes T comme ceux régulant ou régulés par les facteurs de transcription NF- κ B (*PTPN22*, *CARD15* ou *CYLD*), RUNX (*SLC22A4* ou *SLC9A3R1/NAT9*) et STAT (*STAT3*). Les gènes impliqués dans le processus inflammatoire, tels que les gènes codant les cytokines (*IL1A*, *IL1B* et *IL1RN*), ou les récepteurs des cytokines (*IL1R1* et *IL12RB1*), et même ceux impliqués dans le transport de molécules (*SLC22A4* et *SLC22A5*) semblent être de bons candidats. De plus, le psoriasis est une maladie de la peau, caractérisée entre autres par l'hyper-prolifération des cellules épidermiques, les kératinocytes. Ainsi, les candidats potentiels sont également soit les gènes intervenant dans la survie (*CYLD*), la prolifération (*STAT3* et *SLC12A8*) et la différenciation (*c-Jun* et *JunB*) des kératinocytes, soit les gènes intervenant dans la formation de la peau (*FLG*, *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6*). Un total de 22 gènes candidats dont certains ont été associés à d'autres maladies ayant des caractéristiques communes avec le psoriasis ont été testés lors de cette étude. L'implication d'un gène commun dans différentes maladies ne signifie pas l'existence d'un même variant causal. Une approche systémique "Tagging SNP" a été entreprise pour tester globalement tous les gènes étudiés (cf explication dans la partie Matériels et Méthodes) [Monpetit and Chagnon, 2006]. De manière générale, après sélection des TagSNPs, nous les testons individuellement et conjointement (haplotype) dans le premier lot de 45 grandes familles atteintes de psoriasis à l'aide du programme FBAT. Lorsqu'une association est suggérée, même faiblement ($P < 0.08$), avec plusieurs des marqueurs, nous tentons de le confirmer avec une réplique méthodologique utilisant les modèles à effets mixtes (Logistic-Normal Models, "LNMs") et également avec une réplique dans un autre lot de 83 familles de même origine [Xu and Shete, 2007]. Contrairement aux analyses par FBAT, la structure familiale est prise en compte dans sa globalité. Pour déterminer si l'association observée lors de la première analyse est indépendante ou non du facteur génétique majeur de risque du psoriasis, l'allèle HLA-*Cw6* (*PSORS1*) ou si de nouvelles associations peuvent être identifiées dans un des deux sous-groupes porteurs ou non de cette allèle à risque, l'association entre le psoriasis et le gène candidat est également testée après la stratification de nos familles selon un haplotype à risque, connu pour être en déséquilibre de liaison avec l'allèle HLA-*Cw6* [Asumalahti et al., 2002, Capon et al., 2004a] (cf explication dans la partie Matériels et Méthodes). L'étude de chacun de ces gènes est détaillée par la suite. Une représentation détaillée de la structure des gènes ainsi que les TagSNPs analysés sont en annexes.

FIG. 3.2: Représentation schématique des fonctions connues et putatives de PTPN22 dans la voie de signalisation du récepteur de surface des lymphocytes T (TCR)

La protéine Lyp intervient en aval de la voie de signalisation TCR. Seule ou sous forme de complexe avec d'autres protéines (Csk ou c-Cbl), elle inhibe certaines protéines kinases, initiatrices du signal TCR telles que Lck et Fyn pour permettre la régulation négative des lymphocytes T activés. Le variant R620W, associé à de nombreuses maladies auto-immunes, est situé dans le domaine de liaison entre les protéines Lyp et Csk. *In vitro*, la protéine Lyp possédant un tryptophane à ce site perd sa capacité à lier Csk. Cette absence de fixation entraîne une dérégulation de l'activation des cellules T pouvant amener à des phénomènes d'auto-immunité. Les flèches indiquent les événements régulateurs positifs et les lignes en T indiquent les événements inhibiteurs (comme la déphosphorylation). (D'après [Bottini et al., 2006])



3.2 Résultats

3.2.1 Protéines intervenant dans l'immunité et dans l'inflammation

Gènes «associés» au psoriasis dans notre étude : la voie NF- κ B

Exemple particulier du gène *PTPN22*, commun à plusieurs maladies auto-immunes, codant la protéine LYMPHOID-SPECIFIC PHOSPHATASE (LYP)

Parmi les nombreuses protéines d'intérêt intervenant dans les voies de signalisation du récepteur de surface des lymphocytes T (TCR), la protéine LYP (*Lymphoid-specific Phosphatase*), une tyrosine phosphatase spécifique des lignées lymphoïdes permettant la régulation négative de l'activation spontanée des lymphocytes T mémoires/effecteurs, semble un bon candidat [Hasegawa et al., 2004]. Cette protéine, codée par le gène *PTPN22* (*Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor, type 22*) sur le chromosome 1p13, a été décrite comme étant associée à de nombreuses maladies auto-immunes comme le diabète de type 1 (T1D) [Bottini et al., 2004, Smyth et al., 2004], la polyarthrite rhumatoïde (RA) [Begovich et al., 2004, Hinks et al., 2005], le lupus érythémateux disséminé (SLE) [Kyogoku et al., 2004], l'arthrite juvénile idiopathique [Hinks et al., 2005] et la maladie de Graves-Basedow (GD, une maladie de la thyroïde) [Velaga et al., 2004] (méta-analyse [Lee et al., 2007, Bottini et al., 2006]).

Cette protéine intracellulaire est exprimée dans les tissus hématopoïétiques (le thymus, la rate, la moelle osseuse et les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) comme les cellules T, B, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules Killer (NK)). Elle possède, dans sa partie N-terminale, un domaine catalytique (tyrosine phosphatase) et dans sa partie C-terminale, quatre motifs riches en proline, nommés P1, P2, P3 et P4. Le domaine P1 a la capacité de se lier au domaine SH3 (*Src homology 3*) de la protéine tyrosine kinase Csk. Dans les cellules T, le complexe LYP/Csk est un régulateur négatif de la voie de signalisation TCR. De façon synergique, ce complexe inhibe, selon la déphosphorylation et la phosphorylation de tyrosines ciblées, les kinases de la famille Src comme Lck et Fyn, initiatrices du signal TCR. De plus, LYP peut aussi inhiber l'activation des cellules T, *via* un nouveau complexe avec le proto-oncogène c-Cbl, en déphosphorylant une autre tyrosine kinase, ZAP-70 [Cloutier and Veillette, 1999, Gjorloff-Wingren et al., 1999] (Figure 3.2).

Les études d'association de différentes maladies auto-immunes précédemment citées ont mis en évidence un rôle du polymorphisme nucléotidique (SNP) faux-sens du gène *PTPN22*, rs2476601, situé dans le domaine P1 permettant l'in-

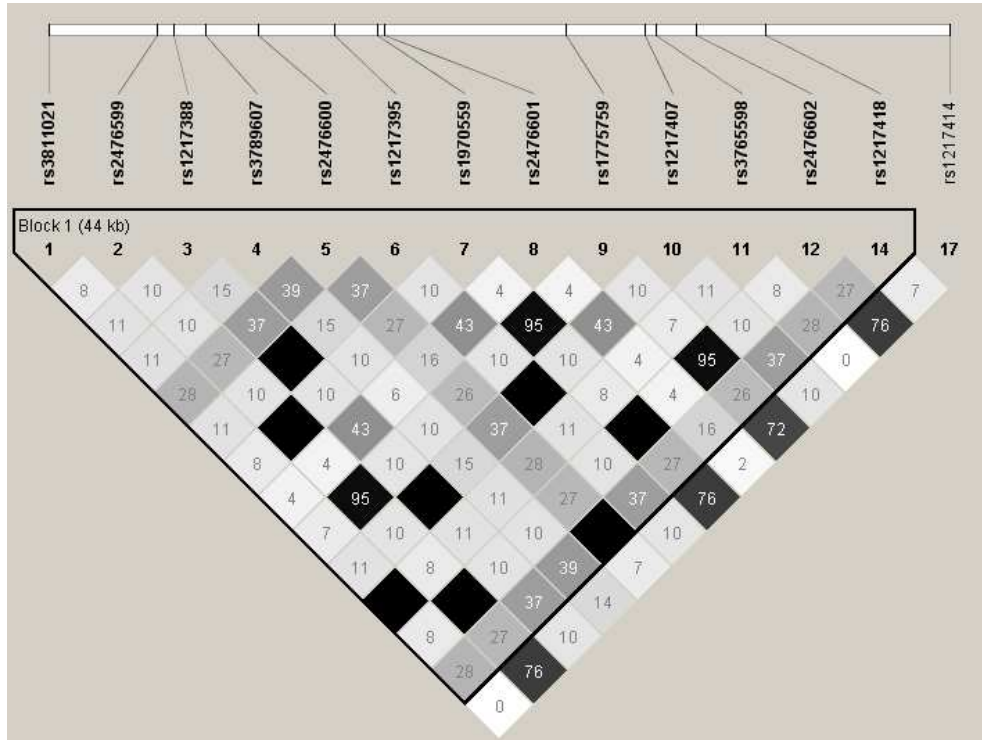
teraction avec SH3 de Csk, dans la prédisposition à l'auto-immunité. Ce variant entraîne une substitution de l'acide aminé arginine en tryptophane au niveau du codon 620 (R620W). Des expériences *in vitro* ont montré que la présence de ce tryptophane au codon 620 (l'allèle T) provoque une perte de liaison entre les deux protéines LYP et Csk et, par conséquent, suggère une dérégulation de l'activation des cellules T. Les sujets porteurs de cet allèle seraient ainsi enclins à une auto-immunité [Begovich et al., 2004, Bottini et al., 2004].

Bien qu'aucune étude de liaison dans nos familles n'ait identifié un locus majeur de prédisposition au psoriasis sur le chromosome 1p13, l'observation que le psoriasis est médié en partie par les cellules T activées [Lew et al., 2004, Sugiyama et al., 2005] et l'implication du gène *PTPN22* dans la dérégulation des lymphocytes T suggèrent que *PTPN22* est un bon gène candidat. De nombreuses études ont été réalisées pour tester la contribution du variant faux-sens R620W de ce gène *PTPN22* à la prédisposition au psoriasis et même à l'arthrite psoriasique. Nistor et ses collaborateurs (2005) ont rapporté une absence d'association de ce variant avec le psoriasis dans 517 familles américaines comprenant 1146 sujets atteints. Ce résultat est confirmé par d'autres études sur des populations diverses soit plus petites, américaines (62 individus atteints), anglaises (279 att.), soit plus grandes, allemandes (793 att.), anglaises (647 att.) [Criswell et al., 2005, Hinks et al., 2005, Huffmeier et al., 2006b, Smith et al., 2008]. Dans le cas de l'arthrite psoriasique, l'association du variant faux-sens est faiblement détectée seulement dans certaines conditions (dépendant de la population ou du sexe) [Hinks et al., 2005, Butt et al., 2006, Huffmeier et al., 2006a]. Cependant, une première étude globale de la région de *PTPN22* a été réalisée sur 793 patients allemands, dont la plupart ont développé la maladie avant l'âge de 40 ans (Type I). Une association est montrée entre le psoriasis et un haplotype au niveau de la région 1p13 impliquant quatre TagSNPs, trois étant situés dans le gène *RSBN1* (*round spermatid basic protein 1 gene*) et un dans le gène *FLJ22588*, gènes localisés de part et d'autre de *PTPN22* ($P_c=0.02$) [Huffmeier et al., 2006b]. De plus, une étude cas-témoins sur 900 patients anglais révèle également une association avec des polymorphismes de cette région et le psoriasis de type I. Une association significative est observée entre le psoriasis et deux variants, rs1217414 et rs3789604, localisés dans l'intron 1 du gène *PTPN22* et l'exon 1 du gène *RSBN1* ($P=0.003$ et $P=0.0002$, respectivement) [Smith et al., 2008]. L'ensemble de ces associations sont indépendantes de l'allèle à risque HLA-*Cw6* [Huffmeier et al., 2006b, Smith et al., 2008]. L'association du psoriasis avec rs3789604 a été confirmée lors d'une méta-analyse sur 4811 cas et 5662 témoins ($P=3.45 \times 10^{-5}$) [Li et al., 2008]. Ce SNP est particulièrement intéressant car il a tout d'abord été associé avec RA, de manière indépendante de l'association bien caractérisée avec R620W [Carlton et al., 2005]. Ce variant synonyme est localisé à 1496 pb en amont du gène *PTPN22*

dans l'exon 1 du gène *RSBN1*. Il semble peu probable que ce gène puisse être un gène de susceptibilité au psoriasis car ce gène semble avoir un rôle important dans la spermatogenèse (différenciation des spermatides en spermatozoïdes), et dans la régulation transcriptionnelle de gènes dans les cellules germinales haploïdes (les spermatides) [Takahashi et al., 2004]. Néanmoins, le polymorphisme pourrait jouer un rôle dans l'activation des cellules T car il est prédit qu'il se situe dans un site de liaison pour différents facteurs de transcription, spécialement pour deux facteurs, Pax-5 et Pax-4, qui pourraient réguler l'expression du gène *PTPN22*. De plus, *PAX5* code pour une protéine activatrice spécifique des cellules B. En absence de PAX5, les cellules pro-B peuvent se différencier, selon les stimuli, en d'autres cellules immunitaires telles que les cellules T, les macrophages ou les cellules dendritiques (cellules présentatrice d'antigènes aux lymphocytes) [Smith et al., 2008].

Lorsque nous avons entrepris l'étude de ce gène, en 2005, la majorité de ces études ne prenaient en compte qu'un seul variant, et une association entre le gène *PTPN22* et le psoriasis ne pouvait donc pas être exclue formellement. Nous avons donc entrepris une approche systématique 'Tagging SNP' pour tester les gènes candidats. Dans le cas du gène *PTPN22*, nous avons donc voulu savoir si un variant, autre que R620W, pouvait être associé au psoriasis. Pour ce faire, une étude systématique de *PTPN22* a été réalisée et d'après l'étude du déséquilibre de liaison au niveau du gène, 5 TagSNPs, dont rs2476601, ont été testés (Table 3.5, Figure 3.3). Les résultats avec le programme FBAT pour les 5 variants de *PTPN22* sont présentés dans le tableau 3.5.

Cette analyse a suggéré une association possible entre le psoriasis et deux SNPs introniques, rs2476599 ($P=0.08$) et rs1217414 ($P=0.07$), dont le dernier SNP ayant été déjà décrit comme étant associé au psoriasis [Smith et al., 2008]. Cependant, cette tendance n'a pas été confirmée par la suite en analysant les haplotypes constitués par les 5 SNPs dans le Lot I par FBAT (Table 3.6) ou en analysant deux SNPs dans le Lot I par la méthode "LNMs" (Table 3.7) ou encore en étudiant ces derniers dans le Lot II ou les deux lots combinés par FBAT (Table 3.8). De plus, aucun des 5 TagSNPs ne montre une association avec le psoriasis après stratification des familles du Lot I selon l'haplotype HLA-*Cw6* (Table 3.9). Ce manque d'interaction entre les deux loci dans la prédisposition au psoriasis a également été décrit dans d'autres études allemandes et anglaises [Huffmeier et al., 2006b, Smith et al., 2008]. En revanche, l'absence d'association entre le polymorphisme faux-sens R602W de *PTPN22* (rs2476601) largement étudié dans différentes maladies auto-immunes et le psoriasis montrée par nos différentes analyses est en accord avec les nombreuses études réalisées sur le psoriasis [Criswell et al., 2005, Hinks et al., 2005, Nistor et al., 2005, Huffmeier et al., 2006b, Lee et al., 2007, Smith et al., 2008].

FIG. 3.3: Structure DL du gène *PTPN22*TAB. 3.5: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *PTPN22* sur 45 familles (Lot I) par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles ^d	MAF ^e	Base de données ^f	FBAT Lot I			
								MAF ^g	N ^h	Z ⁱ	P ^j
<i>PTPN22</i> (1p13)	rs3811021	3' UTR		10264348	T>C	22.5 ¹	H	23	64	0.410	0.68
	rs2476599	Intron 19		10271144	G>A	21.7 ¹	H	27.1	88	-1.744	0.08
	rs1217388	Intron 19		10272161	A>G	27.5 ¹	H	21.5	73	0.567	0.57
	rs2476601 ¹	Exon 14	W620R	10285253	G>A	14.2 ¹	H	7.3	38	-0.470	0.64
	rs1217414	Intron 1		10320352	C>T	26.7 ¹	H	27.8	87	-1.777	0.07

^a les SNPs exclus sont en caractère gras et les SNPs pris en fonction de leur intérêt dans la littérature : ¹ associé avec différentes maladies auto-immunes comme T1D, RA, SLE (Bottini et al., 2004, Begovich et al., 2004, Smyth et al., 2004; Kyogoku et al., 2004, Velega et al., 2004; meta-analyse Lee et al., 2007); ^b Position selon la séquence de référence (NG : "Près du gène") : NM_015967 pour *PTPN22*; ^c Position selon la séquence de référence : NT_019273.18 pour *PTPN22*; ^d l'allèle le plus fréquent, selon la base de données NCBI est donné en premier; ^e la fréquence de l'allèle le plus rare (MAF, Minor Allele Frequency) selon la base NCBI : ¹ avec HapMap comme référence ou ² dbSNP ou enfin selon l'article, NC : non communiqué ³ Palmer et al., 2006; ^f SNPs sélectionnés en fonction des informations des bases de données (BD) : HapMap (H) ou dbSNP (D) ou selon l'article de référence; ^g la fréquence de l'allèle le plus rare, estimé par FBAT, dans le Lot I, avec comme référence l'allèle mineur selon NCBI; ^h Nombre de familles nucléaires informatives estimé par FBAT dans le Lot I; ⁱ Score donné par le test d'association pour l'allèle le plus rare par FBAT sous l'hypothèse de non liaison; ^j La valeur de P obtenue lors du test d'association par FBAT. Les valeurs de P intéressantes sont indiquées en caractère gras.

TAB. 3.6: Analyse d'association des haplotypes de *PTPN22* sur le Lot I par FBAT

Haplotype		Lot I	
		MAF	P
H1	TGAGC	30.2	0.97
H2	TAAGT	26.3	0.24
H3	TGGGC	17.4	0.42
H4	CGAGC	16.2	0.47
H5	TGGAC	9.3	0.88

TAB. 3.7: Analyse d'association des TagSNPs de *PTPN22* sur le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I ^a				
			P	OR _{Aa}	[95% CI]	OR _{Aa}	[95% CI]
rs2476599	G>A	27.1	0.45	0.93	[0.76-1.13]	0.86	[0.70-1.05]
rs1217414	C>T	27.8	0.18	0.86	[0.69-1.07]	0.74	[0.59-0.92]

^a La valeur de P, OR (Odds ratio) et 95% CI (95% intervalle de confiance) obtenue lors du test d'association du Lot I par une méthode qui utilise des modèles à effets mixtes. Le terme A indique l'allèle majeur qui est l'allèle de référence et a, l'allèle mineur.

TAB. 3.8: Analyse d'association des TagSNPs de *PTPN22*, suggestifs dans le Lot I, faite sur un deuxième lot de 83 familles (Lot II) et sur l'ensemble des familles (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs2476599	27.1	88	-1.74	0.08	27.3	53	-0.057	0.95	27.2	141	-1.445	0.15
rs1217414	27.8	87	-1.78	0.07	28.5	54	0.360	0.72	28.1	141	-1.213	0.23

TAB. 3.9: Analyse d'association des TagSNPs de *PTPN22* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
				présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P		
rs3811021	T>C	23	0.68	36	-0.498	0.62	37	1.222	0.22
rs2476599	G>A	27.1	0.08	52	-0.916	0.36	52	-1.538	0.12
rs1217388	A>G	21.5	0.57	49	0.745	0.46	33	-0.052	0.96
rs2476601	G>A	7.3	0.64	23	-0.845	0.40	19	0.252	0.80
rs1217414	C>T	27.8	0.07	52	-1.127	0.26	51	-1.346	0.18

L'ensemble de ces résultats ne montre pas de rôle significatif du gène *PTPN22* dans la prédisposition au psoriasis dans nos familles. Une association, peu significative, a été cependant observée avec un variant présent dans l'intron 1 du gène *PTPN22* (rs1217414) dans notre premier lot de familles. Par ailleurs, la région *PTPN22*, ainsi que ce variant, qui peut avoir un effet sur la transcription du gène, ont été montrés récemment associés au psoriasis, particulièrement de type I [Huffmeier et al., 2006b, Smith et al., 2008]. Dans notre étude, l'âge moyen du début des symptômes chez les patients des familles du premier lot est de 19 ans (psoriasis de type I). Ceci pourrait expliquer la tendance d'association observée pour ce marqueur. Le second variant (rs3789604) récemment décrit comme associé au psoriasis, qui semble pouvoir modifier la fixation de certains facteurs de transcription, n'a pas été étudié lors de notre étude. Contrairement aux deux études récentes, nous nous sommes, en effet, focalisés sur le gène lui-même et non sur la région environnante [Smith et al., 2008]. Malgré le manque d'association avec l'un des variants étudiés (rs3811021) qui est en fort déséquilibre de liaison ($r^2=0.89$) avec le second variant associé (données non montrées), il serait néanmoins intéressant d'étudier ce variant dans nos familles du lot I car il pourrait être associé à la maladie, indépendamment du variant rs3811021, comme observé dans l'étude initiale [Smith et al., 2008]. Notre étude confirme que le polymorphisme R620W n'est pas associé au psoriasis, répliquant ainsi les résultats de nombreuses études.

En conclusion, même s'il existe peu de preuves d'association du gène *PTPN22* avec le psoriasis dans nos familles, des études récentes montrent une association de la région avec la maladie. Or, cette région est présente dans une région de fort déséquilibre de liaison contenant 6 gènes, mais seul *PTPN22* pourrait avoir de par sa fonction un rôle dans le psoriasis. Ainsi, afin d'exclure ou non ce gène comme gène prédisposant au psoriasis dans la population française, d'autres études (par exemple, au niveau de la région promotrice (rs3811021)) sont nécessaires.

Le gène *CARD15* (CAspase Recruitment Domain family member 15)

Un locus de prédisposition commun au psoriasis et à l'arthrite psoriasique a été identifié au niveau du bras long du chromosome 16 (16q) par différentes études de liaison (*PSORS8*) [Nair et al., 1997, Allen et al., 2003, Karason et al., 2003, Sagoo et al., 2004]. Cette région contient le gène *CARD15*, conférant une prédisposition à une maladie inflammatoire de la voie gastro-intestinale, la maladie de Crohn (CD), particulièrement avec trois variants (leu1007fsinsC (rs2066847, rs5743293), R702W (rs2066844) et G908R (rs2066845)) [Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001]. L'existence de ce locus commun entre ces trois maladies inflammatoires et la co-occurrence de ces maladies chez les malades [Lee et al., 1990] semblent suggérer que *CARD15* serait un gène de prédisposition commun à ces trois maladies. D'ailleurs une étude sur des patients atteints d'arthrite psoriasique (PsA), ve-

nant de l'île de Terre Neuve, montre une association avec un des trois variants de *CARD15* connus pour leur prédisposition à la maladie de Crohn (CD) [Rahman et al., 2003]. Cependant, aucune association avec ces trois variants n'a été confirmée lors des nombreuses études réalisées sur différentes populations, plus ou moins grandes, atteintes d'arthrite psoriasique (italienne, anglaise, allemande, américaine) [Giardina et al., 2004, Ho et al., 2005, Lascorz et al., 2005, Jenisch et al., 2006]. Ce manque d'association avec au moins l'un de ces trois variants est aussi observé dans le cas de l'étude du psoriasis, réalisée sur des populations caucasiennes (italiennes, anglaises et allemandes) [Nair et al., 2001, Borgiani et al., 2002, Young et al., 2003, Plant et al., 2004, Lascorz et al., 2005]. Une seule étude, certes négative, a fait une analyse globale du gène *CARD15* dans la prédisposition au psoriasis, c'est-à-dire l'étude des TagSNPs et non exclusivement, l'étude d'un ou plusieurs des trois variants connus [Plant et al., 2004].

Etant donné ces résultats contradictoires, il était intéressant d'étudier ce gène, surtout de par sa fonction. Le gène *CARD15* code une protéine intracytoplasmique relativement ubiquitaire, exprimée dans les monocytes/macrophages mais également dans les cellules épithéliales, les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Cette protéine contient deux domaines de recrutement et d'activation des caspases situés en N-terminal (CARD, *caspase-recruitment domain*), un domaine de liaison aux nucléotides (NBD, *nucleotide-binding domain*) dans la partie médiane et un domaine C-terminal composé de motifs répétés, riches en leucines (LRRs, *leucin-rich repeats*). Les principales mutations impliquées dans la maladie de Crohn sont situées dans le dernier domaine, LRR (Figure 3.4). Le rôle fonctionnel des LRRs n'est actuellement pas encore totalement élucidé. Ils interviendraient dans la reconnaissance de composants bactériens comme le muramyl dipeptide présent dans le peptidoglycan (PGN), constituant essentiel de la paroi des bactéries. La reconnaissance des composants bactériens déclenche une cascade d'événements dans le cytoplasme de la cellule aboutissant à l'activation de la voie de transduction du signal NF- κ B (Figure 3.5) avec la migration de NF- κ B dans le noyau cellulaire et la transcription de nombreux gènes dont ceux codant des cytokines inflammatoires (de type 1), de chimiokines, responsables de l'inflammation. La protéine CARD15 pourrait donc intervenir dans la régulation de l'inflammation induite par les bactéries, c'est-à-dire, dans la protection de l'hôte contre les pathogènes. D'ailleurs, des études ont mis en évidence que la présence des 3 principales mutations de *CARD15* observées dans la maladie de Crohn provoquait *in vitro* un défaut d'activation de la voie NF- κ B, partiel ou total, surtout en réponse à la stimulation par des agents bactériens (LPS ou PGN) [Ogura et al., 2001, Chamainard et al., 2003]. De plus, une étude *in vitro* sur l'homologue murin de CARD15 (80% d'homologie en acide aminé), le gène *Nod2*, montre que deux

FIG. 3.4: Représentation de la structure du gène et de la protéine CARD15 et localisation des principales mutations associées à la maladie de Crohn (D'après [Lamoril et al., 2007])

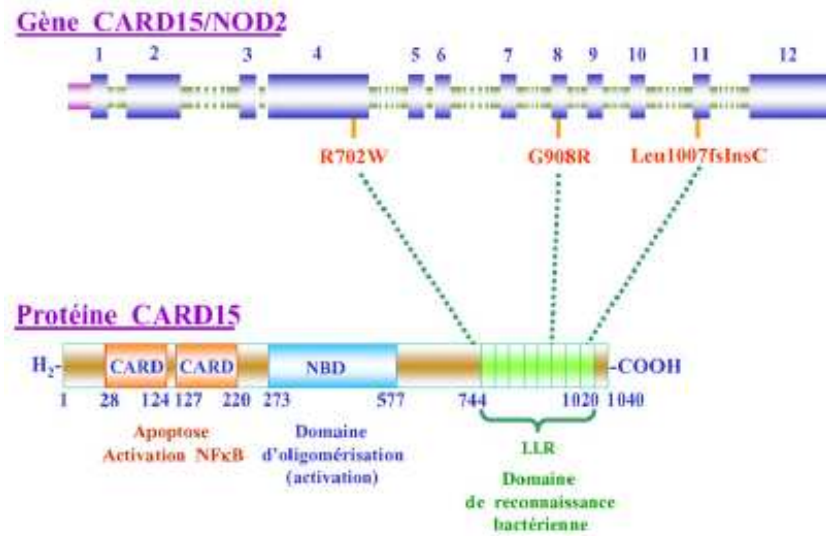


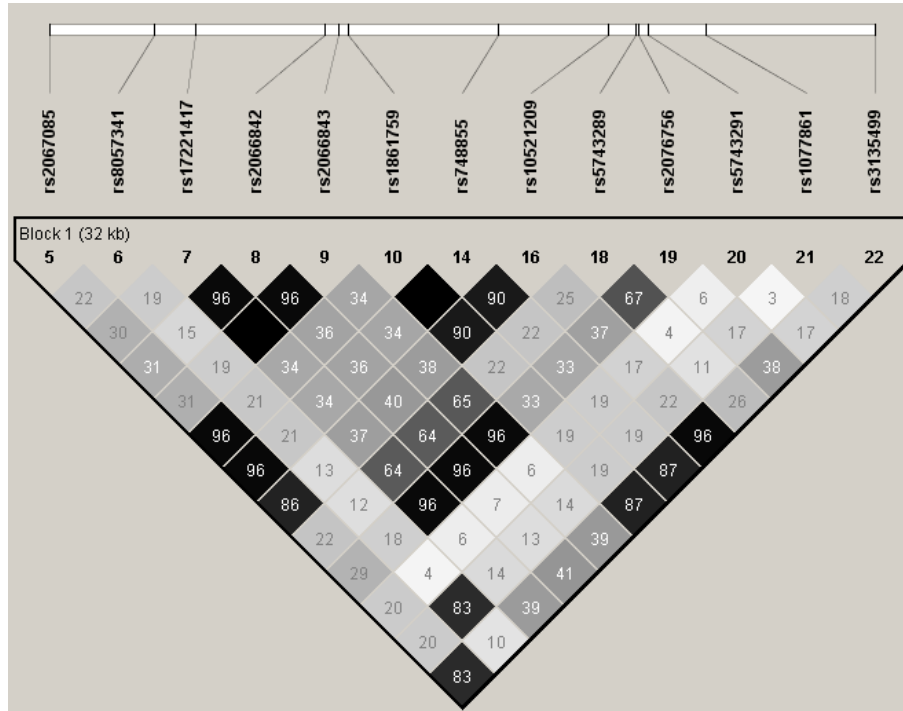
FIG. 3.5: Fonction proposée de CARD15 dans la régulation de l'inflammation par l'intermédiaire de l'activation de la voie NF- κ B en réponse à différents composants bactériens. Après pénétration dans le cytoplasme du *muramyl dipeptide* (MDP), constituant du peptidoglycan des parois bactériennes, à l'aide d'un transporteur, le MDP interagit avec le motif LRR de la protéine CARD15. Cette reconnaissance du motif MDP par CARD15 provoquerait, avec l'intervention de différents intermédiaires, l'activation de la voie NF- κ B, aboutissant à la sécrétion de peptides antimicrobiens, tels que les défensines et les cytokines pro-inflammatoires. (D'après [Lamoril et al., 2007])



mutations de *Nod2* équivalentes aux mutations G908R et 3020insC responsables de la maladie de Crohn chez l'homme, mutations G908R et 3020insC responsables de la maladie de Crohn (CD) chez l'homme, provoquent une faible activation de NF- κ B en présence ou non de composants bactériens (LPS et PGN) [Ogura et al., 2003]. Ces observations sont cependant en contradiction avec des études *in vivo* et *in vitro* sur des modèles murins qui démontrent que la protéine CARD15 mutée ou déficiente permettrait l'augmentation de l'activation de NF- κ B et des réponses Th1 après fixation d'un peptidoglycan sur le récepteur TLR2 (*Toll-like receptor 2*) [Watanabe et al., 2004, Maeda et al., 2005]. Ce paradoxe n'est toujours pas résolu à ce jour mais de manière générale, CARD15 semble être un important régulateur de l'activation de NF- κ B et les mutations de *CARD15* paraissent modifier les signaux de la réponse immunitaire innée (non spécifique) en réponse aux motifs bactériens, ce qui aboutirait à une incapacité du système immunitaire à contrôler l'infection bactérienne par une élimination moins efficace des bactéries qui conduirait à une inflammation chronique.

Puisque le psoriasis peut être déclenché par, entre autres, des infections bactériennes (psoriasis en gouttes) et que la majorité des études sur le psoriasis ne prenait en compte que les trois variants associés à CD et causant une altération dans la séquence peptidique, alors qu'il existe aussi d'autres polymorphismes associés, même introniques [Sugimura et al., 2003], nous avons entrepris de tester le gène entier par une approche "TagSNP". Pour cela, dans nos 45 familles, nous avons analysé, par FBAT, 6 TagSNPs choisis en fonction de la structure DL du gène obtenu par les données HapMap/dbSNP (Figure 3.6) en les ajoutant à ceux associés aux maladies auto-immunes (rs2066844, rs2066845 et rs5743293 pour CD, rs2076752, rs1077861, rs3135500 pour l'asthme et la rhino-conjonctivite allergique) [Weidinger et al., 2005]. Les résultats obtenus dans notre lot I sont présentés dans le tableau 3.10.

Des associations sont identifiées entre le psoriasis et trois polymorphismes, rs2076752 dans la partie 5' non traduite, rs17221417 dans l'intron 2 et rs2066844 dans l'exon 4 avec un P de 0.005, de 0.01 et de 0.04 respectivement. Ormis rs2066844, les deux autres SNPs associés à CD n'ont pu être analysés dans nos familles. En effet, peu de nos familles nucléaires sont informatives pour permettre le test TDT du SNP rs2066845, qui a une fréquence de l'allèle rare de 1% seulement dans notre population. De plus, la délétion rs5743293 n'a pas pu être génotypé pour des raisons techniques. Cependant, une étude supplémentaire, en séquençant l'exon 11 sur 140 individus atteints indépendants et 94 témoins, ne montre aucune différence de la fréquence de l'allèle mineur de ce SNP dans les deux groupes. Par la suite, nous avons testé si des haplotypes du gène *CARD15* pouvaient jouer un rôle dans la prédisposition au psoriasis. Etant donné l'existence d'un faible déséquilibre de liaison dans le gène, nous n'avons pu tester que la transmission préférentielle aux

FIG. 3.6: Structure DL du gène *CARD15*TAB. 3.10: Identification et test d'association des TagSNPs de *CARD15* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	N°	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT ^d Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>CARD15</i> (16q12)	1	rs2076752 ¹	5' UTR		4345295~96	G>A	22 ²	A	33	92	-2.790	0.005
	2	rs2111235	Intron 2		4348168	C>T	25 ¹	D	29	92	0.848	0.40
	3	rs8057341	Intron 2		4352179	G>A	25.8 ¹	H	29.1	92	0.677	0.50
	4	rs17221417	Intron 2		4353781	C>G	35.8 ¹	H	35.5	91	-2.447	0.01
	5	rs2066842	Exon 4	P268S	4358823	C>T	36.2 ¹	H				
	6	rs2066844 ^{2,3}	Exon 4	R702W	4360125	C>T	11 ¹	A	7.4	31	-2.065	0.04
	7	rs7203691	Intron 6		4367623	G>A	36.4 ²	D	36.2	107	1.612	0.11
	8	rs10521209	Intron 7		4369908	T>G	40.8 ¹	H	36.5	108	1.46	0.14
	9	rs2066845 ²	Exon 8	G908R	4370739	G>C	1.7 ¹	A	1	6	***	***
	10	rs5743291	Exon 9	V955I	4371475	G>A	10.8 ¹	H	10.9	48	1.550	0.12
	11	rs1077861 ¹	Intron 10		4373746	A>T	25 ¹	A	33.3	99	0.122	0.90
	12	rs2066847²	Exon 11	P1006fs	4377977~78	->C	0 ²	A				
	13	rs5743293²	Exon 11	L1007fs	4377980~81	->C	2.5 ²	A				
	14	rs3135500 ¹	3' UTR		4381085	G>A	39.7 ¹	A	37.3	108	1.063	0.29

^{a1} associé avec l'asthme ou la rhinoconjonctivite allergique (Weidinger et al., 2005), ² associé avec la maladie de Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001), ³ associé avec l'arthrite psoriasique (Rahman et al., 2003), ^b NM_022162, ^c NT_010498.15, ^d "***" : aucun test réalisé en raison d'un faible nombre de familles informatives (N<10)

individus atteints de toutes les combinaisons de paires de SNPs. Nombre de ces combinaisons sont trouvées associées au psoriasis (Table 3.11). Nous pouvons observer une sous-transmission préférentielle des parents hétérozygotes aux enfants atteints de nombreux haplotypes ($Z < 0$), avec une valeur de P variant de 0.001 à 0.04 après 1000000 permutations. Ces haplotypes protecteurs sont constitués d'au moins un des SNPs associés comme rs2076752, rs17221417 et rs2066844 ou, ayant une tendance à être associés à la maladie comme rs7203691, rs10521209, rs5743291, rs3135500. Les quelques haplotypes à risque ($Z > 0$) associés au psoriasis sont dépendants de trois allèles à risque. L'allèle fréquent de rs2076752 (G) est présent sur des haplotypes de fréquences élevées (70%) ou plus basses (38%/10%) qui donnent, lors du test d'association, un P variant de 0.004 à 0.05. L'allèle fréquent de rs17221417 (C) est présent sur deux haplotypes de haute fréquence (70%) qui sont associés au psoriasis avec un P de 0.01. De plus, l'allèle rare de rs5743291 (A) cible deux haplotypes de 10% qui sont associés à la maladie avec un P proche de 0.03. Puisque la fréquence des haplotypes associés à la maladie est similaire à celle des allèles qui les représentent, cela semble montrer que ce sont les allèles fréquents, G et C, pour les deux premiers SNPs ainsi que l'allèle rare A de rs5743291 qui confèrent le risque pour le psoriasis. A part pour rs5743291, cette analyse haplotypique semble refléter les résultats obtenus lors de l'étude individuelle des SNPs dans le lot I. L'association des trois SNPs, identifiés précédemment avec la maladie, a pu être confirmée lors de l'étude avec la méthode "LNMs". En effet, nous observons une valeur de P de 0.003, 0.003 et 0.01 pour les polymorphismes rs2076752, rs17221417 et rs2066844 respectivement (Table 3.12). L'étude de deux marqueurs, rs2076752 et rs17221417, dans le lot II moins informatif, ainsi que celle dans les lots I et II combinés, suggère, même faiblement, l'association des deux polymorphismes avec le psoriasis ($P=0.04$ et $P=0.06$ respectivement) (Table 3.13). En revanche, pour rs2066844, nous observons une association avec la maladie dans la deuxième cohorte, équivalente à celle obtenue dans le premier lot. Cette association dans le premier lot est due à l'effet protecteur de l'allèle rare T alors que dans le deuxième lot, l'association est due à l'effet à risque de l'allèle T, ce qui entraîne l'absence d'association lors de l'étude des deux lots combinés. Lors de la dernière étude, l'association de plusieurs variants (rs2076752, rs17221417, rs7203691, rs10521209, rs5743291 et rs3135500) avec le psoriasis est observée seulement lorsque nous analysons les personnes porteuses de l'allèle HLA-*Cw6*, indiquant ainsi une interaction de ces deux gènes dans la maladie (Table 3.14).

A la suite de ces résultats, aucune association probante n'a été détectée entre le psoriasis et les trois variants de *CARD15* prédisposant à la maladie de Crohn (rs2066844, rs2066845 et rs5743293) dans nos familles françaises. Ceci semble confirmer les résultats précédemment obtenus sur le psoriasis réalisées sur d'autres

TAB. 3.11: Analyse d'association des haplotypes de *CARD15* sur le Lot I par FBAT

SNPs	Haplotype	Lot I				
		MAF	Z	P	1,000,000 permutations ^a P	1,000,000 permutations ^a P _{Tot}
1/2	AC	29.2	-3.164	0.0016	0.0018	(0.0069)
1/3	AG	29.2	-3.198	0.0014	0.0012	(0.0060)
1/4	GC	70.2	2.673	0.0075	0.0076	(0.014)
	AG	28.3	-2.727	0.0064	0.0059	
1/6	GC	71.2	2.811	0.0050	0.0057	(0.0075)
1/7	AG	29.2	-2.725	0.0064	0.0070	(0.025)
1/8	AT	28.9	-2.789	0.0053	0.0042	(0.018)
1/9	GG	71.0	2.802	0.0051	0.0042	(0.0041)
1/10	AG	29.1	-3.004	0.0027	0.0026	(0.0045)
	GA	10.7	2.550	0.011	0.0093	
1/11	GA	37.8	1.961	0.049	0.049	(0.0068)
	AA	25.8	-2.535	0.011	0.0099	
1/14	AG	28.7	-2.738	0.0061	0.0061	(0.035)
2/4	CG	29	-2.728	0.0064	0.0064	(0.032)
2/6	CT	6	-2.551	0.011	0.015	(0.084)
2/7	CG	31.2	-2.783	0.0054	0.0053	(0.032)
2/8	CT	31.1	-2.842	0.0045	0.0038	(0.016)
2/10	CG	56.4	-2.303	0.021	0.017	(0.031)
	CA	10.4	2.092	0.036	0.035	
2/14	CG	32.3	-2.173	0.030	0.024	(0.14)
3/4	GG	28.9	-2.714	0.0066	0.0062	(0.033)
3/6	GT	6.1	-2.554	0.011	0.013	(0.079)
3/7	GG	30.5	-2.547	0.011	0.012	(0.021)
3/8	GT	30.4	-2.607	0.0091	0.0095	(0.038)
3/10	GG	56.3	-2.296	0.022	0.020	(0.031)
	GA	10.3	2.069	0.039	0.035	
3/14	GG	32.1	-2.041	0.041	0.040	(0.19)
4/6	CC	70.7	2.552	0.011	0.012	(0.013)
	GT	6.1	-2.125	0.034	0.026	
4/7	GG	29.6	-2.361	0.018	0.015	(0.060)
4/8	GT	29.6	-2.361	0.018	0.018	(0.060)
4/9	CG	70.5	2.457	0.014	0.013	(0.011)
4/10	GG	29.7	-2.535	0.011	0.015	(0.020)
	CA	10.3	2.233	0.026	0.022	
4/11	GA	26.1	-2.047	0.04	0.044	(0.028)
4/14	GG	29.4	-2.427	0.015	0.015	(0.051)
6/7	TG	6	-2.203	0.028	0.023	(0.070)
6/8	TT	6	-2.203	0.028	0.027	(0.084)
6/9	CG	92.8	2.522	0.012	0.012	0.016)
	TG	5.9	-2.065	0.039	0.038	
6/10	TG	6	-2.092	0.036	0.044	(0.11)
6/11	TA	6	-2.542	0.011	0.013	(0.057)
6/14	TG	5.9	-2.134	0.033	0.030	(0.15)
7/11	GA	27.7	-2.236	0.025	0.030	(0.032)
8/11	TA	27.5	-2.003	0.045	0.050	(0.10)

^a La valeur exacte de P du Z est calculée *via* la méthode de Monte-Carlo pour 1.000.000 de permutations pour chaque haplotype séparément (nommé "1 000 000 permutations P") et pour le test global (nommé "1 000 000 permutations P_{Tot}").

TAB. 3.12: Analyse d'association des TagSNPs de *CARD15* dans le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I		
			P	ORAA [95% CI]	ORaa [95% CI]
rs2076752	G>A	33	3.17 x10⁻³	0.71 [0.57-0.89]	0.51 [0.40-0.63]
rs17221417	C>G	35.5	3.22 x10⁻³	0.71 [0.57-0.89]	0.51 [0.41-0.64]
rs2066844	C>T	7.4	1.12 x10⁻²	0.56 [0.36-0.88]	0.31 [0.20-0.49]

TAB. 3.13: Analyse d'association des TagSNPs de *CARD15*, suggestifs dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs2076752	33	92	-2.79	0.005	31.3	65	0.33	0.74	32	156	-2.022	0.04
rs17221417	35.5	91	-2.45	0.01	29.3	59	0.16	0.87	32.2	149	-1.917	0.06
rs2066844	7.4	31	-2.07	0.04	7.2	21	2.12	0.03	7.3	52	-0.054	0.96

TAB. 3.14: Analyse d'association des TagSNPs de *CARD15* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
				présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P		
rs2076752	G>A	33	0.005	58	-2.303	0.02	48	-1.514	0.13
rs2111235	C>T	29	0.40	59	-0.476	0.63	44	1.834	0.07
rs8057341	G>A	29.1	0.50	59	-0.626	0.53	44	1.801	0.07
rs17221417	C>G	35.5	0.01	58	-2.227	0.03	47	-1.040	0.30
rs2066844	C>T	7.4	0.04	17	-1.389	0.17	19	-1.461	0.14
rs7203691	G>A	36.2	0.11	69	2.436	0.01	51	-0.359	0.72
rs10521209	T>G	36.5	0.14	70	2.321	0.02	51	-0.508	0.61
rs2066845	G>C	1	NC	5	***	***	2	***	***
rs5743291	G>A	10.9	0.12	28	2.939	0.003	26	-0.526	0.60
rs1077861	A>T	33.3	0.90	63	-1.145	0.25	46	1.586	0.11
rs3135500	G>A	37.3	0.29	67	2.546	0.01	55	-1.290	0.20

populations caucasiennes [Nair et al., 2001, Borgiani et al., 2002, Young et al., 2003, Plant et al., 2004, Lascorz et al., 2005]. Cependant, nos résultats semblent indiquer une contribution de ce gène dans la prédisposition au psoriasis. En effet, une preuve d'association, certes faible, entre la maladie et deux SNPs, rs2076752 dans la région 3'UTR et rs17221417 dans l'intron 2, indépendante du locus *PSORS1*, est observée après les différentes analyses sur nos deux cohortes françaises. De plus, dans nos 45 familles, il semble que le SNP rs5743291, (V955I) dans l'exon 9, soit associé à la maladie soit sous forme d'haplotype est conjointement avec l'allèle à risque HLA-*Cw6*. Lors de cette étude, nous nous sommes focalisés sur le gène lui-même en incorporant les informations venant de la littérature et des bases de données, parfois difficilement comparables entre elles. Une étude récente de la structure de DL de ce gène avec les données HapMap nous indique que les deux SNPs fortement associés dans notre étude sont en déséquilibre de liaison entre eux ($r^2=0.89$) et que rs17221417 est aussi en fort déséquilibre de liaison avec rs2066842 (P268S) dans l'exon 4 ($r^2=0.96$). Par conséquent, ce sont trois variants, un dans la région 5'UTR et deux codants non synonymes (V955I et P268S) qui pourraient intervenir sur la synthèse de la protéine normale. Le variant rs2066842 (P268S) provoque par exemple un changement d'acide aminé avec des propriétés chimiques différentes (hydrophobe vers hydrophile), pouvant modifier la forme finale de la protéine. Ce variant a été également montré comme étant associé à CD dans la population juive ashkénaze [Sugimura et al., 2003]. Cependant, lors de la seule autre étude globale du gène, aucune preuve d'association n'a été identifiée entre le psoriasis et les deux SNPs rs2066842 et rs2076752 [Plant et al., 2004]. Il existe d'autres variants codants non étudiés mais validés dans la population caucasienne. Excepté des variants rares (<1%), la plupart sont des variants synonymes en fort déséquilibre de liaison avec un SNP déjà analysé dans notre population.

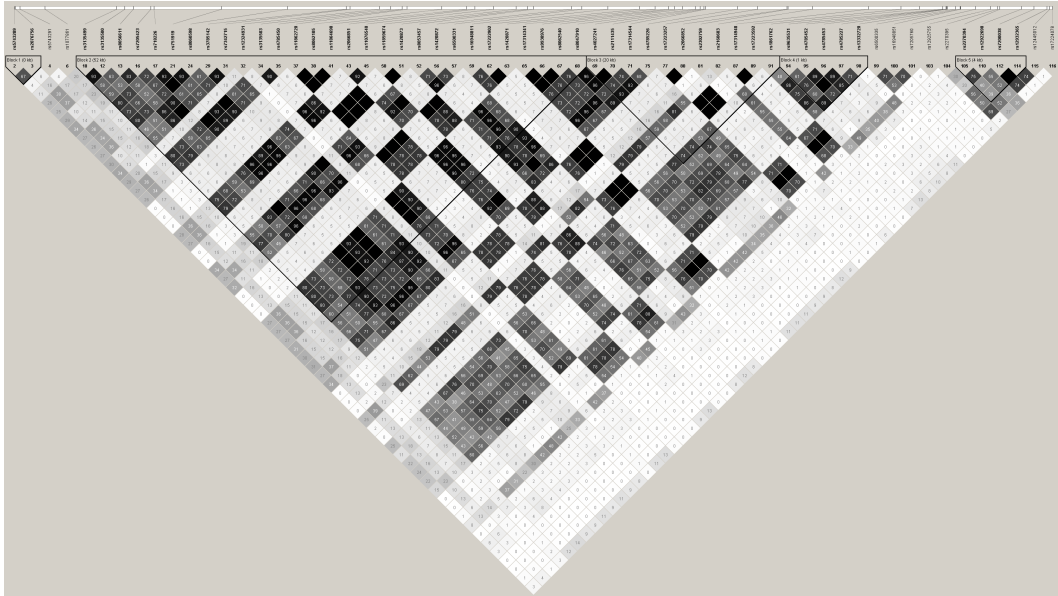
CARD15 semble être un facteur de prédisposition au psoriasis mais il serait nécessaire que ces résultats soient confirmés par d'autres études indépendantes (sur d'autres populations).

Le gène *CYLD* (CYLinDromatosis tumor suppressor)

Comme décrit précédemment, de nombreuses études ont identifié un locus de prédisposition au psoriasis, désigné *PSORS8*, sur le chromosome 16q [Nair et al., 1997, Allen et al., 2003, Karason et al., 2003, Sago et al., 2004]. En plus du gène candidat *CARD15*, cette région comporte un autre gène d'intérêt, *CYLD*, qui régule également la voie NF-*kB*. Le gène *CYLD*, qui est exprimé de façon ubiquitaire, code pour une protéine suppresseur de tumeur cytoplasmique de fonction encore peu connue. Des analyses sur le plan protéique ont révélé un domaine central contenant des motifs spécifiques des protéines associées aux microtubules ainsi qu'un domaine catalytique, au niveau de la région C-terminale, caracté-

ristique des enzymes de déubiquitination. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle réversible de protéines cibles par une chaîne enzymatique, aboutissant à la liaison covalente d'une ou de plusieurs protéines "d'ubiquitine" sur une lysine acceptrice de la protéine cible. La poly-ubiquitination entraîne essentiellement la dégradation de la protéine cible par un complexe enzymatique. Cependant, elle peut également moduler les activités, le trafic ou la localisation de certaines protéines cibles.

Des mutations, principalement au niveau du domaine catalytique du gène *CYLD*, ont été associées avec des maladies génétiques de la peau comme la forme familiale de trichoépithéliome multiple, la cylindromatose familiale et le syndrome de Brooke-Spiegler, caractérisées par la survenue de multiples tumeurs cutanées bénignes (au niveau du visage, du cuir chevelu ou des glandes sudoripares). Ces maladies résultent de mutations à type de "perte de fonction" du gène *CYLD* qui aboutissent à une activation inappropriée de voies de signalisation (NF- κ B et JNK). Ceci pourrait déclencher la transformation néoplasique (division cellulaire incontrôlée) en partie par une résistance élevée à l'apoptose [Bignell et al., 2000, Reiley et al., 2004, Stegmeier et al., 2007]. Même si les mécanismes moléculaires restent encore peu identifiés, de nombreuses études semblent indiquer que *CYLD* régulerait négativement deux voies de signalisation impliquées dans les réponses inflammatoires et immunitaires et la croissance cellulaire, celle de NF- κ B et de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) (la voie d'un autre facteur de transcription AP-1). Dépendant de l'activation de différents récepteurs de l'immunité tels que TNFRs (*Tumor Necrosis Factor receptors*), Toll-like récepteurs (TLR) ou TCR par différents stimuli, l'enzyme *CYLD* à activité de déubiquitinyase interagit avec des protéines activatrices de ces voies de signalisation et leur enlève les chaînes d'ubiquitines présentes au niveau des lysines (lysine 63 ou 48 selon la protéine), nécessaires à leur activité. Par exemple, la régulation négative de l'activation de la voie NF- κ B par *CYLD* semble dépendre de l'interaction de *CYLD* avec un composant du complexe IKK, NEMO (*NF- κ B essential modulator*). Elle dépendrait aussi de la déubiquitination (lysine 63) par *CYLD* de deux autres protéines associées à des récepteurs immuns TRAF (*TNF receptor-associated factor*), TRAF2 et TRAF6 [Trompouki et al., 2003]. Ceci pourrait entraîner l'inhibition du complexe IKK (*I κ B kinase*) et par conséquent, de NF- κ B, favorisant ainsi l'apoptose. Il est intéressant de noter que l'action inhibitrice de *CYLD* sur les deux voies de signalisation IKK et JNK semble être dépendante des stimuli. *CYLD* est, par exemple, un régulateur négatif de la voie JNK lors d'une stimulation des différents récepteurs immuns (TNFR, TLR 4 ou IL1-R) par les stimuli TNF α , LPS et IL1 β , contrairement à son action sur la voie IKK. *CYLD* intervient sur cette dernière lors de stimulations par LPS et IL1 β et non par TNF α , en agissant sur une protéine commune aux récepteurs stimulés, telle que TRAF6. L'ubiquitination de TRAF2 semble d'ailleurs essentielle dans l'activation de la voie JNK stimulée par

FIG. 3.7: Structure DL du gène *CYLD* (voir annexe page 249)TAB. 3.15: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *CYLD* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	N°	SNP ID	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>CYLD</i> (16q12)	1	rs8056611			4381846	A>G	48.3 ¹	H	49.3	106	1.490	0.14
	2	rs718226			4383762	A>G	43.3 ¹	H	39.4	103	1.476	0.14
	3	rs3785142	Intron 5		4401346	C>T	49.2 ¹	H	50.7	100	0.967	0.33
	4	rs12324931	Intron 6		4404357	A>C	9.6 ¹	H				
	5	rs1420871	Intron 11		4429631	G>A	6.7 ¹	H	10.6	44	0.213	0.83
	6	rs4027241	Intron 13		4433765	G>A	49.2 ¹	H	51	101	0.944	0.35
	7	rs4785226	Intron 15		4437163	C>A	49.1 ¹	H	44.5	96	-1.109	0.27
	8	rs2066852	Exon 18	D804D	4441717	C>T	6.7 ¹	H	9.7	46	0.035	0.97
	9	rs2302759	Intron 18		4441800	C>T	14.2 ¹	H	13.5	56	-0.708	0.48
	10	rs1861762			4453847	G>A	48.3 ¹	H	51	100	-1.871	0.06
	11	rs9635531			4455994	C>T	38.8 ¹	H				
	12	rs4785452			4456276	C>T	47.5 ¹	H	50.4	104	-2.123	0.03
	13	rs4785453			4456361	C>T	49.1 ¹	H				
	14	rs13332720			4457160	A>G	46.4 ¹	H	40.6	93	1.115	0.27
	15	rs6500335			4457555	G>C	7.3 ¹	H	8.8	38	-0.134	0.89
	16	rs16948851			4457608	A>G	6.9 ¹	H	8.9	42	-0.249	0.80
	17	rs7205760			4458972	G>C	9.2 ¹	H	13.1	54	0.456	0.65
	18	rs12925755			4460361	C>A	33.6 ¹	H	33	109	1.037	0.33

^b NM_015247; ^c NT_010498.15

TNF α , plus que dans la voie IKK [Reiley et al., 2004]. Néanmoins, l'implication de CYLD dans la régulation de ces deux différentes voies de signalisation dans les cellules T serait apparemment due à son rôle dans le contrôle de l'activité d'une protéine intervenant en amont de ces deux voies, la Tak1 (*transforming growth factor-B-activated kinase1*). CYLD interagit physiquement avec cette kinase et inhibe ainsi son ubiquitination [Reiley et al., 2007]. CYLD a donc un rôle important dans la régulation négative de l'activation des cellules T *via* l'activation de Tak1 et des kinases en aval (JNK et IKK) dans les cellules T. Ce rôle pivot de CYLD a d'ailleurs été constaté lors de l'étude d'un modèle murin *Cyld*^{-/-}. Les souris *Cyld*^{-/-} développent spontanément des anomalies de l'inflammation du colon, similaires aux symptômes de la maladie humaine inflammatoire de la voie gastro-intestinale, la maladie de Crohn. Ces symptômes d'auto-immunité et d'inflammation du colon sont dus à l'hypersensibilité des cellules T *Cyld*^{-/-} à la stimulation du TCR [Reiley et al., 2007]. Paradoxalement, cette protéine semble aussi intervenir dans l'étape de maturation du développement des cellules pré-curseurs des cellules T (les thymocytes) en régulant cette fois-ci positivement le signal de la voie de signalisation TCR. Pour cela, CYLD interagirait avec une protéine kinase initiatrice du signal TCR, Lck sous forme active, en lui enlevant les chaînes poly-ubiquitines des lysines 48 et 63 et en favorisant l'association avec la protéine Zap-70. Cette activation est nécessaire pour enclencher les cascades de cette voie de signalisation [Reiley et al., 2006]. De plus, CYLD aurait également une fonction dans le cycle cellulaire, indépendante de son rôle dans la régulation de la voie NF- κ B. Il serait requis pour l'entrée en mitose et pour la cytokinèse (division du cytoplasme) en régulant la poly-ubiquitination de certains régulateurs de la division cellulaire [Stegmeier et al., 2007].

En raison des différentes activités de CYLD décrites ci-dessus, nous avons voulu tester par une étude d'association l'implication du gène *CYLD* dans le psoriasis chez 45 familles. Les données sur les SNPs sélectionnés selon l'état du déséquilibre de liaison présent au niveau du locus (Figure 3.7) ainsi que les résultats obtenus après leur analyse par FBAT sont exposés dans le tableau 3.15. Cette analyse montre une faible association entre le psoriasis et deux SNPs, rs1861762 et rs4785452 avec une valeur de P de 0.06 et 0.03 respectivement. Lors de l'analyse haplotypique de toutes les combinaisons de paires de SNPs du gène *CYLD*, de faibles associations entre la maladie et deux haplotypes ont également été obtenues ($0.01 < P < 0.04$) (Tableau 3.16). Cependant, cette analyse ne révèle pas de nouvelles associations car les deux haplotypes protecteurs associés sont constitués d'au moins un des SNPs associés dans l'analyse par SNP (rs4785452). Nous avons tenté néanmoins de répliquer ces résultats. Aucune association n'a été observée entre la maladie et les deux SNPs lors de leur analyse par la méthode "LNMs" (Tableau 3.17). En revanche, malgré l'absence d'association dans le lot II, leur

TAB. 3.16: Analyse d'association des haplotypes de *CYLD* sur le Lot I par FBAT

SNPs	Haplotype	Lot I				
		MAF	Z	P	1,000,000 permutations P	1,000,000 permutations P _{Tot}
1/12	AT	45.9	-2.004	0.045	0.041	(0.11)
10/12	GC	48.9	2.532	0.011	0.011	(0.019)
	AT	48.1	-2.274	0.023	0.023	

TAB. 3.17: Analyse d'association des TagSNPs de *CYLD* dans le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I			
			P	ORaa	[95% CI]	ORaa [95% CI]
rs1861762	G>A	51	0.19	1.14	[0.94-1.38]	1.29 [1.07-1.57]
rs4785452	C>T	50.4	0.33	1.10	[0.91-1.34]	1.21 [0.99-1.48]

TAB. 3.18: Analyse d'association des TagSNPs de *CYLD*, suggestifs dans le Lot I, faite sur un deuxième lot de 83 familles (Lot II) et sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs1861762	51	100	-1.87	0.06	49.2	70	-0.251	0.80	50.1	170	-1.638	0.10
rs4785452	50.4	104	-2.12	0.03	46	54	-0.897	0.37	48.1	158	-2.239	0.03

TAB. 3.19: Analyse d'association des TagSNPs de *CYLD* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I								
		Non stratifié		Stratifié selon :						
		MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>			
		N	Z	P	N	Z	P			
rs8056611	A>G	49.3	0.14	68	2.839	0.005	53	-1.040	0.30	
rs718226	A>G	39.4	0.14	64	2.420	0.01	49	-0.622	0.53	
rs3785142	C>T	50.7	0.33	63	1.913	0.05	49	-0.722	0.47	
rs1420871	G>A	10.6	0.83	32	-0.179	0.86	20	0.633	0.53	
rs4027241	G>A	51	0.35	64	1.148	0.25	51	0.058	0.95	
rs4785226	C>A	44.5	0.27	62	-2.015	0.05	45	0.747	0.46	
rs2066852	C>T	9.7	0.97	32	-0.180	0.86	22	0.305	0.76	
rs2302759	C>T	13.5	0.48	39	-1.211	0.23	23	0.619	0.54	
rs1861762	G>A	51	0.06	68	-1.881	0.06	49	-0.534	0.60	
rs4785452	C>T	50.4	0.03	68	-2.772	0.006	52	0.098	0.92	
rs13332720	A>G	40.6	0.27	57	1.926	0.05	45	-0.550	0.58	
rs6500335	G>C	8.8	0.89	26	-0.009	0.99	19	-0.200	0.84	
rs16948851	A>G	8.9	0.80	29	-0.144	0.89	19	-0.213	0.83	
rs7205760	G>C	13.1	0.65	35	0.904	0.37	27	-0.344	0.73	
rs12925755	C>A	33	0.33	64	1.695	0.09	59	-0.407	0.68	

analyse dans l'ensemble des 126 familles confirme l'association du rs4785452 avec le psoriasis ($P=0.03$) (Tableau 3.18).

De plus, l'association de ce gène au psoriasis est aussi dépendante de l'allèle majeur à risque, HLA-*Cw6*. Plusieurs associations sont observées entre le psoriasis et certains des SNPs de *CYLD* lorsque seuls les porteurs de l'allèle HLA-*Cw6* sont analysés ($P<0.04$). Les meilleures associations sont obtenues pour les SNPs rs8056611 et rs4785452 ($P=0.005$, $P=0.006$ respectivement)(Tableau 3.19).

L'ensemble de ces résultats indique donc une association entre ce gène et le psoriasis dépendant de HLA-*Cw6*. Une étude récente de la structure de DL du locus indique que les SNPs associés ne sont pas en fort déséquilibre de liaison ($r^2<0.40$) avec ceux associés de *CARD15*, indiquant ainsi une nouvelle association. Le seul SNP qui reste associé dans la totalité des familles est rs4785452 à environ 10kb en aval de *CYLD* proche de la région 3' du gène *LOC727992* codant une protéine de fonction inconnue. Ce variant n'est pas en déséquilibre de liaison avec le variant rs2066852, le seul polymorphisme codant de *CYLD* connus dans la population caucasienne. L'association observée pourrait être due à d'autres variants non encore identifiés, dans la région promotrice ou dans le gène. Cependant, en raison de la proximité de ces deux gènes, il se pourrait que l'association observée pour ces gènes soit due à un SNP dans la région encore inconnue en déséquilibre de liaison avec l'ensemble des SNPs associés de *CYLD* et *CARD15*. Une étude plus approfondie de ce gène serait nécessaire afin de vérifier le rôle fonctionnel hypothétique du SNP rs4785452 ou d'identifier le vrai SNP causal.

Gènes «non associés» au psoriasis dans notre étude

Les gènes identifiés comme gènes conférant une prédisposition au psoriasis : les gènes *SLC9A3R1* (SoLute Carrier family 9 isoform 3 Regulator 1), *NAT9* (AcetylTransferase family member 9) et *RAPTOR* (Regulatory Associated Protein of mTOR)

Comme détaillé dans l'introduction, de nombreuses études réalisées sur différentes populations (USA, Suède, Irlande, Chine, Taiwan, Maroc) ont permis d'identifier la région 17q25 comme une région candidate forte pour le psoriasis (*PSORS2*) [Tomfohrde et al., 1994, Nair et al., 1997, Enlund et al., 1999a, Samuelsson et al., 1999, Zheng et al., 2003, Hwu et al., 2005, Birnbaum et al., 2006]. Des études de liaison (non paramétrique) suivies d'association (TDT) réalisées sur cette région de linkage (17q23-25) avec 242 familles nucléaires européennes, ont conduit à affiner la zone d'intérêt et à identifier deux régions significativement associées avec le psoriasis, l'une au niveau des gènes *SLC9A3R1* et *NAT9* et l'autre, plus distal (6 Mb), au niveau du gène *RAPTOR* [Helms et al., 2003, Speckman et al., 2003]. Dans la région *SLC9A3R1* / *NAT9*, 5 variants non codants (rs745318,

rs734232, rs895691, rs12797, rs2305214) sont fortement associés avec la maladie ($P_{TDT} < 0.005$).

Les gènes *SLC9A3R1/NAT9*

SLC9A3R1 (solute carrier family sodium (Na^+)/hydrogen (H^+) exchanger 9, isoform 3 regulatory factor 1) code une phosphoprotéine contenant deux domaines PDZ (permettant les interactions protéine-protéine). Cette protéine est impliquée, entre autres dans la biologie de la membrane épithéliale en liant les protéines de membrane au cytosquelette, permettant ainsi la compartimentation correcte des protéines dans le domaine apical des cellules épithéliales. Elle aurait aussi un rôle de régulateur négatif de la formation des synapses immunes (interaction entre les cellules immunitaires) et de l'activation des cellules T en fixant le radeau lipidique (Cbp/PAG) au cytosquelette (ERM). Après reconnaissance de l'antigène par les cellules T, l'activation complète des cellules T nécessite une réorganisation du cytosquelette afin de recruter des molécules nécessaires à la réponse immune dans les radeaux lipidiques au niveau de la synapse. Cette protéine est exprimée dans la peau, plus fortement dans la couche granulaire mais aussi dans les cellules T. Elle est sous-réglée dans les cellules T actives. Ces observations sont indépendantes de l'état (sain ou malade) de la peau [Helms et al., 2003].

NAT9 code une protéine, qui est le membre 9 de la famille des N-acétyltransférases, de fonction inconnue. La protéine est exprimée dans les cellules T actives ou non, dans les kératinocytes quel que soit le type de peau (peau saine ou peau psoriasique et saine du patient) ou l'individu étudié (malade ou sain). La plus forte expression est observée dans de nombreuses cellules cancéreuses (ovaire, sein) [Helms et al., 2003].

Les deux gènes semblent être de bons candidats pour le psoriasis, d'autant plus qu'un des variants associés (rs734232), situé entre les deux gènes, est fonctionnellement intéressant. En effet, il abolit un site putatif de liaison du facteur de transcription RUNX1 (*Runt-related transcription factor 1*) *in vivo* et *in vitro* [Helms et al., 2003]. De plus, deux autres variants introniques altérant aussi un site de liaison pour RUNX1 au niveau des gènes *PDCD1* et *SLC22A4* ont également été montrés associés à deux autres maladies auto-immunes, lupus aigüe disséminé (SLE) et polyarthrite rhumatoïde (RA) [Prokunina et al., 2002, Tokuhiko et al., 2003]. RUNX1 est un facteur de transcription impliqué dans le développement des cellules hématopoïétiques. Il se pourrait que pour le psoriasis, la perte du site de liaison de RUNX1 perturbe la régulation de l'expression des gènes *SLC9A3R1* et/ou *NAT9* dans les cellules hématopoïétiques et par conséquent, le développement et l'activation des cellules T.

Néanmoins, la réplique indépendante de l'association dans diverses populations reste difficile. En effet, une étude d'association sur 233 trios anglais indépendants

n'a pas permis de confirmer l'association des 5 SNPs (rs7420, rs734232, rs895691, rs12797, rs2305214) associés avec le psoriasis [Capon et al., 2004b]. De même, malgré leur preuve de liaison dans la région 17q25 à 1.7cM du côté distal du variant rs734232 (D17S785, $NPL_{all} = 2.73$, $P=0.0002$), aucune association entre 3 variants de *SLC9A3R1* et/ou *NAT9* et le psoriasis n'a été observée lors de l'étude de 517 familles allemandes et américaines [Stuart et al., 2005]. Une observation semblable a été décrite lors d'une étude du variant candidat (rs734232) réalisée sur des patients atteints de psoriasis vulgaire (PsV) allemands (300 trios et 281 cas) ainsi que sur 375 patients PsA [Huffmeier et al., 2005b]. Cependant, la stratification selon l'haplotype à risque de *PSORS1* (HLA-*Cw6*) indique une association de l'allèle fréquent de ce SNP avec l'arthrite psoriasique chez les patients non-HLA-*Cw6* ($P=0.0003$) [Huffmeier et al., 2005b]. L'absence d'association avec ce SNP ou d'autres variants est aussi observée pour d'autres maladies auto-immunes comme l'arthrite psoriasique (PsA) ou la dermatite atopique (AD), ayant pourtant ce locus de prédisposition en commun. Cela a même été constaté dans différentes populations, par exemple, lors d'études cas-témoins sur des patients PsA provenant de l'île de Terre-Neuve (59 *versus* 238 témoins) [Butt et al., 2005] ou sur des patients AD japonais (114 *versus* 89) [Hosomi et al., 2005] ou encore lors d'étude TDT sur 426 familles européennes atteint d'AD [Morar et al., 2006]. De plus, lors d'une étude italienne (245 *versus* 150), aucune association entre deux SNPs (rs7420, rs734232) et PsA n'a été montrée, que le locus *PSORS1* soit pris en compte ou non dans l'analyse [Giardina et al., 2006].

Malgré ces résultats contradictoires, nous voulions surtout essayer de répliquer, dans nos 45 familles, l'association observée lors de l'étude initiale faite par Helms et ses collaborateurs en 2003, entre le psoriasis et 5 variants non codants présents au niveau des gènes *SLC9A3R1* et *NAT9* (rs7420, rs734232, rs895691, rs12797, rs2305214), dont le variant abolissant le site de liaison à RUNX1. L'ensemble des résultats obtenus, lors de l'analyse par FBAT des 5 SNPs, ainsi que des haplotypes correspondants, sont exposés dans les tableaux 3.20 et 3.21. Aucune association n'a été observée entre le psoriasis et les 5 variants ainsi que lors de leur analyse après la stratification des familles selon le facteur de risque de *PSORS1* (Tableau 3.22). Cette absence d'association du psoriasis avec chacun des cinq variants dans nos 45 familles françaises est en rapport avec d'autres études réalisées sur différentes populations de tailles diverses (Angleterre, USA/Allemagne) [Capon et al., 2004b, Stuart et al., 2005, Huffmeier et al., 2005b].

L'absence de réplification sur différents cohortes indépendantes impose une certaine prudence quant à l'implication de ces variants, en particulier du SNP intervenant dans la fixation du facteur de transcription RUNX1, dans la pathogenèse du psoriasis. Dans notre population, ces variants ne semblent pas intervenir comme

TAB. 3.20: Identification et test d'association des TagSNPs de *SLC9A3R1/NAT9* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
<i>SLC9A3R1</i> <i>/NAT9</i> (17q25)	rs7420 ¹	3'NG		6691487	A>G	45.8 ¹	A	51	100	-0.195	0.85
	rs734232 ¹	3'NG		6692003	G>A	44.9 ¹	A	41.7	99	-0.266	0.79
	rs895691 ¹	3'NG		6692572	G>T	44 ¹	A	41.7	102	-0.159	0.87
	rs12797 ¹	3' UTR		6693265	C>T	45.8 ¹	A	42	99	-0.395	0.69
	rs2305214 ¹	Intron 4		6695242	C>T	49.1 ¹	A	41	100	-0.372	0.71

^{a1} associé avec le psoriasis (Helms et al., 2003), ^b NM_015654, ^c NT_010641.15

TAB. 3.21: Analyse d'association des haplotypes de *SLC9A3R1/NAT9* sur le Lot I par FBAT

Haplotype		Lot I	
		MAF	P
H1	AATTT	45.5	0.36
H2	GGGCC	45.5	0.62
H3	AGGCC	7.7	0.27

TAB. 3.22: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC9A3R1/NAT9* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
				présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P		
rs7420	A>G	51	0.85	59	0.253	0.80	53	-0.596	0.55
rs734232	G>A	41.7	0.79	56	-0.481	0.63	55	0.149	0.88
rs895691	G>T	41.7	0.87	58	-0.523	0.60	57	0.352	0.73
rs12797	C>T	42	0.69	56	-0.682	0.50	55	0.183	0.86
rs2305214	C>T	41	0.71	57	-0.712	0.48	55	0.253	0.80

facteurs de prédisposition au psoriasis. Même si aucune liaison à ce locus n'a été identifiée dans nos familles, nous ne pouvons pas exclure entièrement le gène en raison de l'absence d'analyse globale du gène.

Le gène *RAPTOR*

Comme décrit précédemment, un second locus de prédisposition au psoriasis a été identifié sur le chromosome 17q25, proche du marqueur initialement lié D17S784 et du gène *RAPTOR* (*Regulatory associated protein of mTOR*). Ce gène code pour une protéine régulatrice qui s'associe à la protéine sérine thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycine*). En réponse à des signaux prolifératifs tels que les cytokines ou des facteurs de croissance (Insuline, IGF1..), la protéine mTOR joue un rôle clé dans la régulation traductionnelle de protéines impliquées dans de multiples voies de signalisation dont le contrôle du cycle cellulaire (VEGF,...) ou le transfert du signal d'activation et de prolifération de certaines cellules dont les lymphocytes T et les lymphocytes B. De par sa fonction et sa localisation, la protéine RAPTOR semble être un bon candidat pour le psoriasis.

De plus, des SNPs introniques du gène *RAPTOR* ont été montrés associés avec le psoriasis dans des familles américaines et anglaises [Helms et al., 2003, Capon et al., 2004b]. En effet, sur 233 trios anglais indépendants, une étude d'association de 3 SNPs de l'intron 3 de ce gène, initialement montrés associés dans l'étude de Helms (2003) (rs1564864, rs2019154, rs869190), a confirmé l'association de ce gène avec le psoriasis, plus particulièrement avec le SNP rs2019154 ($P=0.027$). Une stratification des trios selon leur provenance familiale (116 trios restants) a révélé, de manière plus significative, l'association de trois variants introniques avec la maladie (rs1564864 ($P=0.031$), rs2019154 ($P=0.008$), rs869190 ($P=0.05$) [Capon et al., 2004b]. Cependant, cette association n'a pas été confirmée lors de l'analyse de ces variants dans 517 familles allemandes et américaines atteintes de psoriasis [Stuart et al., 2005]. Des études sur l'implication de ces marqueurs dans d'autres maladies proches du psoriasis sur le plan clinique, comme le PsA et l'AD, ne montrent également aucune association probante. Le manque d'association de deux SNPs (rs869190, rs1561946) a aussi été remarqué lors d'une étude italienne cas-témoins sur le PsA (245 *versus* 150), même lorsque le locus *PSORS1* est considéré [Giardina et al., 2006]. Pour l'AD, une autre maladie de la peau où le chromosome 17q est aussi une région candidate, ce gène ne semble pas intervenir dans la prédisposition à cette maladie [Morar et al., 2006].

A la vue de ces résultats contradictoires, nous avons entrepris de répliquer, dans nos 45 familles, l'association, observée lors de l'étude initiale faite par Helms et ses collaborateurs (2003), entre le psoriasis et 3 variants introniques présents dans le gène *RAPTOR* (rs1564864, rs2019154, rs869190). L'ensemble des résultats obtenus, lors de l'analyse par FBAT des 2 SNPs finalement génotypés ainsi que

TAB. 3.23: Identification et test d'association des TagSNPs de *RAPTOR* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
KIAA1303	rs1564864 ¹	Intron 3		1045584	T>C	35.4 ²	A	23.4	89	0.710	0.48
<i>RAPTOR</i>	rs2019154 ¹	Intron 3		1057883	C/T	NC	A				
(17q25)	rs869190 ¹	Intron 3		1072132	G>T	37 ²	A	24.2	88	0.830	0.41

^{a1} associé avec le psoriasis (Helms et al., 2003), ^b NM_020761, ^c NT_024871.11

TAB. 3.24: Analyse d'association des haplotypes de *RAPTOR* sur le Lot I par FBAT

Haplotype		Lot I	
		MAF	P
H1	TG	74.5	0.49
H2	CT	24.9	0.45

TAB. 3.25: Analyse d'association des TagSNPs de *RAPTOR* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
				présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P		
rs1564864	T>C	23.4	0.48	54	0.138	0.89	49	0.900	0.37
rs869190	G>T	24.2	0.41	52	0.285	0.78	49	0.900	0.37

des haplotypes correspondants, sont exposés dans les tableaux 3.23 et 3.24. Même lorsque *PSORS1* est pris en compte, aucune association n'est observée entre le psoriasis et ces deux marqueurs (Tableau 3.25). Nos données contredisent les deux études anglaises et américaines, rapportant une association entre le psoriasis et *RAPTOR* [Helms et al., 2003, Capon et al., 2004b]. Néanmoins, ils sont en accord avec une étude plus récente réalisée sur un grand nombre de grandes familles allemandes et américaines [Stuart et al., 2005]. Comme expliqué précédemment, il serait intéressant de réaliser une étude globale du gène afin de l'exclure.

Nous pouvons cependant conclure que dans notre population, les deux variants de *RAPTOR* ne sont pas impliqués dans la liaison du locus *PSORS2*. D'ailleurs, plusieurs études plus récentes réalisées sur quelques familles identifient un autre gène potentiel pour *PSORS2* de fonction inconnue, le gène *ZNF750* situé du côté distal du gène *RAPTOR* (environ 2Mb), détaillé dans le chapitre Introduction [Hwu et al., 2005, Birnbaum et al., 2006, Yang et al., 2008]. Des études supplémentaires dans nos familles, par exemple l'étude complète du gène *RAPTOR* ou l'étude du nouveau gène d'intérêt *ZNF750* permettraient de confirmer ou d'exclure ces gènes.

Les gènes codant des transporteurs de molécules : les gènes *SLC22A4* et *SLC22A5* (SoLute Carrier family 22 member 4 et 5)

Un nouveau locus de prédisposition au psoriasis a été identifié dans la région distale sur le chromosome 5q31 lors de l'analyse de 86 familles suédoises. Un marqueur au niveau du 5q31 (D5S816) donne un NPL de 2.22 ($P=0.014$) dans ces familles et de 2.45 ($P=0.008$) dans le sous groupe de 44 familles, stratifiées selon des douleurs aux articulations [Samuelsson et al., 1999]. La même équipe a confirmé cette liaison avec l'ajout de 28 autres familles suédoises ($P=0.001$) [Friberg et al., 2006]. Cette région contient un cluster de gènes impliqués dans les mécanismes inflammatoires et immunitaires (comme les cytokines de TH2) et est liée à plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires telles que la maladie de Crohn, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, la dermatite atopique [Rioux et al., 2001, Peltekova et al., 2004, Kauppi et al., 2001, Tokuhira et al., 2003, Lee et al., 2002]. Une étude de ce locus a été réalisée en prenant en compte le déséquilibre de liaison de la région évalué à partir de 115 SNPs génotypés chez 658 témoins japonais et a permis, à partir de 830 malades, d'identifier deux SNPs du gène *SLC22A4*, slc2F1 (rs2073838) et slc2F2 (rs3792876), présents dans l'intron 2 et 1 respectivement, ainsi qu'un haplotype (rs3763112, rs1007602, rs2073838, rs2269822), significativement associés avec la polyarthrite rhumatoïde ($P=0.005$) [Tokuhira et al., 2003]. *SLC22A4* (*solute carrier family 22 member 4* ou *OCTN1*) code pour un transporteur transmembranaire de cations organiques et est exprimé principalement dans les tissus hématopoïétiques et immunologiques (sang, moelle osseuse, les monocytes CD14+, les macrophages CD68+, les cellules T CD43+) [Tokuhira

et al., 2003, Peltekova et al., 2004]. Son expression peut être stimulée par des stimuli pro-inflammatoires ($\text{TNF}\alpha$) et est élevée dans les articulations enflammées de modèles murins d'arthrite ainsi que chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [Tokuhiko et al., 2003]. Un des variants associés (rs3792876) est particulièrement intéressant car il est situé dans un site de fixation pour le facteur de transcription du système hématopoïétique RUNX1 et l'allèle de susceptibilité (T) augmente, *in vitro*, l'affinité de ce facteur pour son site de fixation, ce dernier ayant un effet suppresseur sur la transcription de *SLC22A4* [Tokuhiko et al., 2003]. Le rôle exact de cette protéine dans la physiopathologie de la maladie reste encore inconnu. Afin de confirmer ces résultats, d'autres études sur des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde provenant d'autres populations (anglaise ou caucasienne) ont été réalisées mais aucune n'a abouti à confirmer l'existence d'une association [Barton et al., 2005, Newman et al., 2005b].

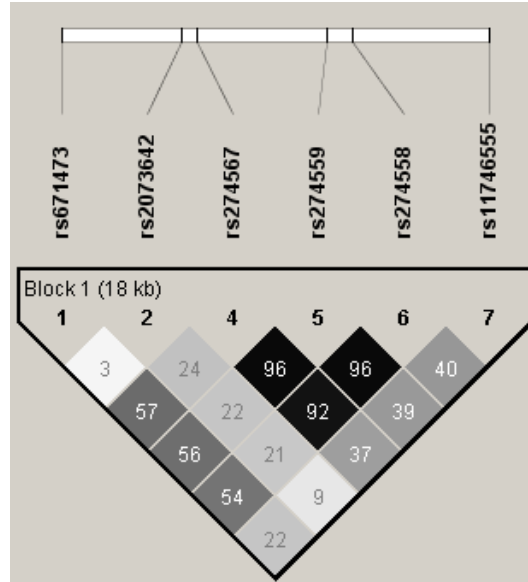
Toutefois, ce gène, en combinaison avec un gène voisin *SLC22A5* codant aussi un transporteur de cations organiques (*organic cation/carnitine transporter, member 5 ou OCTN2*), a été montré impliqué dans une autre maladie auto-immune, la maladie de Crohn dont l'un des locus de prédisposition à cette maladie est situé sur cette région chromosomique (IBD5) [Peltekova et al., 2004, Newman et al., 2005a]. Après l'étude par séquençage du segment génétique IBD5 chez des sujets canadiens (203 cas/200 témoins), un haplotype (TC) de deux autres variants rs1050152 (L503F) et rs2631367, localisés dans l'exon 9 et dans le promoteur de deux gènes voisins *SLC22A4* et *SLC22A5*, est montré associé à la maladie de Crohn ($P=0.0003$). Des études supplémentaires indiquent que ces deux SNPs affectent la transcription et les fonctions "transporteurs" des gènes [Peltekova et al., 2004]. De plus, il existe une interaction entre deux loci conférant une susceptibilité à la maladie de Crohn (*IBD1* (16q)/*IBD5* (5q)), le risque de développer la maladie étant augmenté chez les porteurs de l'haplotype TC avec au moins l'un des trois variants de *CARD15* associé au Crohn (CD) [Peltekova et al., 2004, Newman et al., 2005a].

Quelques équipes ont testé l'association des gènes *SLC22A4* et *SLC22A5* avec le psoriasis. Aucune association avec le psoriasis n'a été observée jusqu'à présent, mais la plupart des études teste seulement trois variants fonctionnelles (rs3792876, rs1050152 et rs2631367). Par exemple, aucun résultat significatif n'a été obtenu lors de l'étude de 264 familles suédoises, malgré l'existence dans ces familles d'une forte liaison avec le chromosome 5q31 [Friberg et al., 2006]. Le constat est le même lors d'une étude anglaise cas-témoins de psoriasis (218 PsV *versus* 594 sains) de l'haplotype TC [Ho et al., 2005]. Dans cette étude, les gènes ont aussi été testés pour l'arthrite psoriasique avec 472 patients PsA et contrairement au cas du psoriasis, une association entre la maladie et deux variants (rs3763112 et rs2631367)

dans les gènes *SLC22A4* et *SLC22A5* respectivement, est observée ($P=0.028$, $P=0.005$), de même qu'avec l'haplotype TC (rs1050152, rs2631367) ($P=0.001$), indépendamment de *CARD15* [Ho et al., 2005]. Cependant, cette association n'a pas été confirmée dans une autre étude indépendante sur 59 patients PsA de l'île de Terre-Neuve (*versus* 238 témoins) lors de l'analyse de trois variants de *SLC22A4* (rs3792876, rs3763112, rs1050152) et d'un SNP de *SCL22A5* (rs2631367) [Butt et al., 2005].

Nous avons choisi de tester si ces variants des gènes *SLC22A4* et *SLC22A5* pouvaient conférer une prédisposition au psoriasis dans la population française. Nous avons donc testé, pour le gène *SLC22A4*, 5 SNPs associés à la polyarthrite rhumatoïde (rs3792876, rs3763112, rs1007602, rs2073838, rs2269822) ainsi que le SNP présent dans l'haplotype associé à CD (rs1050152) [Tokuhiko et al., 2003, Peltekova et al., 2004]. Pour tester le gène *SLC22A5*, une approche "TagSNPs" a été entreprise (Figure 3.8). En supplément des 3 'TagSNPs' identifiés, le deuxième variant de l'haplotype associé à CD a été aussi testé (rs2631367) [Peltekova et al., 2004]. Les informations sur les différents SNPs ainsi que les résultats obtenus lors de leur analyse par FBAT, dans nos familles françaises, sont présentés dans le tableau 3.26. Cette analyse a révélé une faible association entre le psoriasis et un SNP présent dans l'intron 3 du gène *SLC22A5*, rs274559 ($P=0.04$). De plus, aucune association n'a été observée lors de l'analyse haplotypique des deux gènes (Tableau 3.27) ainsi que lors de l'étude de l'haplotype TC (rs1050152, rs2631367) associé à CD (données non montrées). Aucune association n'est retrouvée lors de l'analyse du SNP par la méthode "LNMs", qui tient compte de la structure familiale de notre lot I dans sa globalité, ainsi que lors de son étude dans le deuxième lot ou dans les deux lots (Tableau 3.28 et 3.29). Toutefois, la dernière analyse a révélé une faible association du SNP associé dans le premier test et d'un nouveau SNP du gène *SLC22A5* (rs671473) avec la maladie ($P=0.03$ et $P=0.04$ respectivement) seulement lorsque les malades non porteurs de l'allèle HLA-*Cw6* du Lot I sont étudiés (Table 3.30). Ces résultats sont néanmoins très peu robustes pour impliquer le gène *SLC22A5* dans la pathogenèse du psoriasis, mais il semblerait que les deux loci sur les chromosomes 6 et 5 interviendraient de manière indépendante. L'absence d'association du psoriasis avec les SNPs associés à la polyarthrite rhumatoïde et avec les deux SNPs associés à la maladie de Crohn est conforme à deux autres études réalisées sur d'autres populations [Ho et al., 2005, Friberg et al., 2006]. Cependant, il n'y a pas eu d'étude globale sur l'implication de ces gènes dans le psoriasis puisque ces études se sont seulement focalisées sur les trois variants fonctionnelles, montrés associés à d'autres maladies complexes.

Lors de notre étude, seul le gène *SLC22A5* est testé par une approche "Tag-SNPs", et montre seulement une faible association suggestive avec le psoriasis

FIG. 3.8: Structure DL du gène *SLC22A5*TAB. 3.26: Identification et test d'association des TagSNPs de *SLC22A4* et *SCL22A5* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
<i>SLC22A4</i> (5q31)	rs3763112 ¹			34001493	G>A	37.1 ¹	A	38.9	96	0.083	0.93
	rs1007602 ¹			34017179	G>A	26.7 ¹	A	33.7	89	0.678	0.50
	rs3792876 ¹	Intron 1		34052322	C>T	11.4 ¹	A	5.6	22	0.456	0.65
	rs2073838 ¹	Intron 2		34064235	G>A	10.8 ¹	A	5.6	22	0.456	0.65
	rs1050152 ²	Exon 9	L503F	34091333	C>T	45.8 ¹	A	46.2	106	-0.478	0.63
	rs2269822 ¹			34173725	C>T	15.8 ¹	A	13.5	48	-0.680	0.50
<i>SLC22A5</i> (5q31)	rs2631367 ²	5' UTR		34120471	C/G	NC	A	46.8	109	1.043	0.30
	rs671473	Intron 1		34123548	G>T	23.3 ¹	H	29.3	87	1.573	0.12
	rs274559	Intron 3		34135083	T>C	35.3 ¹	H	36	95	2.034	0.04
	rs11746555	Intron 7		34142046	G>A	42.5 ¹	H	44	101	-0.764	0.45

^{a1} associé avec RA (Tokuhiro et al., 2003), ² associé avec la maladie de Crohn (Peltekova et al., 2004), ^b NM_003059 pour *SLC22A4*, NM_003060 pour *SLC22A5*, ^c NT_034772.5 pour *SLC22A4* et *SLC22A5*

TAB. 3.27: Analyse d'association des haplotypes de *SLC22A4* et de *SLC22A5* sur le Lot I par FBAT

Gènes	Haplotype		Lot I	
			MAF	P
<i>SLC22A4</i>	H1	GGCGTC	42.7	0.59
	H2	AACGCC	32	0.25
	H3	AGCGCC	6.3	0.57
	H4	GGCGCC	5.9	0.63
	H5	GGTACT	5.0	0.35
<i>SLC22A5</i>	H1	GGTA	41.6	0.35
	H2	CTCG	30.5	0.06
	H3	CGTG	12	0.22
	H4	GGTG	8.6	0.74
	H5	CGCG	6.6	0.38

TAB. 3.28: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC22A5* dans le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I				
			P	ORaa	[95% CI]	ORaa	[95% CI]
rs274559	T>C	36	0.45	0.93	[0.76-1.13]	0.86	[0.70-1.05]

TAB. 3.29: Analyse d'association du seul TagSNP de *SLC22A5*, suggestif dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs274559	36	95	2.03	0.042	36.3	56	-0.003	0.99	36.2	151	1.628	0.10

TAB. 3.30: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC22A4* et de *SLC22A5* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

Gène (Chr.)	SNP ID	Allèles	Lot I								
			Non stratifié		Stratifié selon :						
					présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>			
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P				
<i>SLC22A4</i> (5q31)	rs3763112	G>A	38.9	0.93	66	-0.346	0.73	39	0.603	0.55	
	rs1007602	G>A	33.7	0.50	59	-0.082	0.94	37	1.260	0.21	
	rs3792876	C>T	5.6	0.65	14	0.600	0.55	15	-0.039	0.97	
	rs2073838	G>A	5.6	0.65	14	0.600	0.55	15	-0.039	0.97	
	rs1050152	C>T	46.2	0.63	70	-0.240	0.81	52	-0.432	0.67	
	rs2269822	C>T	13.5	0.50	27	0.103	0.92	31	-1.063	0.29	
<i>SLC22A5</i> (5q31)	rs2631367	C/G	46.8	0.30	73	0.225	0.82	52	1.351	0.18	
	rs671473	G>T	29.3	0.12	54	0.392	0.70	43	2.038	0.04	
	rs274559	T>C	36	0.04	63	0.792	0.43	45	2.207	0.03	
	rs11746555	G>A	44	0.45	69	-0.922	0.36	48	-0.052	0.96	

dans notre premier lot, non confirmée lors des deux étapes de réplication. Ces gènes ne semblent donc pas intervenir dans la prédisposition au psoriasis mais une étude complète serait nécessaire pour les exclure complètement.

Les gènes codant des cytokines pro-inflammatoires et leurs récepteurs : les gènes *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-1RN* (InterLeukin 1), *IL-1R1* (InterLeukin 1 Receptor type 1) et *IL12RB1* (InterLeukin 12 Receptor Beta 1)

Les gènes *IL-1A*, *IL-1B*, *IL-1RN* et *IL-1R1*

La cytokine pléiotrope, l'interleukine-1 (IL-1), est un médiateur important de l'inflammation et de l'immunité, particulièrement dans la peau [Camp et al., 1990, Mee et al., 2006]. Deux formes d'agoniste d'IL-1 (IL-1a et IL-1b) ont été identifiées ainsi qu'un antagoniste spécifique du récepteur IL-1 (IL-1ra/IL-1rn) et deux récepteurs de surface cellulaire identiques pour les deux formes d'agonistes d'IL-1, IL-1RI et IL-1RII, dont IL-1RII fonctionnant comme une molécule-leurre [Ravindran et al., 2004]. Les protéines d'IL-1 sont synthétisées par une large variété de types cellulaires comprenant les monocytes, les macrophages activés, les kératinocytes, les lymphocytes B stimulés, et les fibroblastes [Lord et al., 1991]. Leur sécrétion est stimulée entre autres par des produits bactériens, des toxines, des agressions physiques, et d'autres cytokines. L'IL-1 induit les effets systémiques de phase aiguë de l'inflammation tels que la fièvre. IL-1 augmente l'intensité de la réponse immune en stimulant entre autres la production de protéines nécessaires au cours de l'inflammation (prostaglandines, monoxyde d'azote etc.), et en particulier la synthèse des chémokines (IL-1, IL-8, IL-6 ou GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)). Elle stimule l'adhérence des leucocytes à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (en particulier E-sélectine et ICAM-1) [Mee et al., 2006]. Elle favorise aussi la prolifération des fibroblastes, la synthèse de collagène et celle d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire (collagénase). IL-1a et b se fixent sur les deux parties du récepteur de type I, IL-1RI, et entraînent une activation du domaine cytoplasmique TIR (*analogue au récepteur Toll*). Lors de l'activation, le récepteur de type I s'associe à une protéine accessoire (AcP) pour former un "hétérodimère" qui représente le récepteur complet. Le récepteur complet (récepteur de type I + AcP) recrute une kinase associée au récepteur de l'IL-1 (IRAK). La transduction du signal au noyau fait appel à une succession d'activation de kinases, en particulier celles impliquées dans les voies de signalisation NF- κ B et p38/MAPK, pour permettre la transcription de gènes cibles. IL-1ra ne se fixe que sur la partie IL-1RI et empêche l'activation du signal intracellulaire, provoquant ainsi le blocage des effets de l'IL-1. La fixation sur le récepteur de type II, IL-1RII, n'entraîne aucun signal intracellulaire. L'IL-1RI est retrouvé sur

de très nombreuses cellules tandis qu'IL-1RII est exprimé principalement sur les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes B. Il existe aussi une forme soluble du récepteur de l'IL-1 de type II (sIL-1RII) qui fixe l'IL-1b avec une forte affinité, l'empêchant d'agir sur les cellules [Mee et al., 2006, Pietrzak et al., 2008].

Des études ont montré que ces gènes du groupe d'IL-1 avaient un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires. Les gènes *IL1A* et *IL1B* interviendraient dans la polyarthrite rhumatoïde [Cox et al., 1999, Kaijzel et al., 2002], la périodontite (inflammation des gencives) [Kornman et al., 1997, Diehl et al., 1999], l'ostéomyélite (inflammation de la moelle osseuse et du tissu osseux adjacent) [Asensi et al., 2003], la sclérose en plaques [Schrijver et al., 1999]. Le gène *IL1RN* aurait un rôle dans la polyarthrite rhumatoïde [Kaijzel et al., 2002], dans la sclérose en plaques [Schrijver et al., 1999] et dans le lupus érythémateux systémique [Blakemore et al., 1994]. L'ensemble de ces gènes, regroupés sur le chromosome 2q, pourrait donc avoir un rôle dans une autre maladie inflammatoire, le psoriasis.

De manière générale, le psoriasis est caractérisé par la dérégulation de cytokines, et en particulier la surexpression de cytokines pro-inflammatoires stimulant le recrutement des cellules du système immunitaire et la prolifération des kératinocytes (TNF α , IL-1, IL-8, IL-20 etc..). En vue de leur action sur différents types cellulaires impliqués dans cette maladie et de leur synthèse, en particulier dans les kératinocytes, les facteurs d'IL-1 ont été spécialement étudiés. Contrairement aux attentes, lors des études *in vivo* sur les lésions d'individus atteints de psoriasis, l'activité fonctionnelle d'IL-1 est sensiblement réduite, comparée aux niveaux observés dans l'épiderme d'un individu sain et ceux dans la peau non-lésée d'un patient [Mee et al., 2006]. Ceci serait la conséquence d'une diminution d'IL-1a, combinée avec une augmentation d'IL-1b et d'inhibiteurs d'IL-1. Comparée aux biopsies de tissus sains, une augmentation nette du rapport d'IL-1ra sur IL-1a, ainsi qu'une induction d'IL-1RII, est constatée dans les lésions [Reich et al., 2002, Mee et al., 2006]. Une étude transcriptionnelle de l'expression des gènes qui compare des biopsies de peau lésée et non-lésée obtenues chez les mêmes patients atteints de psoriasis, montre des données comparables [Mee et al., 2006]. Une diminution des niveaux d'ARNm de l'IL-1a ainsi qu'une augmentation nette de l'ARNm d'IL-1b sont observées dans les biopsies de la peau lésée. Aucune variation d'ARNm entre les deux types de biopsies n'a été observée pour l'antagoniste du récepteur IL-1 (IL-1ra), ni d'ailleurs pour les deux transcripts du récepteur IL-1. La présence de niveaux élevés de protéines IL-1RII, malgré le manque d'induction d'ARNm IL-1RII dans l'épiderme lésé, peut résulter de mécanismes post-transcriptionnels [Mee et al., 2006]. Cette étude montre une augmentation de l'activité générale d'IL-1, déduite par l'augmentation observée dans l'épiderme lésé de l'expression d'une cytokine secondaire, connue pour être induite par IL-

1, l'IL-8. Des expériences de génomique fonctionnelle, comparant des profils de transcriptome dérivés de la peau lésée de psoriasis et des kératinocytes stimulés par IL-1a, ont démontré un niveau élevé de similitudes entre les deux profils dont ceux des gènes codant pour le complexe de différenciation épidermique et pour des molécules antimicrobiennes qui sont hautement surexprimés [Mee et al., 2006]. Des études, sur des souris transgéniques sur-exprimant constitutivement les molécules de la famille IL-1 dans l'épiderme basal, montrent que la surexpression d'IL-1a est suffisante pour enclencher l'inflammation cutanée spontanément avec des similitudes histologiques des lésions de psoriasis [Groves et al., 1995]. De plus, le phénotype est aggravé chez les souris transgéniques sur-exprimant IL-1a et IL-1RI [Groves et al., 1996]. La surexpression d'IL-1RII dans le même système a comme conséquence la sous-régulation spécifique de l'inflammation cutanée médiée par l'IL-1 [Rauschmayr et al., 1997]. Une inflammation cutanée psoriasiforme ainsi qu'une arthrite inflammatoire par l'intermédiaire du facteur $TNF\alpha$ sont observées chez les souris où le gène *IL-1ra* est détruit [Horai et al., 2004, Shepherd et al., 2004].

Bien que la plupart des observations de la peau lésée suggèrent une sous-régulation de l'activité d'IL-1 contrairement aux observations faites chez les modèles murins, il est important de noter que cette réponse à IL-1 varie en fonction des concentrations de ligands extracellulaires biologiquement actifs (IL-1a et IL-1b), d'IL-1ra et des niveaux d'expression des deux types de récepteur IL-1 (IL-1RI et IL-1RII). Ainsi, l'équilibre entre les agonistes (IL-1a/b et IL-1RI) et les antagonistes (IL-1ra et IL-1RII) du système IL-1 peut jouer un rôle principal dans le processus d'inflammation cutanée [Mee et al., 2006].

Des études d'association ont confirmé le rôle des protéines du système IL-1 dans la maladie. Une première étude anglaise montre une association entre un polymorphisme d'*IL-1ra* et le psoriasis à début précoce [Tarlow et al., 1997]. Lors d'une étude allemande cas-témoins (231 *versus* 345) sur l'implication de polymorphismes d'*IL-1b* (C-511T, T+3953C) et d'*IL-1ra* (intron 2) dans le psoriasis, le polymorphisme C-511T d'*IL-1b* est montré associé à une production élevée d'IL-1ra en réponse à des lipopolysaccharides et de l'IL-10 et au psoriasis à début tardif (P=0.04) [Reich et al., 2002]. Néanmoins, une étude japonaise cas-témoins (170 *versus* 210) ne révèle aucune association entre le psoriasis et *IL-1a*, *IL-1b* et *IL1-ra* [Chang et al., 2007]. De plus, d'autres équipes ont testé ces gènes pour l'arthrite psoriasique (PsA). Dans une étude d'association cas-témoins (140 *versus* 100 caucasiens) sur les polymorphismes d'*IL-1b* (T+3953C), d'*IL-1a* (C-889T) et *IL-1RI* (C+970T), seule une association entre le PsA et le polymorphisme d'*IL-1a* a été observée (P=0.02) [Ravindran et al., 2004]. D'autres études ont confirmé ces résultats. L'absence d'association entre PsA et IL-1b ou d'*IL-1ra* est aussi obser-

vée dans une étude irlandaise cas-témoins (147 *versus* 389) [Balding et al., 2003]. Une étude supplémentaire canadienne (220 *versus* 150) confirme l'association du gène *IL-1a* dans le PsA [Rahman et al., 2006]. Néanmoins, ce gène ne semble pas intervenir dans la population japonaise (170 *versus* 210) et dans la population de l'île de Terre Neuve (226 *versus* 95) puisqu'aucune association n'a été identifiée entre le PsA et *IL-1a*, *IL-1b* et *IL1-ra* [Peddle et al., 2005, Chang et al., 2007].

L'ensemble de ces données suggère que toutes les molécules du système IL-1 sont susceptibles d'être des médiateurs importants dans le déclenchement et l'entretien des plaques de psoriasis et peuvent représenter des gènes candidats. Nous avons donc réalisé une étude d'association globale de ces gènes (*IL-1A*, *IL-1B*, *IL-RA* et *IL1RN*) dans notre population française. Avec la même méthode que lors des études sur les gènes précédents, nous avons sélectionné 35 SNPs, choisis en fonction du déséquilibre de liaison existant entre les SNPs validés dans les bases de données (HapMap/NCBI) présents à l'intérieur des gènes (Figures 3.9, 3.10 et 3.11). L'ensemble des renseignements sur les SNPs sélectionnés ainsi que les résultats obtenus lors de leurs analyses dans le lot I par le programme FBAT individuellement ou conjointement sont décrits dans les tableaux 3.31 et 3.32. L'analyse des TagSNPs lors de la stratification des patients du lot I selon la présence ou non de l'haplotype à risque révèle seulement une association faible entre le variant d'*IL-1B* (rs3917354) et le psoriasis (P=0.03) lors de l'analyse des individus non porteurs d'HLA-*Cw6* (Table 3.33). Il ne semble donc pas exister une interaction entre ces deux gènes dans la pathogenèse du psoriasis. L'ensemble de ces analyses nous indique qu'aucun des gènes ne contribue significativement à la pathogenèse du psoriasis, confirmant les études précédemment détaillées [Reich et al., 2002, Chang et al., 2007]. Néanmoins, l'étude allemande observe une association entre le gène *IL-1B* et le psoriasis à début tardif [Reich et al., 2002]. Et dans notre étude, une association faible a été obtenue lorsque les individus non porteurs du HLA-*Cw6* seulement du lot I sont analysés. De nombreuses études ont mis en évidence que contrairement aux patients du type I (début précoce), les patients de type II (début tardif) étaient peu porteurs de l'haplotype à risque, le HLA-*Cw6*. Or, la grande majorité de nos patients du premier lot sont de type I et porteur du HLA-*Cw6*, ce qui peut être expliquer la faible association observée. Cette hypothèse reste néanmoins à être confirmée.

Le gène *IL12RB1*

Un déséquilibre des réponses Th1/Th2 au profit des cytokines pro-inflammatoires de type 1 (IL-2, IFN γ , TNF α et IL-17) est observé dans le psoriasis. Une cytokine clé pour le développement des réponses Th1 est l'interleukine-12 (IL-12). IL-12, produit par les monocytes et les cellules présentatrices d'antigène, joue en effet

FIG. 3.9: Structure DL du gène *IL1R1*

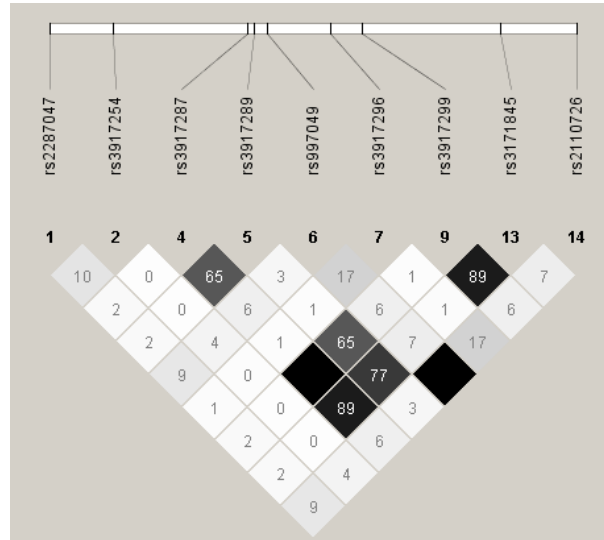


FIG. 3.10: Structure DL du gène *IL1A*

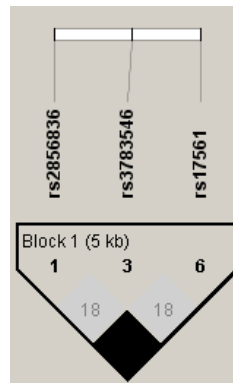
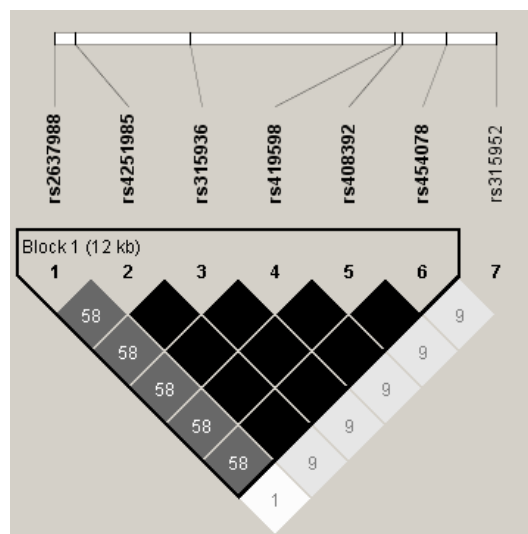


FIG. 3.11: Structure DL du gène *IL1RN*



TAB. 3.31: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B* et *IL1RN* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
<i>IL1R1</i> (2q12)	rs2192752			4838958	A>C	25 ¹	D	22.9	83	-0.843	0.40
	rs3917335	Intron 1		4840878	C>T	5.9 ¹	D	4.3	17	0.043	0.97
	rs871657	Intron 1		4840926	C>T	14.2 ¹	D	19.7	80	1.233	0.22
	rs3917238	Intron 1		4842668	C>T	38.1 ²	D				
	rs3917254	Intron 2		4846103	G>A	5.8 ¹	H	9.6	35	0.234	0.82
	rs3917273	Intron 2		4849304	A>T	37.3 ¹	D				
	rs3917289	Intron 4		4851496	G>T	8.3 ¹	H	6.9	41	-0.769	0.44
	rs997049	Intron 4		4852018	A>T	43.3 ¹	H				
	rs3917296	Intron 5		4854418	A>G	11.7 ¹	H	11.5	37	-0.346	0.73
rs3917299	Intron 6		4855671	A>G	7.5 ¹	H	5.9	36	-0.330	0.74	
<i>IL1A</i> (2q14)	rs4848300			2235829	T>C	30.8 ¹	D	20.7	91	0.319	0.75
	rs3783550	Intron 6		2240808	A>C	29.2 ¹	D	30.1	99	-0.017	0.99
	rs3783548	Intron 6		2241256	T>C	7 ²	D				
	rs3783546	Intron 6		2242753	G>C	29.2 ¹	H	30.1	99	-0.017	0.99
	rs3783539	Intron 4		2245502	G>A	23.7 ²	D	30.1	99	0.005	0.99
	rs2856838	Intron 3		2247895	C>T	40 ¹	D	49.3	101	-0.124	0.90
	rs1800587 ¹	5' UTR		2250883	C>T	30.8 ¹	A	21.7	86	0.404	0.69
<i>IL1B</i> (2q14)	rs1143643	Intron 6		2296225	G>A	39.2 ¹	H	36.8	99	0.687	0.49
	rs1143634	Exon 5	F105F	2298313	C>T	22.3 ¹	D	18.9	76	-0.668	0.50
	rs1143633	Intron 4		2298390	G>A	39.7 ¹	D	36	100	0.423	0.67
	rs3136558	Intron 3		2299198	T>C	30.4 ²	D	18.1	72	-1.143	0.25
	rs3136557	Intron 3		2299265	C>T	21.7 ²	D				
	rs3917356	Intron 3		2300286	G>A	45 ²	D				
	rs3917354	Intron 3		2300818	T>-	23.9 ²	D	15.5	65	-1.068	0.29
	rs1143629	Intron 2		2301441	T>C	16.7 ²	D	35.1	98	-0.421	0.67
<i>IL1RN</i> (2q14)	rs2592346	Intron 1		2584946	T>C	25 ²	D	41.1	101	0.517	0.60
	rs928940	Intron 1		2585418	T>G	11.7 ¹	D	13.6	56	0.536	0.59
	rs878972	Intron 1		2585636	A>C	17.4 ²	D	26.6	89	0.167	0.87
	rs315934	Intron 1		2591629	A>G	28.3 ²	D	19.7	61	-0.973	0.33
	rs3087262	Intron 1		2592125	G>C	8.7 ²	D	14.3	56	0.220	0.83
	rs1794067	Intron 2		2594307	G>A	27.1 ¹	D	27.2	92	0.108	0.92
	rs2232354	Intron 3		2595258	T>G	28.6 ²	D				
	rs579543	Intron 4		2597554	C>T	27.1 ¹	D	28.3	92	0.415	0.68
	rs315952	Exon 5	S112S	2598227	T>C	25.8 ¹	H	27.8	80	-0.340	0.73
	rs4252041	3' UTR		2598533	C>T	6.8 ¹	D	2.4	17	-0.983	0.33

^{a1} associé à la spondylarthrite ankylosante (Wu and Gu, 2007), ^b NM_000877 pour *IL1R1*, NM_000575 pour *IL1A*, NM_000576 pour *IL1B*, NM_000577 pour *IL1RN*, ^c NT_022171.14 pour *IL1R1*, NT_022135.15 pour *IL1A*, *IL1B* et *IL1RN*

TAB. 3.32: Analyse d'association des haplotypes de *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B* et *IL1RN* sur le Lot I par FBAT

Gènes	Haplotype		Lot I	
			MAF	P
<i>IL1R1</i>	H1	ACCGGAA	34.4	0.89
	H2	ACTGGAA	19.9	0.31
	H3	CCCGGAA	19.5	0.41
	H4	ACCGGGA	6.9	0.63
	H5	ACCAGAA	6.2	0.87
	H6	ACCGTAG	5.9	0.88
<i>IL1A</i>	H1	TAGGTC	43	0.82
	H2	TCCACC	33.1	0.62
	H3	CAGGCT	23.7	0.46
<i>IL1B</i>	H1	ACATTT	30.7	0.23
	H2	GCGTTC	30	0.30
	H3	GTGC-T	15	0.29
	H4	GCGTTT	12.5	0.38
<i>IL1RN</i>	H1	TTAAGGCTC	37.1	0.53
	H2	CTCAGATTC	25.3	0.84
	H3	CGAACGCCC	11.9	0.37
	H4	TTAGGGCCC	10.6	0.39
	H5	TTAGGGCTC	5.1	0.59

TAB. 3.33: Analyse d'association des TagSNPs dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

Gène (Chr.)	SNP ID	Allèles	Lot I								
			Non stratifié		Stratifié selon :						
					présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>			
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P				
<i>IL1R1</i> (2q12)	rs2192752	A>C	22.9	0.40	53	0.669	0.50	43	-2.009	0.05	
	rs3917335	C>T	4.3	0.97	9	***	***	11	0.205	0.84	
	rs871657	C>T	19.7	0.22	50	0.694	0.49	45	1.045	0.30	
	rs3917254	G>A	9.6	0.82	22	0.577	0.56	19	-0.310	0.76	
	rs3917289	G>T	6.9	0.44	28	-0.413	0.68	20	-0.640	0.52	
	rs3917296	A>G	11.5	0.73	23	-1.424	0.15	21	1.059	0.29	
	rs3917299	A>G	5.9	0.74	27	-0.152	0.88	16	-0.310	0.76	
<i>IL1A</i> (2q14)	rs4848300	T>C	20.7	0.75	57	0.510	0.61	49	-0.134	0.89	
	rs3783550	A>C	30.1	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.125	0.26	
	rs3783546	G>C	30.1	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.125	0.26	
	rs3783539	G>A	30.1	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.159	0.25	
	rs2856838	C>T	49.3	0.90	63	0.386	0.70	51	-0.599	0.55	
	rs1800587	C>T	21.7	0.69	54	1.047	0.30	46	-0.629	0.53	
<i>IL1B</i> (2q14)	rs1143643	G>A	36.8	0.49	59	0.370	0.71	53	0.584	0.56	
	rs1143634	C>T	18.9	0.50	46	0.534	0.59	43	-1.454	0.15	
	rs1143633	G>A	36	0.67	60	0.353	0.72	54	0.224	0.82	
	rs3136558	T>C	18.1	0.25	41	-0.079	0.94	44	-1.436	0.15	
	rs3917354	T>-	15.5	0.29	35	0.714	0.48	41	-2.188	0.03	
	rs1143629	T>C	35.1	0.67	58	-1.476	0.14	51	1.079	0.28	
<i>IL1RN</i> (2q14)	rs2592346	T>C	41.1	0.60	62	0.690	0.49	52	-0.005	0.99	
	rs928940	T>G	13.6	0.59	32	0.457	0.65	30	0.284	0.78	
	rs878972	A>C	26.6	0.87	59	-0.141	0.89	44	0.417	0.68	
	rs315934	A>G	19.7	0.33	40	-1.932	0.05	30	0.814	0.42	
	rs3087262	G>C	14.3	0.83	33	0.660	0.51	29	-0.390	0.70	
	rs1794067	G>A	27.2	0.92	61	-0.242	0.81	45	0.449	0.65	
	rs579543	C>T	28.3	0.68	58	0.004	0.99	48	0.591	0.55	
	rs315952	T>C	27.8	0.73	49	-0.669	0.50	41	0.230	0.82	
	rs4252041	C>T	2.4	0.33	14	0.480	0.63	7	***	***	

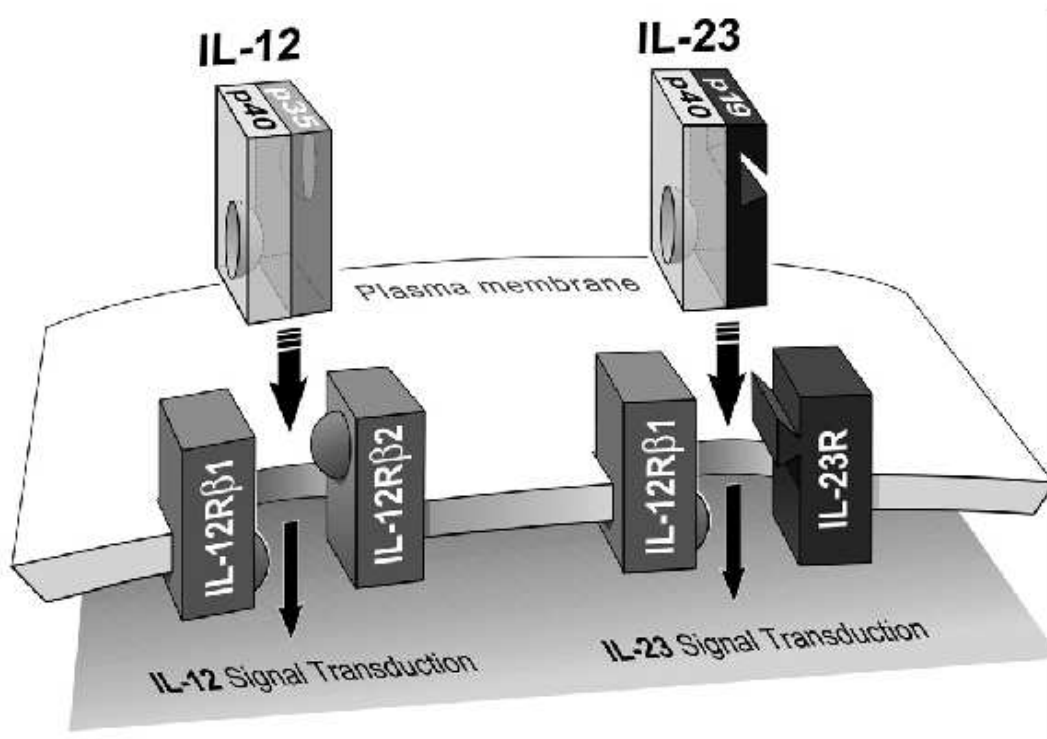
un rôle important dans la régulation de la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules Th1 et favorise l'immunité à médiation cellulaire ainsi que l'induction de la production d'IFN γ par les cellules T [Watford et al., 2003]. Ce dernier facilite l'infiltration et l'activation des cellules T dans l'épiderme par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur les leucocytes, les cellules endothéliales et les kératinocytes (ICAM-1 et HLA-DR).

IL-12 est une cytokine hétéro-dimérique composée de deux sous-unités (p35 et p40) (Figure 3.12). Cette cytokine transmet son signal en se liant à son récepteur (IL-12R), constitué de deux sous-unités IL-12R β 1 et IL-12R β 2, qui est exprimé sur les cellules T et NK activés [Presky et al., 1996]. Une étude montre que la haute affinité d'IL-12R au ligand IL-12 nécessite la co-expression de ces deux sous-unités, confirmée par une étude sur des souris déficientes en IL-12R [Wu et al., 1997, Wu et al., 2000]. Une autre cytokine, l'IL-23, partage une sous-unité avec l'IL-12, IL-12p40. Le récepteur d'IL-23 partage une sous-unité commune à IL-12R, IL-12 R β 1, sur laquelle la partie IL-12p40 se lie (Figure 3.12). La cytokine pro-inflammatoire IL-23, produite par les macrophages et les cellules dendritiques, active les cellules T, qui produisent l'IL-17, et induit la production de cytokines par les cellules endothéliales, les kératinocytes et les macrophages [Torti and Feldman, 2007].

De nombreuses études soutiennent une implication des deux cytokines, IL-12 et IL-23, dans la pathogenèse du psoriasis. Par exemple, une étude montre une expression élevée de l'IL-23p19 (la sous-unité spécifique d'IL-23) et de p40 (la sous-unité commune à IL-12 et IL-23) dans les lésions psoriasiques comparées à la peau non lésée de patients ou à la peau saine [Chen et al., 2006]. En revanche, aucune différence d'expression n'a été trouvée pour la sous-unité p35 (sous-unité spécifique d'IL-12) dans les différentes peaux étudiées, indiquant ainsi un rôle important de la sous-unité commune de l'IL-12 et IL-23, p40, dans la pathogenèse du psoriasis [Chen et al., 2006, Shaker et al., 2006]. L'expression diminuée de ces cytokines lors de différents traitements du psoriasis (UVA, cyclosporine, etanercept, alefacept) et le bon fonctionnement des nouvelles thérapies ciblant cette sous-unité p40 confirment le rôle important de ces molécules dans la genèse de la maladie [Torti and Feldman, 2007]. Une étude japonaise cas-témoins (143 cas *versus* 100 témoins) a identifié une association entre le psoriasis et un SNP (rs3212227) présent dans la région 3'UTR du gène *IL12B* codant la sous-unité p40 (commune aux deux interleukines) ($P=0.035$) [Tsunemi et al., 2002]. Quatre autres études réalisées sur d'autres populations (Angleterre (318 *vs* 288), USA (1446 *vs* 1432), Chine (170 *vs* 210) et caucasien (1810 *vs* 2522)) confirment d'ailleurs une association significative de ce gène avec le psoriasis ($(0.0001 < P < 0.04)$, ($P=7.85 \times 10^{-10}$), ($P=0.0067$) ($P=1.7 \times 10^{-15}$) respectivement) [Capon et al., 2007, Cargill et al., 2007, Chang et al., 2007, Nair et al., 2008]. Le variant en 3'UTR du gène a aussi

FIG. 3.12: Représentation schématique de la structure des cytokines IL-12 et IL-23 et de leurs récepteurs

Les deux cytokines se composent d'une même sous-unité, p40 qui se lie à une sous-unité commune aux deux récepteurs, IL-12R β 1. (D'après [Torti and Feldman, 2007])



été associé avec d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type I, la dermatite atopique et l'asthme [Morahan et al., 2001, Tsunemi et al., 2002, Randolph et al., 2004]. De plus, dans une étude japonaise cas-témoins (382 AD *versus* 658), deux polymorphismes (rs436857, rs393548) situés sur le chromosome 19p13, au niveau du promoteur du gène codant la sous-unité commune aux récepteurs de l'IL-12 et l'IL-23 (IL-12 R β 1) sont montrés associés avec l'AD (P=0.00044/0.00075) [Takahashi et al., 2005].

Toutes ces observations suggèrent l'implication de ces cytokines ainsi que de leurs récepteurs dans le psoriasis mais aussi dans différentes maladies inflammatoires. La particularité de la sous-unité IL-12 R β 1, d'être commune aux récepteurs de deux interleukines d'intérêts (l'IL-12 et l'IL-23) ainsi que la présence du gène codant cette sous-unité dans un des locus de prédisposition au psoriasis sur le chromosome 19p13 (*PSORS6*) suggèrent le gène *IL-12RB1* comme un gène candidat.

Nous avons analysé huit TagSNPs communs préalablement identifiés lors de l'étude de ce gène dans la prédisposition à la dermatite atopique dans une population japonaise [Takahashi et al., 2005]. Les résultats obtenus lors de l'analyse individuelle ou conjointe de ces variants par FBAT sur nos 45 familles sont présentés dans le tableau 3.34 et 3.35. Aucune association entre le psoriasis et le gène *IL-12 RB1* n'a été observée. La stratification des 45 familles selon l'haplotype à risque en *PSORS1* ne permet pas non plus de montrer une association entre le gène et le psoriasis (Tableau 3.36). Cependant, nous ne pouvons pas exclure qu'étudier seulement les TagSNPs représentatifs des haplotypes présents dans la population japonaise puissent fausser notre étude faite sur une population française. Mais, cela semble peu probable car excepté pour un variant (rs11086087), les fréquences alléliques de ces variants sont assez comparables dans les deux types de populations (Tableau 3.34). De plus, le manque d'association avec le gène codant une partie du récepteur d'IL-12 et d'IL-23 semble être en accord avec deux autres grandes études anglaises et américaines [Capon et al., 2007, Cargill et al., 2007]. En conclusion, le gène *IL-12 RB1* ne semble pas jouer un rôle dans la pathogenèse du psoriasis dans notre échantillon.

3.2.2 Protéines intervenant dans les mécanismes de la peau

Gènes «associés» au psoriasis dans notre étude

Le gène codant un transporteur de molécules : le gène *SLC12A8* (Solute Carrier family 12 Member 8)

Une étude réalisée sur 195 familles suédoises par Hewett et ses collaborateurs

TAB. 3.34: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *IL12RB1* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	MAF ^d	BD	FBAT Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>IL12RB1</i> (19p13)	rs404733 ¹	3'NG		9432799	T>A	49.1 ¹	44	A	51.3	104	1.059	0.29
	rs383483 ¹	Intron 15		9434688	G>A	49 ²	41.7	A	50.6	97	0.779	0.44
	rs17882636 ^{1*}	Intron 10		9443067	G>A	21.7 ²	21.6	A	18.7	75	-0.898	0.36
	rs375947 ¹	Exon 10	M365T	9443253	A>G	37.5 ¹	40	A	28.6	85	-1.554	0.12
	rs11086087 ¹	Exon 4	V129V	9454466	G>C	8.7 ²	20.9	A	9.9	46	-0.983	0.33
	rs2305743 ^{1*}	Intron 2		9455993	G>A	24.2 ¹	20.8	A	19.2	77	-1.390	0.16
	rs436857 ^{1*}	5' UTR		9460437	G>A	23.3 ¹	18.9	A	18.5	76	-0.936	0.35
	rs393548 ^{1*}	5'NG		9460546	T>A	24.1 ¹	21.4	A	19.2	78	-0.975	0.33

^{a1} selon l'étude sur l'AD (Takahashi et al., 2005), ^b NM_005535, ^c NT_011295.10, "*" indique les résultats des SNPs pris en fonction de la littérature malgré un problème dans l'équilibre d'Hardy-Weinberg ($0.02 < P < 0.03$), ^d selon l'étude sur l'AD (Takahashi et al., 2005)

TAB. 3.35: Analyse d'association des haplotypes de *IL12RB1* sur le Lot I par FBAT

Haplotype	Lot I	
	MAF	P
H1 AAGAGGGT	49.5	0.067
H2 TGGAGGGT	17.0	0.74
H3 TGAGGAAA	16.9	0.95
H4 TGGGCGGT	8.2	0.46

TAB. 3.36: Analyse d'association des TagSNPs de *IL12RB1* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
		MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
		N	Z	P	N	Z	P		
rs404733	T>A	51.3	0.29	63	1.329	0.18	56	0.056	0.96
rs383483	G>A	50.6	0.44	60	0.977	0.33	48	0.039	0.97
rs17882636	G>A	18.7	0.36	43	-1.062	0.29	42	-0.090	0.93
rs375947	A>G	28.6	0.12	50	-1.237	0.22	51	-0.879	0.38
rs11086087	G>C	9.9	0.33	30	-0.409	0.68	28	-0.905	0.37
rs2305743	G>A	19.2	0.16	45	-1.406	0.16	41	-0.419	0.68
rs436857	G>A	18.5	0.35	45	-0.788	0.43	40	-0.484	0.63
rs393548	T>A	19.2	0.33	44	-1.240	0.22	42	-0.007	0.99

(2002) a permis d'identifier le gène *SLC12A8* comme étant un nouveau gène de prédisposition au psoriasis par clonage positionnel sur le chromosome 3q21, correspondant au locus *PSORS5* [Enlund et al., 1999b, Samuelsson et al., 1999]. Le gène *SLC12A8* s'étend sur plus de 100 kb, et code une protéine transmembranaire, qui est homologue (30-40%) de la famille des co-transporteurs d'ions, plus précisément du cation/chlorure ($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$). Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire [Hewett et al., 2002]. De manière intéressante, il a été montré que les co-transporteurs d'ions $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ jouaient un rôle dans la transduction du signal mitogénique *via* les facteurs de croissance (TGF (*transforming growth factor*) et KGF (*Keratinocyte growth factor*) dans les fibroblastes de la peau humaine *via* l'influx de Na^+ [Panet and Atlan, 1991].

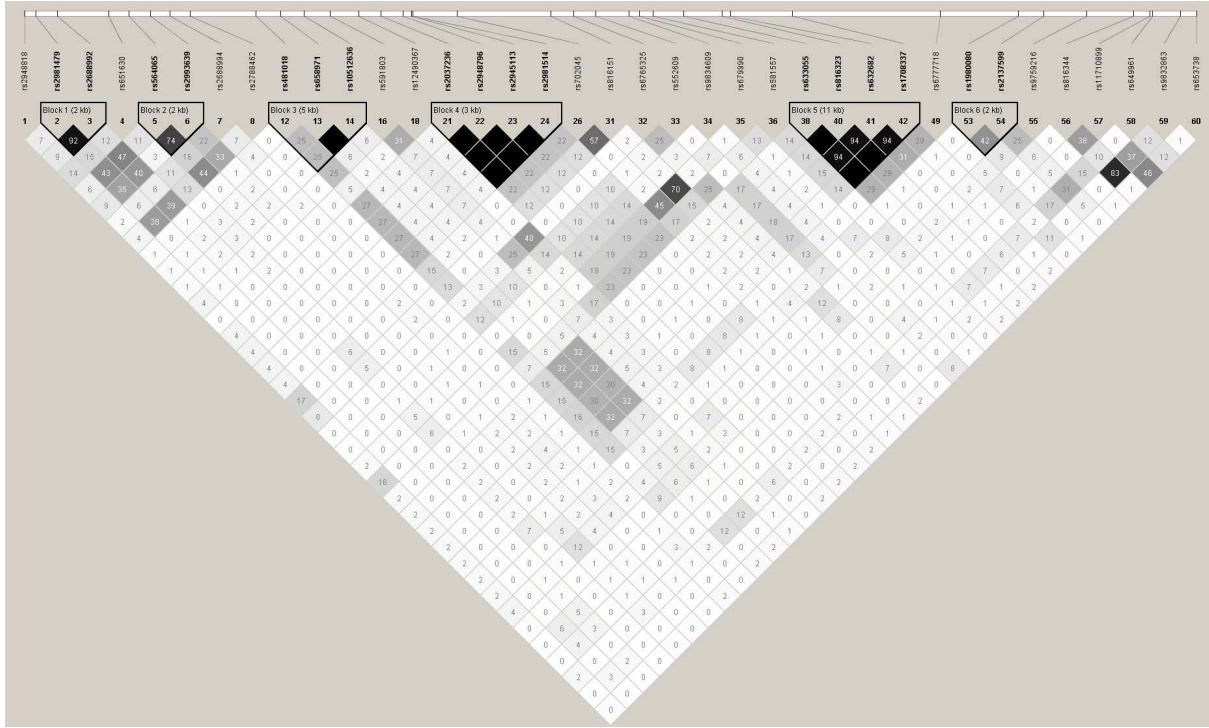
Puisqu'une hyper-prolifération des cellules de la peau, les kératinocytes, est caractéristique de la peau lésée chez les patients atteints de psoriasis, et que la protéine *SLC12A8* présente des homologies avec d'autres protéines impliquées dans la prolifération des fibroblastes de la peau (telles que *NKCC1*), il a été suggéré que ce gène pouvait également être impliqué dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes. Le gène *SLC12A8* apparaît comme étant un gène candidat pour la prédisposition au psoriasis. Une première étude (TDT) suédoise, réalisée sur 195 familles, a identifié 5 SNPs introniques associés au psoriasis individuellement et conjointement (*BES2* (rs531740, $P=0.028$), *B1551S4* (rs702045, $P=0.012$), *B1551S3* (rs1554241, $P=0.005$), *IAP8* (rs816154, $P=0.005$), *EC2* (rs2228674, $P=0.013$ et l'haplotype (*BES2-B1551S4-B1551S3-IAP8-EC2*, $P=3.8 \times 10^{-5}$)) [Hewett et al., 2002]. Une deuxième étude cas-témoins réalisée sur 375 patients allemands a confirmé, de manière indépendante, le rôle de ce gène dans le psoriasis. Cette étude montre une association entre le psoriasis et 6 SNPs des 35 TagSNPs, choisis en fonction de la structure DL du gène lui-même. Les 6 variants sont introniques et un seul est commun avec l'étude précédemment citée (ss35527513 (rs28986277, $P=0.0043$), ss35527511 (rs28986275, $P=0.0008$), rs9813946 ($P=0.011$), rs9831295 ($P=0.022$), rs1554241 (*B1551S3*, $P=0.049$), rs651630 ($P=0.009$)) [Huffmeier et al., 2005a]. En plus de rs1554241, un autre SNP (rs2228674 (*EC2*)) faisant partie des 5 SNPs initialement associés, est également montré associé avec le psoriasis, mais seulement lors d'une étude TDT de 210 trios supplémentaires, avec un P de 0.048 [Huffmeier et al., 2005a]. Une analyse supplémentaire a démontré que *SLC12A8* et le locus *PSORS1* agiraient, de manière indépendante, sur la pathogenèse du psoriasis. En effet, lors de la stratification des patients selon qu'ils soient porteurs ou non de l'allèle à risque du locus *PSORS1*, ces associations persistaient dans les deux sous-groupes [Huffmeier et al., 2005a].

Le gène *SLC12A8* est situé dans une région qui n'a pas été identifiée comme étant un locus de prédisposition au psoriasis lors de notre étude de liaison réa-

lisée sur notre collection de 45 grandes familles. Cependant, il nous a semblé intéressant de tester l'association par l'approche "TagSNPs entre *SLC12A8* et le psoriasis, décrite de façon indépendante par deux études. Puisque le gène s'étend sur plus de 100kb dans une région présentant un faible déséquilibre de liaison, nous avons sélectionné 9 TagSNPs d'après les données de la base HapMap (Figure 3.13) auxquels nous avons rajouté les 5 TagSNPs associés avec le psoriasis de l'étude allemande ($P < 0.04$) (rs28986277, rs28986275, rs9813946, rs9831295, rs651630) [Huffmeier et al., 2005a]. L'ensemble des informations sur les SNPs sélectionnés ainsi que les résultats obtenus par l'analyse FBAT sur les TagSNPs sont décrits dans le tableau 3.37. L'analyse du premier lot de familles par FBAT suggère une association entre le psoriasis et le SNP rs2137599 ($P = 0.03$) situé dans l'intron 2 ainsi qu'une association suggestive entre le psoriasis et le SNP rs1980080 ($P = 0.07$), également localisé dans l'intron 2, mais ce dernier résultat n'est pas statistiquement significatif. En revanche, notre étude ne confirme pas l'association observée entre les 5 TagSNPs de l'étude allemande et le psoriasis. Lors de l'analyse des haplotypes, détaillés dans le tableau 3.38, plusieurs haplotypes, en majorité à risque ($Z > 0$) sont montrés associés avec la maladie ($P < 0.05$). L'analyse des haplotypes dans ce cas nous apporte peu d'informations supplémentaires car les haplotypes associés sont souvent une combinaison avec un des SNPs introniques pour lesquels l'analyse initiale avait montré une tendance d'association avec le psoriasis avec un $P < 0.10$: rs564065, rs2993639, rs633055, rs1980080, rs2137599. L'analyse des deux SNPs, suggérant une association avec la maladie dans notre premier lot, par la deuxième méthode utilisant les modèles à effets mixtes semble confirmer l'association observée entre la maladie et le SNP intronique rs2137599 ($P = 0.049$) (Table 3.39). De plus, même si l'analyse dans le deuxième lot moins informatif ne montre pas une association significative, elle indique la même tendance que lors de l'analyse du premier lot, mais seulement pour le SNP rs2137599. Ceci est d'ailleurs confirmé par un excès plus significatif ($P = 0.01$) de la transmission de l'allèle mineur C de ce SNP chez les malades dans l'analyse combinée des deux lots plutôt que dans le lot I (Table 3.40). Nous avons ensuite analysé les TagSNPs en prenant en compte les individus porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans notre premier lot (Table 3.41). Ce test d'association a révélé que lorsque seuls les porteurs de l'allèle HLA-*Cw6* sont pris en compte, deux SNPs, rs564065 et rs2137599 sont faiblement associés au psoriasis avec un P de 0.04 et 0.03, respectivement. Ceci pourrait indiquer une interaction de ces deux loci dans la pathogenèse du psoriasis.

L'ensemble de ces résultats confirment les deux études indépendantes décrites précédemment qui révèlent l'association du psoriasis avec *SLC12A8* [Hewett et al., 2002, Huffmeier et al., 2005a]. En effet, dans notre étude, un SNP présent dans l'intron 2, rs2137599, est associé avec la maladie dans les différentes analyses

FIG. 3.13: Structure DL du gène *SLC12A8* (voir annexe page 250)



TAB. 3.37: Identification et analyse d'association des TagSNPs dans *SLC12A8* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	N°	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>SLC12A8</i> (3q21)	1	rs2688992	Intron 13		31300756	G>T	42.5 ¹	H	49.1	99	-1.325	0.18
	2	rs651630 ¹	Intron 10		31306460	C>T	44.2 ¹	A	47.4	97	-0.269	0.79
	3	rs564065	Intron 10		31308668	G>C	45.8 ¹	H	52.9	94	-1.697	0.09
	4	rs2993639	Intron 10		31311042	T>C	46.7 ¹	H	41.9	98	1.632	0.10
	5	rs481018	Intron 9		31322684	T>A	38.1 ¹	H	49.7	101	0.793	0.43
	6	rs658971	Intron 8		31325461	G>A	14.2 ¹	H	21.2	80	1.453	0.15
	7	rs2037236	Intron 6		31336496	C>G	20.8 ¹	H				
	8	rs9831295 ¹	Intron 6		31345269	A>G	25.9 ¹	A	21.3	64	-0.988	0.32
	9	rs9813946¹	Intron 6		31345391	G/T	NC	A				
	10	rs28986275 ¹	Intron 5		31350276	C>T	38 ²	A	16.8	66	-1.412	0.16
	11	rs633055	Intron 5		31369981	C>T	17.5 ¹	H	22.7	72	1.628	0.10
	12	rs28986277 ¹	Intron 3		31401634	A>T	20 ²	A	15.6	52	-1.218	0.22
	13	rs1980080	Intron 2		31406987	A>G	30 ¹	H	32.9	93	-1.817	0.07
	14	rs2137599	Intron 2		31409791	T>C	33 ²	H	43.8	97	2.247	0.03

^{a1} associé avec le psoriasis (Hüffmeier et al., 2005), ^b NM_024628, ^c NT_005612.15

TAB. 3.38: Analyse d'association des haplotypes de *SLC12A8* sur le lot I par FBAT

SNPs	Haplotype	Lot I				
		MAF	Z	P	1,000,000 permutations P	1,000,000 permutations P_{Tot}
1/3	GG	42.6	2.041	0.042	0.044	(0.099)
1/4	GC	38.7	2.035	0.042	0.039	(0.099)
1/14	GC	25.8	2.441	0.015	0.014	(0.072)
2/3	CC	19.9	-2.107	0.035	0.037	(0.055)
2/11	CT	16.3	2.409	0.016	0.016	(0.070)
3/6	GA	14	2.316	0.021	0.021	(0.073)
3/8	GA	41.1	2.054	0.040	0.037	(0.092)
3/10	GC	42.5	2.410	0.016	0.017	(0.070)
3/11	CC	42.9	-2.316	0.021	0.019	(0.055)
3/13	GA	33.9	2.518	0.012	0.0099	(0.072)
3/14	GC	26.4	2.355	0.019	0.020	(0.11)
4/6	CA	13	2.244	0.025	0.024	(0.089)
4/8	CA	35.1	2.308	0.021	0.024	(0.084)
4/10	CC	37.3	2.412	0.016	0.016	(0.061)
4/11	TC	49.3	-2.416	0.016	0.012	(0.053)
4/12	CA	36.8	2.287	0.022	0.022	(0.062)
4/13	CA	29.8	2.446	0.014	0.01	(0.089)
4/14	CC	22.8	2.217	0.027	0.027	(0.087)
6/11	AT	15.4	2.130	0.033	0.032	(0.15)
6/13	AA	18.5	2.115	0.034	0.036	(0.16)
8/13	AA	51.3	2.385	0.017	0.017	(0.058)
8/14	AC	42.2	2.191	0.028	0.031	(0.12)
10/13	CA	54.9	2.361	0.018	0.016	(0.058)
10/14	CC	43.7	2.285	0.022	0.022	(0.075)
11/12	TA	21.4	1.976	0.048	0.046	(0.12)
11/13	TA	18.6	2.221	0.026	0.027	(0.097)
11/14	CT	46.9	-2.065	0.039	0.041	(0.13)
12/13	AA	52.3	2.353	0.019	0.017	(0.047)
12/14	AC	44.2	2.508	0.012	0.011	(0.021)

TAB. 3.39: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC12A8* dans le lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I		
			P	ORaa [95% CI]	ORaa [95% CI]
rs1980080	A>G	32.9	0.30	0.89 [0.73-1.11]	0.80 [0.65-0.99]
rs2137599	T>C	43.8	4.97 x10⁻²	1.22 [1.00-1.48]	1.48 [1.22-1.79]

TAB. 3.40: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC12A8*, suggestifs dans le lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs1980080	32.9	93	-1.82	0.07	34.2	59	0.022	0.98	33.5	152	-1.423	0.16
rs2137599	43.8	97	2.25	0.03	43.4	62	1.145	0.25	43.6	159	2.470	0.01

TAB. 3.41: Analyse d'association des TagSNPs de *SLC12A8* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
		MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
		N	Z	P	N	Z	P		
rs2688992	G>T	49.1	0.18	65	-1.969	0.05	53	0.318	0.75
rs651630	C>T	47.4	0.79	66	-0.827	0.41	48	0.630	0.53
rs564065	G>C	52.9	0.09	62	-2.091	0.04	50	-0.015	0.99
rs2993639	T>C	41.9	0.10	59	1.273	0.20	55	0.973	0.33
rs481018	T>A	49.7	0.43	66	0.611	0.54	50	0.465	0.64
rs658971	G>A	21.2	0.15	55	0.351	0.73	37	2.009	0.05
rs9831295	A>G	21.3	0.32	43	-0.627	0.53	33	-0.725	0.47
rs28986275	C>T	16.8	0.16	43	-0.888	0.37	32	-1.096	0.27
rs633055	C>T	22.7	0.10	50	0.914	0.36	34	1.490	0.14
rs28986277	A>T	15.6	0.22	34	-0.814	0.42	24	-0.906	0.37
rs1980080	A>G	32.9	0.07	62	-1.703	0.09	47	-0.702	0.48
rs2137599	T>C	43.8	0.03	64	2.226	0.03	48	0.751	0.45

réalisées par les deux méthodes et sur les deux lots. Cependant, les marqueurs associés diffèrent entre les études. Les 5 SNPs, rapportés comme étant associés avec le psoriasis dans l'étude de Hüffmeier et ses collaborateurs (2005), ne sont pas associés avec le psoriasis dans nos 45 familles (Lot I). Mais, l'étude réalisée par Hüffmeier et ses collaborateurs (2005) n'a pas identifié une forte association avec les SNPs initialement décrits dans l'étude de Hewett et ses collaborateurs (2002). Seulement deux SNPs ont pu être répliqués avec un P proche du seuil de 0.05 (rs1554241 et rs2228674, situés dans l'intron 6 et près de la partie 3', respectivement). Cependant, Hüffmeier et ses collaborateurs identifient 5 autres SNPs introniques dont rs28986277 (intron 3) et 4 autres SNPs dans la partie 3' du gène (intron 5 et 6). A part le variant dans l'intron 3, la majorité des SNPs associés dans les deux études sont dans la partie 3' du gène. Contrairement à ces études, le seul SNP intronique associé au psoriasis dans notre étude avec différentes analyses est situé dans la partie 5' du gène (intron 2). Ces associations différentes pourraient s'expliquer par une hétérogénéité allélique de *SLC12A8* au sein d'une même population et dans les différentes populations étudiées. Cette hétérogénéité a d'ailleurs été suggérée lorsque deux signaux d'association indépendants, un dans la région 3' et l'autre dans la région 5' du gène, ont été identifiés par l'analyse haplotypique du gène réalisée sur la population allemande atteinte de psoriasis [Huffmeier et al., 2005a]. De plus, l'étude des marqueurs selon le statut HLA-*Cw6* des individus du lot I montre une tendance à indiquer l'existence d'une interaction entre *PSORS1* et *SLC12A8* dans la prédisposition du psoriasis, ce qui serait divergent avec l'étude allemande [Huffmeier et al., 2005a]. Lors de notre étude, seul un variant non synonyme, rs6773138 (K541R, exon 10), avait été validé dans la population caucasienne d'après la base de donnée dbSNP (NCBI). Ce SNP a une fréquence de 2% dans la population générale. Notre échantillon de familles n'a *a priori* pas de taille suffisante pour pouvoir réaliser un test d'association sur ce SNP. Depuis, trois autres variants codants ont été validés dans la population caucasienne : rs2981482 (R664Q, exon 14), rs11714448 (P345P, exon 9), rs2993631 (R181C, exon 5) avec une fréquence de l'allèle mineur de 40.8%, 1.7% et 7.6% respectivement. D'après les nouvelles données de HapMap (Version Avril 07), l'analyse du déséquilibre de liaison dans la région du gène indique que seul le variant R664Q est en complet déséquilibre de liaison avec un variant étudié (rs2688992) qui n'est pas associé au psoriasis dans le lot I. Ce même résultat a été observé par Hüffmeier et ses collaborateurs en 2005. En excluant ce variant, il serait intéressant d'étudier les autres variants codants. En effet, si ces variants, non pris en compte pour leur fréquence faible dans la population générale, sont impliqués dans la maladie, il n'est pas impossible qu'ils puissent avoir une fréquence plus élevée chez les malades. Par ailleurs, il serait également utile de re-séquencer les régions codantes ou régulatrices (non étudiées dans notre étude) de *SCL12A8*, afin de rechercher de nouveaux variants et d'en évaluer leur implication dans la

maladie afin d'identifier les SNPs causatifs.

Les gènes codant des molécules impliquées dans la formation de la barrière épidermique : les gènes *FLG* (FiLaGrine), *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6* (TransGlutaMinases)

Le gène *FLG*

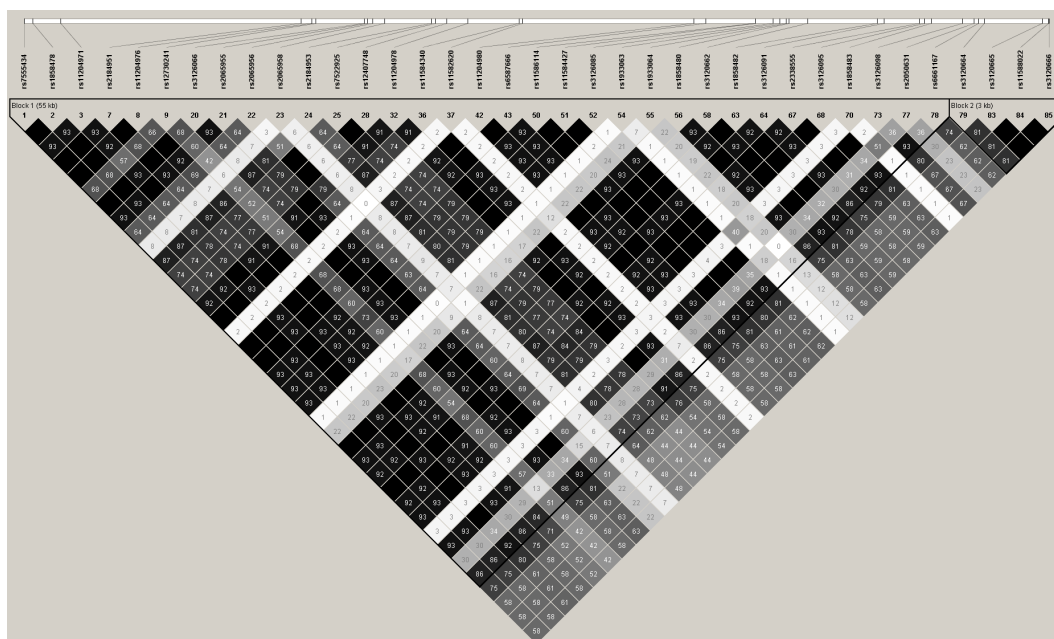
La filagrine, codée par le gène *FLG*, est une protéine essentielle de la barrière épidermique au niveau de la couche terminale de la peau, la couche cornée. Elle provient du clivage en 10-12 protéines d'une grande protéine (>400kDa), la profilagrine, constituant important des granules de kératohyaline présents dans la couche granuleuse de l'épiderme [Candi et al., 2005]. Lors du stade terminal de la différenciation des kératinocytes, la profilagrine est transformée en filagrine, au niveau de la couche cornée, formant la matrice cytoplasmique des cornéocytes, qui sont les cellules anucléées propres de cette couche. La filagrine est capable d'agréger les filaments du cytosquelette des kératinocytes pour mettre en place une matrice dense, réticulée par l'action des transglutaminases, et former l'enveloppe cellulaire cornifiée, essentielle dans la protection de la peau.

Des allèles de type de "perte de fonction" de ce gène, R501X et 2282del4, fréquents dans la population européenne (4% et 1% respectivement), ont été récemment identifiés comme étant la cause d'une maladie de peau monogénique, l'ichtyose vulgaire [Sandilands et al., 2006, Smith et al., 2006]. Ce gène représente également un facteur de prédisposition à une maladie de peau à hérédité complexe, la dermatite atopique (AD), et plus particulièrement l'AD associé à des problèmes allergiques et à de l'asthme [Palmer et al., 2006, Palmer et al., 2007]. Cette dernière association a été répliquée dans de nombreuses études faites sur des populations européennes et japonaises montrant ainsi la robustesse de cette association [Marenholz et al., 2006, Ruether et al., 2006, Weidinger et al., 2006, Barker et al., 2007, Stemmler et al., 2007, Nomura et al., 2008]. Ces variants provoquent une traduction prématurée de la profilagrine au niveau de la séquence codant pour la première filagrine et entraînent donc une perte de la production de la filagrine et une formation altérée de la barrière épidermique [Smith et al., 2006]. D'autres variants codants semblent intervenir dans la pathogenèse de l'AD tels que le variant rare 3702delG qui provoque la fin de la traduction du profilagrine au niveau du domaine formant la troisième filagrine [Sandilands et al., 2006].

Il existe un chevauchement de plusieurs loci de prédisposition potentiels entre deux maladies complexes de peau, le psoriasis et l'AD, sur les chromosomes 3q21, 17q25, 20p12 et surtout, sur le chromosome 1q21 (*PSORS4* pour le psoriasis) au

niveau du complexe de différenciation épidermique (EDC) qui regroupe plusieurs gènes codant des protéines de structure trouvées dans la couche externe de l'épiderme différenciée dont la flagrine [Bowcock and Cookson, 2004]. De plus, une des caractéristiques du psoriasis est une altération de la différenciation des kératinocytes et une inflammation cutanée. Histologiquement, il est observé que la couche granuleuse est réduite ou absente, et/ou des changements dans l'expression de plusieurs protéines du complexe EDC dans l'épiderme lésé chez les patients atteints de psoriasis, comparée à l'épiderme non lésé ou à celui d'un individu sain. Plus particulièrement, la flagrine n'est peu ou pas exprimée dans la couche granuleuse dans l'épiderme lésé, contrairement à celle de l'épiderme non lésé [Huffmeier et al., 2007]. Il est donc intéressant de voir si des altérations dans ce gène, pouvant jouer sur l'expression de celui-ci, pourraient contribuer à la pathogenèse du psoriasis. Trois études ont d'ailleurs été réalisées afin de tester la contribution de deux variants avec perte de fonction ("variants nuls") du gène *FLG*, R501X et 2282del4, à la prédisposition au psoriasis. Hüffmeier et ses collaborateurs (2007) ont rapporté un manque d'association de ces variants avec la maladie lors de l'étude cas-témoins de 375 sujets allemands atteints de psoriasis vulgaris et aussi de 375 sujets allemands atteints de psoriasis arthritique. Ces résultats ont été confirmés lors de l'analyse de 271 patients irlandais et de 420 patients anglais atteints de psoriasis (analysés séparément ou de façon combinée) ainsi que lors de l'analyse de 360 patients allemands (*versus* 2117 et 276 témoins) [Zhao et al., 2007, Weichenthal et al., 2007].

Cependant, ces études ne prennent en compte que les deux variants nuls du gène associé à l'AD et à l'ichtyose vulgaire. Nous avons donc entrepris une approche systématique 'Tagging SNP' pour tester ce gène. Nous avons voulu tester si un autre variant, présent dans la partie codante, non codante ou dans la partie régulatrice (+20kb), pouvait être responsable dans la pathogenèse du psoriasis. En plus des trois variants prédisposant aux maladies citées plus haut (3720delG, 2282del4 et R501X), nous avons sélectionné 7 SNPs supplémentaires, d'après la structure DL du gène *FLG* (Figure 3.14, Table 3.42). Pour des raisons techniques, deux variants 2282del4 et 3720delG n'ont pas pu être génotypés. L'analyse par FBAT du lot I suggère une association, bien que non significative, entre le variant R501X (exon 3, $P=0.07$) pour lequel des associations ont déjà été rapportées dans la littérature et le psoriasis. Notre étude révèle une association statistiquement significative entre la maladie et rs1858483, un variant présent en amont du gène *FLG* ($P=0.001$). Ce résultat n'est pas confirmé avec la méthode "LNMs" (Table 3.43). L'analyse haplotypique du gène *FLG*, dans le lot I, a été réalisée par l'étude des combinaisons de paires de SNPs et indique une association avec la maladie d'une majorité d'haplotype à effet protecteur ($Z<0$) avec un P , après 1 000 000 permutations, variant de 0.0009 et 0.04 (Table 3.44). De plus, les haplotypes

FIG. 3.14: Structure DL du gène *FLG* (voir annexe page 251)TAB. 3.42: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *FLG* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	N°	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>FLG</i> (1q21)	1	rs12730241	3'NG		2764371	G>A	11.4 ¹	H	14.2	68	1.008	0.31
	2	rs2065955	Exon 3	G3436A	2767410	C>G	14.2 ¹	H	12.8	63	0.416	0.68
	3	rs2065958	Exon 3	Y3105D	2768404	C>A	24.8 ¹	H				
	4	rs7522925	Exon 3	A2108V	2771394	G>A	12.1 ¹	H	11.5	59	0.634	0.53
	5	FLG_delG¹	Exon 3	G1234GfsX1445	2774015	->G	NC	A				
	6	FLG_2282del4¹	Exon 3	S761CfsX796	2775432 [^] 35	->CAGT	3.4 ³	A				
	7	FLG_R501X¹	Exon 3	R501X	2776216	C>T	5.8 ³	A	1.7	13	-1.793	0.07
	8	rs11582620	Exon 3	R412R	2776481	A>G	13.3 ¹	H	9.7	46	-0.490	0.62
	9	rs1933063			2791576	G>A	8.3 ¹	H				
	10	rs1933064			2791931	G>A	44.2 ¹	H	42.9	97	1.390	0.17
	11	rs1858483			2800441	C>T	19.3 ¹	H	13.1	50	-3.285	0.001
	12	rs2050631			2802952	A>G	32.5 ¹	H	25.6	82	-1.216	0.22
	13	rs3120664			2803561	T>G	15 ¹	H	15.6	59	0.093	0.93
	14	rs3120665			2806945	A>G	14.2 ¹	H	13.2	56	-0.084	0.93

^{a1} associé avec la dermatite atopique, l'asthme associé avec l'eczéma et l'ichtyose vulgaire (Palmer et al., 2006 ; Palmer et al., 2007 ; Sandilands et al., 2006 ; Smith et al., 2006), ^b NM_002016, ^c NT_004487.18

TAB. 3.43: Analyse d'association des TagSNPs de *FLG* dans le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I		
			P	ORAA [95% CI]	ORAA [95% CI]
FLG_R501X	C>T	1.7	0.74	0.88 [0.43-1.80]	0.78 [0.38-1.60]
rs1858483	C>T	13.1	0.32	0.84 [0.59-1.19]	0.70 [0.50-1.00]

TAB. 3.44: Analyse d'association des haplotypes de *FLG* sur le Lot I par FBAT

SNPs	Haplotype	Lot I				
		MAF	P	Z	1,000,000 permutations P	1,000,000 permutations P _{Tot}
1/11	GT	10.4	-3.068	0.0022	0.0023	(0.019)
1/12	GG	10.5	-2.092	0.036	0.037	(0.11)
2/11	CT	10.2	-2.614	0.0090	0.011	(0.022)
4/11	GC	75.1	2.033	0.042	0.039	(0.0042)
	GT	10.1	-3.120	0.0018	0.0016	
4/12	GG	11.3	-2.017	0.044	0.052	(0.14)
7/11	CC	87.8	3.978	0.000069	0.000066	(0.000063)
	CT	10.8	-3.355	0.00079	0.00086	
8/11	AC	79.7	2.467	0.014	0.013	(0.013)
	AT	10.4	-2.721	0.0065	0.0041	
10/11	GT	10.1	-2.806	0.0050	0.0055	(0.053)
10/12	GG	10.0	-2.089	0.037	0.039	(0.25)
11/13	CT	71.4	2.277	0.023	0.024	(0.0098)
	TT	10.2	-3.018	0.0025	0.0026	
11/14	CA	73.7	2.276	0.023	0.027	(0.019)
	TA	10.5	-2.689	0.0072	0.0095	

TAB. 3.45: Analyse d'association des TagSNPs de *FLG*, suggestifs dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
FLG_R501X	1.7	13	-1.79	0.07	<0.5	1	***	***	0.8	14	-1.586	0.11
rs1858483	13.1	50	-3.28	0.001	12.6	30	0.157	0.88	12.8	80	-2.614	0.009

TAB. 3.46: Analyse d'association des TagSNPs de *FLG* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
				présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
MAF	P	N	Z	P	N	Z	P		
rs12730241	G>A	14.2	0.31	45	0.895	0.37	32	0.429	0.67
rs2065955	C>G	12.8	0.68	43	0.319	0.75	28	0.236	0.81
rs7522925	G>A	11.5	0.53	42	0.739	0.46	25	0.031	0.98
FLG_R501X	C>T	1.7	0.07	9	***	***	5	***	***
rs11582620	A>G	9.7	0.62	29	0.000	1.0	25	-0.703	0.48
rs1933064	G>A	42.9	0.17	58	-0.792	0.43	52	2.793	0.005
rs1858483	C>T	13.1	0.001	26	-2.300	0.02	35	-2.226	0.02
rs2050631	A>G	25.6	0.22	52	-0.739	0.46	45	-0.910	0.36
rs3120664	T>G	15.6	0.93	42	0.269	0.79	28	-0.196	0.84
rs3120665	A>G	13.2	0.93	39	-0.030	0.98	27	-0.092	0.93

associés sont une combinaison avec au moins un de ces SNPs R501X, rs1858483 et rs2050631, pour lesquels une association est suggérée (sauf pour rs2050631) avec la maladie dans l'étude individuelle des SNPs. Le meilleur résultat est obtenu par la combinaison des deux SNPs associés individuellement, R501X et rs1858483 : l'haplotype à risque, CC (88%, $Z=3.98$, $P=0.00007$) et inversement, l'haplotype protecteur, CT (11%, $Z=-3.36$, $P=0.0009$). Ce dernier semble refléter le résultat obtenu lors du test du SNP rs1858483 dans le lot I. De plus, l'étude du lot II seul n'est certes pas significative mais l'analyse des deux lots montre encore une association du marqueur rs1858483 avec le psoriasis ($P=0.009$) (Table 3.45). Pour le marqueur rare R501X, le lot II s'avère peu informatif pour permettre une confirmation. Lors de la dernière étude, l'association de rs1858483 dans le lot I semble être indépendante du paramètre "porteur" ou "non porteur" de l'allèle HLA-*Cw6* avec un $P=0.02$ pour les deux sous-groupes (Table 3.46). Un autre marqueur, rs1933064, paraît être associé au psoriasis lorsque l'on ne considère que les individus ne portant pas l'allèle à risque.

Ces résultats semblent indiquer un rôle dans la maladie d'un SNP, localisé en amont du gène filagrine dans le psoriasis, agissant indépendamment du locus *PSORS1*, mais ne confirme pas celui de R501X. Dans notre population française, la non-contribution de ce variant nul dans la prédisposition au psoriasis s'avère être en accord avec les études indépendantes faites par quatre équipes européennes et chinoises [Huffmeier et al., 2007, Zhao et al., 2007, Chang et al., 2008b, Weichenthal et al., 2007]. De plus, dans notre étude sur la filagrine, nous nous sommes intéressés à la globalité du gène en tenant compte de la structure d'au moins 20kb en amont et en aval du gène. Il existe 10 variants codants et validés dans la population caucasienne. Quatre de ces dix SNPs ont été testés dans cette étude et les 6 autres sont en fort déséquilibre de liaison avec les 4 analysés. En raison de l'absence d'association avec les SNPs codants connus pouvant intervenir dans la conformation de la protéine et l'association d'un marqueur en amont du gène avec le psoriasis, la région devra être approfondie pour élucider la nature exacte du variant causal. Ceci est d'autant plus intéressant qu'un des variants codants (P478S) est associé au psoriasis dans la population chinoise ($P=0.007$) [Chang et al., 2008b]. Il est également possible que ce soit un SNP inconnu dans les bases de données en déséquilibre de liaison avec ceux associés, codants ou non. Par exemple, les trois SNPs de la filagrine associés aux maladies de peau, R501X, 2282del4 et 3720delG n'étaient pas mentionnés dans la base de donnée NCBI. On peut aussi supposer que le variant associé est en déséquilibre de liaison avec un autre provenant d'un gène proche. Ceci serait intéressant dans le cas de la filagrine car il existe, en effet, un autre gène de la même famille, très proche du gène *FLG* nommée *FLG2*, et le marqueur associé se situe entre les deux gènes. Cependant, d'après la structure en blocs DL avec les données HapMap (non montrées), les

FIG. 3.15: Structure DL du gène *TGM3*

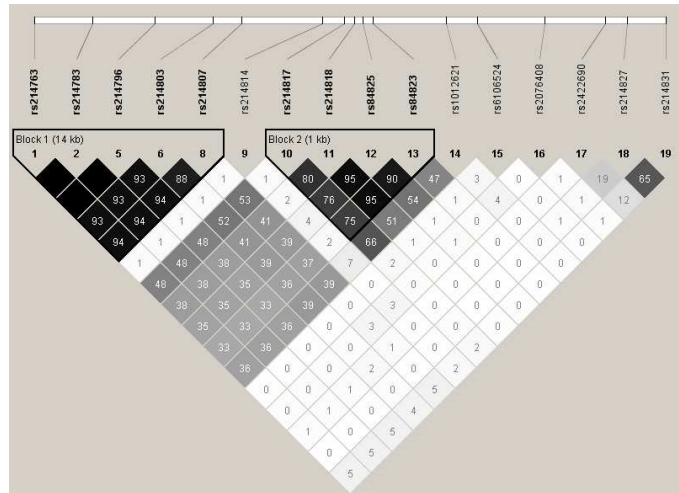


FIG. 3.16: Structure DL du gène *TGM5*

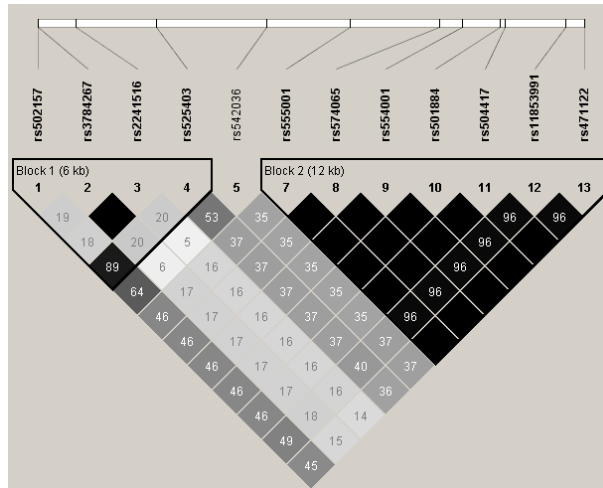
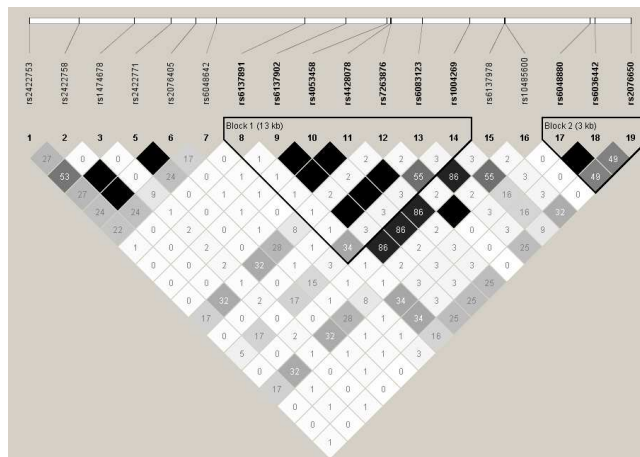


FIG. 3.17: Structure DL du gène *TGM6*



deux gènes ne paraissent pas en fort déséquilibre de liaison.

Les gènes *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6*

Comme discuté précédemment, la fonction de barrière de l'épiderme est assurée en surface par une structure produite par les cornéocytes appelée la couche cornée. Cette couche cornée est composée de nombreuses protéines (comme la filagrine), réticulées par une famille d'enzymes, les transglutaminases. Ces dernières catalysent des réactions de pontage protéiques, formant ainsi un complexe protéique macromoléculaire particulièrement stable et insoluble. Ces enzymes ont donc un rôle important dans la différenciation terminale de l'épiderme.

Des mutations de type "perte de fonction" dans deux gènes codant pour les transglutaminases 1 et 5 (*TGM1* et *TGM5*) ont été identifiées comme étant la cause de trois érythrodermies ichtyosiformes congénitales rares récessives autosomales de la peau, l'ichtyose lamellaire, l'ichtyose non bulleuse et la forme acral du syndrome de desquamation continue [Russell et al., 1995, Cassidy et al., 2005]. Ce sont des désordres de cornification, caractérisés par une sécheresse cutanée prononcée au niveau du tronc, des régions proximales des membres supérieurs, du cuir chevelu et du cou et un épaissement majeur de l'épiderme. Le syndrome de desquamation continue acral ou 'peeling skin syndrome' est caractérisé par une desquamation continue de la couche cornée prédominante au niveau du dos des mains et des pieds.

Trois gènes codants pour les transglutaminases 1, 3 et 6 (*TGM1*, *TGM3* et *TGM6*) sont situés sur les chromosomes 14q et 20p, deux des loci de prédisposition dans nos 45 familles étudiées. Nous nous sommes donc intéressés à ces 4 gènes pouvant, de par leur fonction ou leur position sur le génome, jouer un rôle dans une érythrodermie érythémato-squameuse telle que le psoriasis. L'étude du déséquilibre de liaison dans les 4 gènes a permis de sélectionner 5 TagSNPs pour *TGM1*, 9 pour *TGM3*, 7 pour *TGM5* et 11 pour *TGM6* (Figures 3.15, 3.16 et 3.17). La structure DL du gène *TGM1* n'est pas présentée car il n'existait à l'époque dans la base HapMap qu'un seul SNP de fréquence supérieure à 5%. L'ensemble des informations sur les marqueurs choisis est exposé dans le tableau 3.47. L'analyse des TagSNPs par FBAT dans les 45 grandes familles ne montre aucun résultat significatif. Cependant, lors de l'analyse des haplotypes pour chaque gène, une association faible entre le psoriasis et un haplotype rare de 6.5% de *TGM5* (ACCATGG) est observée avec une valeur de P de 0.04 (basée sur 1000000 permutations) (Tableau 3.48). Après la stratification des familles selon l'haplotype à risque de *PSORS1*, l'analyse des TagSNPs révèle des associations entre trois variants introniques (rs2241516, rs11070398 et rs542036) et la maladie (P=0.001, P=0.002, P=0.02 respectivement) (Tableau 3.49). L'association avec ces SNPs

TAB. 3.47: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
<i>TGM1</i> (14q11)	rs2229463	3' UTR		5718355	T>C	15.5 ¹	D	12.4	54	-0.500	0.62
	rs2855098	Intron 14		5719380	G>C	14.6 ²	D	12.2	55	-0.180	0.86
	rs1950494	Intron 14		5721853	C>T	15 ¹	D	11.8	52	0.182	0.86
	rs2855006	Exon 7	G382G	5728134	C>A	15 ¹	H	21.4	78	0.071	0.94
	rs7151201	Intron 3		5729940	A>C	11.7 ¹	D	16.7	66	0.418	0.68
<i>TGM5</i> (15q15)	rs502157	Intron 8		14319130	C>A	35.8 ¹	H	36.9	77	0.287	0.77
	rs2241516	Intron 8		14321204	G>C	9.2 ¹	H	11.8	43	1.427	0.15
	rs11070398	Intron 5		14325479	T>C	8.3 ²	D	13.2	47	1.443	0.15
	rs525403	Intron 5		14325653	G>A	33.3 ¹	H	35.2	78	0.116	0.91
	rs542036	Intron 5		14331696	T>C	28.3 ¹	H	26.5	71	-1.357	0.17
	rs493177	Intron 5		14333815	T>G	31.7 ¹	D	38.3	98	0.100	0.92
	rs17778967	Intron 2		14341379	G>A	4.2 ¹	D	2.3	11	0.177	0.86
<i>TGM3</i> (20p13)	rs214763	Intron 1		2218028	T>C	15.8 ¹	H	15.7	62	0.346	0.73
	rs214814	Exon 6	S249N	2237790	G>A	8.5 ¹	H	10.5	48	-0.270	0.79
	rs214817	Intron 7		2239329	A>G	17.5 ¹	H	18.2	78	0.791	0.43
	rs214818	Intron 7		2240017	A>G	20.8 ¹	H	19.9	77	0.233	0.82
	rs6106524	Intron 8		2248430	C>T	25 ¹	H	22.9	73	-0.708	0.48
	rs2076408	Intron 10		2253059	A>C	19.2 ¹	H	18.2	88	-0.235	0.82
	rs2422690	Intron 11		2257233	C>G	21.7 ¹	H				
	rs214827	Intron 11		2258723	G>C	41.7 ¹	H				
	rs214831	3' UTR		2261363	G>A	37.5 ¹	H				
<i>TGM6</i> (20p13)	rs2422753	Intron 1		2301684	T>C	18.3 ¹	H	25.6	79	0.452	0.65
	rs2422764	Intron 1		2308068	G>C	30.8 ¹	D	27.8	81	-1.097	0.27
	rs1474678	Intron 1		2310242	A>T	12.5 ¹	H	14	56	-1.167	0.24
	rs2076405	Exon 2	M58V	2315262	C>T	5.1 ¹	H				
	rs6048642	Intron 3		2316963	A>T	6.9 ¹	H	7.1	24	-0.857	0.39
	rs6137891	Intron 8		2324151	G>A	7.5 ¹	H				
	rs6137902	Intron 9		2327527	G>A	13.3 ¹	H				
	rs7263876	Intron 9		2331229	C>T	11.7 ¹	H	11.5	46	0.469	0.64
	rs6048880	Intron 10		2347441	T>C	19.2 ¹	H	18.3	76	-0.889	0.37
	rs2076650	Intron 10		2350766	A>G	32.8 ¹	H	33.8	100	-0.473	0.64
	rs2076649	Intron 10		2350952	G>A	27.1 ²	D	33.9	96	-0.250	0.80

^b NM_000359 pour TGM1, NM_004245 pour TGM5, NM_003245 pour TGM3, NM_198994 pour TGM6,^c NT_026437.11 pour TGM1, NT_010194.16 pour TGM5, NT_011387.8 pour TGM3 et TGM6

TAB. 3.48: Analyse d'association des haplotypes de *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6* sur le Lot I par FBAT

A. Non association

Gènes	Haplotype		Lot I	
			MAF	P
<i>TGM1</i>	H1	TGCCA	60	0.83
	H2	TGCAA	12.6	0.51
	H3	CCTCA	10	0.72
	H4	TGCAC	8.6	0.31
	H5	TGCCC	6.3	0.78
<i>TGM3</i>	H1	TGAACA	50.3	0.78
	H2	TGAACC	10.9	0.60
	H3	TGAATA	7.2	0.32
	H4	CGGGCA	6.7	0.91
	H5	CGGGTA	5	0.15
<i>TGM6</i>	H1	TGAACTAG	41.3	0.32
	H2	TGAACTGA	11.6	0.24
	H3	TGAACCGA	10.9	0.23

B. Association

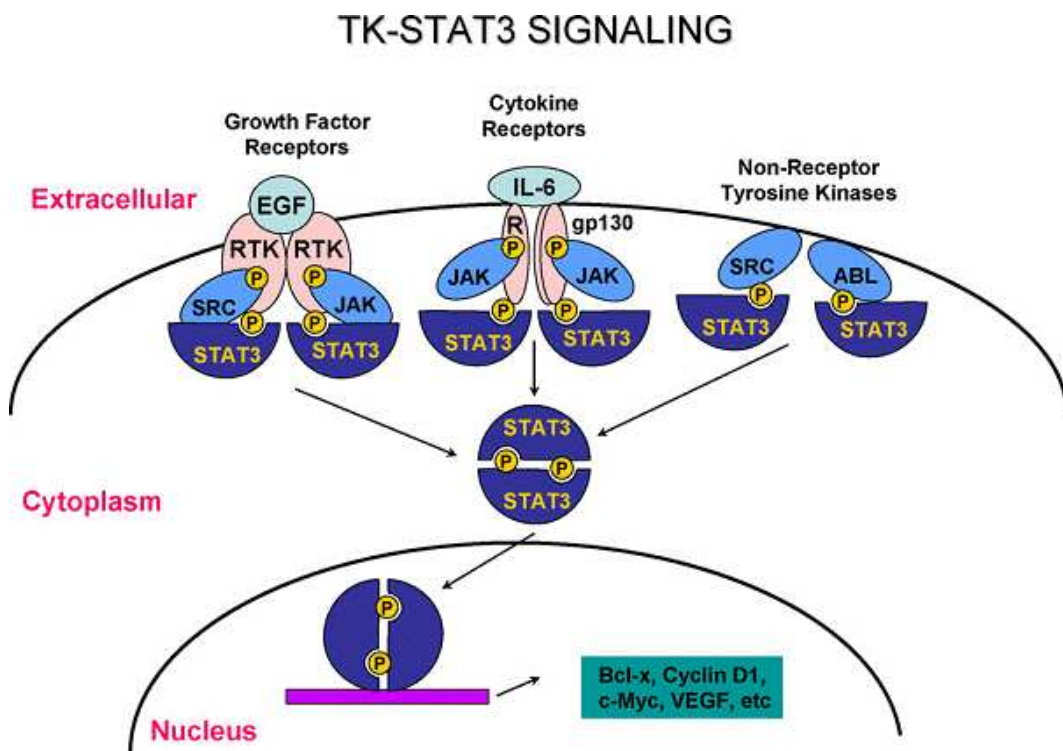
Gènes	Haplotype		Lot I				
			MAF	Z	P	1,000,000 permutations P	1,000,000 permutations P _{Tot}
<i>TGM5</i>	H1	CGTGTTG	54.9	-0.054	0.96	0.98	
	H2	AGTACGG	14.4	-0.332	0.74	0.74	
	H3	CGTGTTG	7.5	-0.774	0.44	0.40	(0.77)
	H4	ACCATGG	6.5	2.121	0.03	0.04	

TAB. 3.49: Analyse d'association des TagSNPs de *TGM1*, *TGM3*, *TGM5* et *TGM6* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

Gènes	SNP ID	Allèles	Lot I							
			Non stratifié		Stratifié selon :					
			MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
		N	Z	P	N	Z	P			
<i>TGM1</i> (14q11)	rs2229463	T>C	12.4	0.62	32	1.125	0.26	30	-1.983	0.05
	rs2855098	G>C	12.2	0.86	34	1.212	0.22	29	-1.667	0.09
	rs1950494	C>T	11.8	0.86	32	1.784	0.07	29	-1.701	0.09
	rs2855006	C>A	21.4	0.94	50	-0.663	0.51	40	0.863	0.39
	rs7151201	A>C	16.7	0.68	38	0.520	0.60	35	0.054	0.96
<i>TGM5</i> (15q15)	rs502157	C>A	36.9	0.77	46	0.320	0.75	43	0.078	0.94
	rs2241516	G>C	11.8	0.15	27	3.184	0.001	18	-1.855	0.06
	rs11070398	T>C	13.2	0.15	29	3.095	0.002	22	-1.629	0.10
	rs525403	G>A	35.2	0.91	48	0.559	0.58	44	-0.438	0.66
	rs542036	T>C	26.5	0.17	43	-2.352	0.02	38	0.532	0.60
	rs493177	T>G	38.3	0.92	56	-0.474	0.64	55	0.614	0.54
	rs17778967	G>A	2.3	0.86	8	***	***	5	***	***
<i>TGM3</i> (20p13)	rs214763	T>C	15.7	0.73	43	0.153	0.88	28	0.383	0.70
	rs214814	G>A	10.5	0.79	33	-0.776	0.44	28	0.503	0.62
	rs214817	A>G	18.2	0.43	56	0.729	0.47	35	0.304	0.76
	rs214818	A>G	19.9	0.82	56	0.322	0.75	33	-0.067	0.95
	rs6106524	C>T	22.9	0.48	46	-0.727	0.47	40	-0.230	0.82
rs2076408	A>C	18.2	0.82	56	-0.694	0.49	41	0.445	0.66	
<i>TGM6</i> (20p13)	rs2422753	T>C	25.6	0.65	51	0.253	0.80	41	0.367	0.71
	rs2422764	G>C	27.8	0.27	47	-0.756	0.45	45	-0.760	0.45
	rs1474678	A>T	14	0.24	34	0.126	0.90	31	-1.758	0.08
	rs6048642	A>T	7.1	0.39	17	-0.301	0.76	14	-0.894	0.37
	rs7263876	C>T	11.5	0.64	27	0.084	0.93	25	0.596	0.55
	rs6048880	T>C	18.3	0.37	47	0.224	0.82	42	-1.555	0.12
	rs2076650	A>G	33.8	0.64	64	0.536	0.59	52	-1.496	0.14
rs2076649	G>A	33.9	0.80	61	0.769	0.44	51	-1.431	0.15	

FIG. 3.18: Représentation schématique de la voie de signalisation Tyrosine Kinase (TKs) couplé à STAT3

L'activation du facteur de transcription cytoplasmique STAT3 est induite par la fixation de différents facteurs (facteur de croissance (EGF) ou de cytokines (IL-6) sur les récepteurs à kinases (RTK ou JAK). Deux STAT3 activés forment un dimère, entre dans le noyau pour se lier à l'ADN entraînant ainsi l'activation de la transcription de gènes cibles. (D'après [Sano et al., 2008])

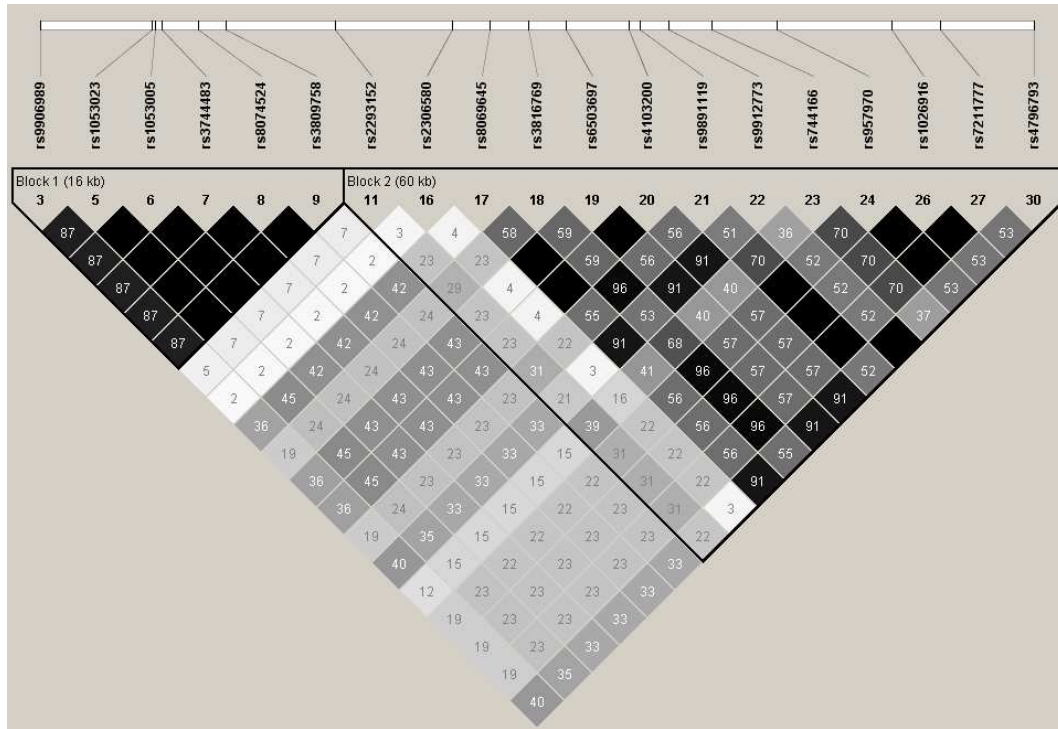


n'est pas observée lors de la première étude (sans stratification des familles) mais seul un haplotype est faiblement associé à la maladie. Lors d'une étude supplémentaire sur les familles stratifiées, l'association entre l'haplotype et le psoriasis est fortement significative ($P=0.0002$, basée sur 1000000 permutations) lorsque les malades portant l'allèle HLA-*Cw6* sont pris en compte. Cela indique que l'association entre ce gène et le psoriasis est dépendante du locus *PSORS1*. Même si les résultats n'ont pu être répliqués dans notre deuxième lot pour des raisons techniques, le gène *TGM5* semble être un facteur de risque pour le psoriasis. Néanmoins, il serait nécessaire de répliquer ces résultats.

Gènes «non associés» au psoriasis dans notre étude : les facteurs de transcription STAT3 et AP-1

Le gène *STAT3* (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

La famille des protéines STATs (*Signal transducers and activators of transcription*) est une famille de facteurs de transcription cytoplasmique impliquée dans la transmission des signaux extracellulaires au noyau, tels que les facteurs de croissance (EGF) ou les interleukines/cytokines (IL-5 et IL-6). STAT3, le membre le plus étudié de cette famille, intervient, à l'état activé, dans de nombreux processus physiologiques comme la prolifération, la migration ou la survie cellulaire [Sano et al., 2005, Sano et al., 2008]. Il participe en intervenant dans la régulation de certains gènes comme ceux codant la cycline D1 ou Bcl-xL [Sano et al., 2005, Sano et al., 2008]. Lors de la fixation de certains facteurs extérieurs (facteurs de croissance/cytokines) sur des récepteurs spécifiques de type tyrosine kinase, STAT3 est activé grâce à la phosphorylation de la tyrosine 705 de STAT3 par des kinases activées appartenant aux familles de kinases SRC et JAK. Deux protéines STAT3 activées s'homodimérisent pour permettre la translocation nucléaire du complexe. La liaison de ce complexe sur l'ADN active la transcription des gènes ciblés (Figure 3.18) [Sano et al., 2008]. La protéine STAT3, sous forme activée, semble être essentielle pour la réparation tissulaire de la peau dans les kératinocytes. Ce phénomène a été mis en évidence chez les souris déficientes en *Stat3* montrant un retard de la cicatrisation. De plus, il a été montré que la protéine STAT3, sous forme active, est présente dans l'épiderme au niveau des blessures chez l'homme et chez la souris [Sano et al., 2005, Sano et al., 2008]. Par ailleurs, l'existence de similarités entre la ré-épithélisation durant la cicatrisation et le psoriasis a permis d'émettre l'hypothèse que les plaques psoriasiques pourraient être la conséquence de réactions persistantes de cicatrisation [McKenzie and Sabin, 2003]. D'autres arguments plus forts montrant l'implication de STAT3 dans l'origine des lésions psoriasiques proviennent de l'étude de Sano et ses collaborateurs en 2005.

FIG. 3.19: Structure DL du gène *STAT3*TAB. 3.50: Identification et analyse d'association des TagSNPs de *STAT3* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	N°	SNP ID	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
									MAF	N	Z	P
<i>STAT3</i> (17q21)	1	rs9906989			4180142	G>T	14.7 ¹	H	13.4	55	-0.109	0.91
	2	rs1053004	3' UTR		4190388	T>C	41.7 ²	D	38.6	91	0.609	0.54
	3	rs8074524	Intron 21		4193894	C>T	15.8 ¹	H	15.5	57	0.166	0.87
	4	rs2293152	Intron 13		4205825	G>C	38.8 ¹	H	33	104	-1.868	0.06
	5	rs2306580	Intron 4		4215976	C>G	10.8 ¹	H	9.5	36	0.722	0.47
	6	rs3869550	Intron 4		4217183	A>G	37.5 ²	D	35.9	91	1.252	0.21
	7	rs8069645	Intron 4		4219198	A>G	24.2 ¹	H	26	77	0.999	0.32
	8	rs7217655	Intron 4		4220320	C>T	35 ¹	D	34.9	88	1.417	0.16
	9	rs6503695	Intron 2		4223829	T>C	34.8 ¹	D	30.6	96	0.958	0.34
	10	rs9891119	Intron 1		4232276	A>C	35.8 ¹	H				
	11	rs17593222	Intron 1		4237286	C>G	10.2 ¹	D	8.8	34	0.875	0.38
	12	rs744166	Intron 1		4238497	T>C	44.8 ¹	H	40.8	102	1.320	0.19
	13	rs4796793	5' NG		4266506	C>G	22.5 ¹	H	25	80	0.890	0.37

^b NM_003150, ^c NT_010755.15

Ces auteurs ont mis en évidence la présence de STAT3 activé dans les kératinocytes au niveau des lésions psoriasiques humaines mais aussi dans celles de souris exprimant de façon constitutive Stat3 dans les kératinocytes. Ces animaux transgéniques développent des lésions spontanées de peau similaires à celles observées chez les patients atteints de psoriasis, comme l'hyperplasie épidermique, l'inflammation cutanée avec infiltrat de cellules immunitaires, l'hyperprolifération des kératinocytes ainsi qu'une altération de leur différenciation (perte de la couche granulaire). Ces souris montrent aussi une sensibilité accrue de l'épiderme aux stimuli extérieurs, enclenchant ainsi un phénotype psoriasique, une autre caractéristique clinique chez l'humain connue sous le nom de phénomène de Koebner.

Toutes ces données indiquent que dans les kératinocytes, l'activation de STAT3 et par conséquent, l'enclenchement de la voie de signalisation de celui-ci régulant certains gènes serait requis pour le développement du psoriasis chez l'homme. L'étude de Sano montre un rôle essentiel de STAT3 activé dans les kératinocytes seulement en présence de cellules immunitaires, les lymphocytes T, dans l'apparition de lésions psoriasiques induite par une blessure chez les souris. Il est probable que la sur-transcription de certains gènes régulés par STAT3 activé, tels que les gènes codant les chémokines, les intégrines ou des molécules d'adhésion (ICAM-1), dans les kératinocytes puisse favoriser le recrutement, la migration, l'adhérence à l'épiderme et enfin, l'activation des cellules T. Ceci peut donc contribuer au développement et à la maintenance du phénotype psoriasique. Les facteurs connus pour être responsable de l'activation de STAT3 dans la peau tels que les facteurs de croissance ou les cytokines (IL-20, IL-6, EGF..) sont également de bons gènes candidats. D'ailleurs, une altération de la différenciation et une hyperprolifération des cellules de l'épiderme ont été aussi observées dans deux autres modèles de souris transgéniques, sur-exprimant dans les kératinocytes les cytokines l'IL-20 ou IL-6. Ces dernières sont d'ailleurs surexprimées dans les lésions psoriasiques [Gudjonsson et al., 2007].

Nous nous sommes donc intéressés au gène codant cette protéine. De la même manière que pour l'étude des gènes précédemment décrits, nous avons sélectionné une quinzaine de TagSNPs choisis, en fonction du déséquilibre de liaison dans la région entourant le gène (+10kb) afin de pouvoir réaliser une étude d'association globale (Figure 3.19). L'ensemble des informations ainsi que les résultats obtenus de l'analyse par FBAT du lot I sont décrits dans le tableau 3.50. Cette analyse suggère une association entre le psoriasis et le SNP rs2293152 présent dans l'intron 13 ($P=0.06$). Cependant, cette association n'est pas retrouvée lors de l'analyse par la méthode "LNMs" du même lot, lors de l'étude par FBAT du lot II ou lors de celle combinant les deux lots (Tableaux 3.51 et 3.52). De plus, pour les mêmes raisons que lors de l'étude du gène *SLC12A8* (faible DL dans la région génomique),

TAB. 3.51: Analyse d'association des TagSNPs de *STAT3* dans le Lot I avec la méthode "LNMs"

SNP ID	Allèles	MAF	Lot I			
			P	ORAA	[95% CI]	ORAA [95% CI]
rs2293152	G>C	33	0.98	1.00	[0.81-1.22]	0.99 [0.80-1.22]

TAB. 3.52: Analyse d'association du TagSNP de *STAT3*, suggestif dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)

FBAT SNP ID	Lot I				Lot II				Lot I + Lot II			
	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P	MAF	N	Z	P
rs2293152	33	104	-1.87	0.06	40	63	1.352	0.18	36.6	167	-0.697	0.49

TAB. 3.53: Analyse d'association des haplotypes de *STAT3* sur le Lot I par FBAT

SNPs	Haplotype	Lot I						
		MAF	Z	P	1,000,000 permutations P	1,000,000 permutations P_{Tot}		
2/8	CC	5.7	-2.092	0.036	0.032	(0.16)		

TAB. 3.54: Analyse d'association des TagSNPs de *STAT3* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

SNP ID	Allèles	Lot I							
		Non stratifié		Stratifié selon :					
		MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
		N	Z	P	N	Z	P		
rs9906989	G>T	13.4	0.91	35	-0.171	0.86	30	0.034	0.97
rs1053004	T>C	38.6	0.54	56	1.287	0.20	48	-0.619	0.54
rs8074524	C>T	15.5	0.87	37	0.444	0.66	30	-0.262	0.79
rs2293152	G>C	33	0.06	68	-2.068	0.04	53	-0.368	0.71
rs2306580	C>G	9.5	0.47	23	1.402	0.16	18	-0.572	0.57
rs3869550	A>G	35.9	0.21	57	2.453	0.01	49	-0.952	0.34
rs8069645	A>G	26	0.32	50	1.774	0.076	38	-0.589	0.56
rs7217655	C>T	34.9	0.16	55	2.586	0.01	48	-0.847	0.40
rs6503695	T>C	30.6	0.34	63	1.527	0.13	45	-0.382	0.70
rs6503697	A>T	26	0.59	51	1.610	0.11	41	-1.026	0.31
rs9891119	A>C								
rs17593222	C>G	8.8	0.38	21	1.639	0.10	18	-0.572	0.57
rs744166	T>C	40.8	0.19	66	2.217	0.03	51	-0.611	0.55
rs4796793	C>G	25	0.37	52	1.523	0.13	39	-0.470	0.64

l'analyse haplotypique du gène *STAT3* a été faite en testant toutes les combinaisons de 2 SNPs. Seule une combinaison de deux SNPs localisés dans deux blocs de DL différents, rs1053004 dans la région 3'UTR et rs7217655 dans l'intron 3, montre une sous-transmission de l'haplotype CC de fréquence de 6% chez les malades ($Z=-2.09$, $P=0.03$) (Table 3.53). Après stratification du lot I selon la présence ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6*, l'analyse des TagSNPs révèle une faible association du psoriasis avec trois nouveaux SNPs, rs3869550 (intron 3), rs7217655 (intron 3), rs744166 (intron 1), et avec rs2293152 précédemment identifiés comme étant faiblement associés avec la maladie dans le premier test ($P=0.01$, $P=0.01$, $P=0.03$ et $P=0.04$ respectivement) et uniquement dans le cas où l'analyse prend en compte les malades portant l'allèle HLA-*Cw6* (Table 3.54). Même si ces associations obtenues après cette stratification sont peu significatives, elles sont plus fortes que celles obtenues par l'analyse classique prenant en compte tous les patients, ce qui indiquerait une contribution conjointe du gène *STAT3* avec le locus *PSORS1* dans la prédisposition à la maladie.

Cependant, sur l'ensemble des analyses réalisées, ce gène ne semble pas intervenir dans la pathologie de la maladie.

Les gènes *JUN* (JUN oncogene) et *JUNB* (JUN B Proto-oncogene)

Le complexe du facteur de transcription de la protéine activatrice-1 (AP-1) intervient dans de nombreux mécanismes biologiques (prolifération, différenciation etc.). En particulier, dans l'épiderme, les éléments d'AP-1 sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, la carcinogenèse, la réponse à des éléments néfastes (UV/stress), la réparation du photo-vieillessement et de blessures ainsi que dans la production des cytokines [Zenz and Wagner, 2006]. Ce complexe protéique, AP-1, agissant en aval de certaines voies de signalisation, traduit les stimuli externes à la fois dans un changement, à court terme et/ou à long terme, dans l'expression des gènes. Son activité est induite et régulée par une large gamme de stimuli physiologiques et pathologiques, tels que des cytokines, des facteurs de croissance, des neurotransmetteurs, des hormones polypeptides, en réponse ou non à des infections bactériennes, virales et à une variété de stress environnementaux chimiques et physiques. Par exemple, certains stimuli activent les cascades de la voie de signalisation de la protéine kinase activée par mitogène (MAPK) qui augmentent, *via*, par exemple, une cascade de phosphorylation ou une oxydo-réduction de substrats spécifiques, l'activité d'AP-1 [Zenz and Wagner, 2006].

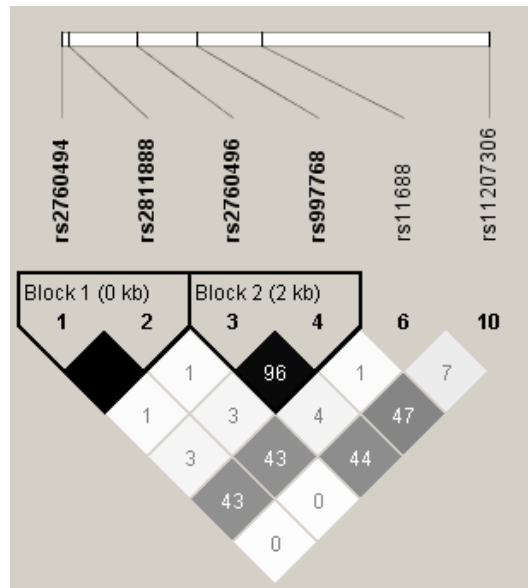
Les membres principaux du complexe AP-1 sont les protéines de la famille de Jun (Jun, JunB et JunD), de Fos, de ATF et de fibrosarcomes musculoaponeurotiques (Maf). Les protéines Jun et Fos fonctionnent comme des facteurs de

transcription dimériques. Sous forme d'homodimères et /ou d'hétérodimères, ils se lient à l'ADN au niveau des sites de liaison d'AP-1 présents dans les régions "enhancer" et "promotrices" de nombreux gènes mammifères cibles pour favoriser leur transcription [Zenz and Wagner, 2006]. Les différents membres des familles de Jun et de Fos montrent des différences significatives dans leur activité transcriptionnelle et dans la liaison à l'ADN suggérant ainsi des fonctions spécifiques dans la régulation des gènes cibles pour les différents dimères d'AP-1 [Shaulian and Karin, 2002]. Dans le cas de Jun et de JunB, ils diffèrent considérablement dans leur capacité à réguler de gènes cibles. Par suite de la faible affinité de JunB pour s'homodimériser ainsi que pour se lier à l'AP-1, JunB a besoin d'interactions synergiques avec de nombreux homodimères pour activer efficacement les promoteurs. Contrairement à JunB, Jun nécessite un seul site de liaison au complexe AP-1 pour intervenir dans la transcription des gènes [Shaulian and Karin, 2002, Zenz and Wagner, 2006]. De plus, ces protéines montrent des fonctions antagonistes. Par exemple, dans le cas de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes lors du développement et lors du cancer de la peau, Jun est considéré comme un régulateur positif de la prolifération par son effet transcriptionnel direct sur l'expression épidermique du récepteur de facteur de croissance (EGFR). En revanche, JunB peut empêcher la prolifération des kératinocytes et des cellules souches hématopoïétiques. En plus de son implication dans la balance des processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes, le complexe AP-1 intervient aussi sur de nombreux gènes clés de l'homéostasie de la peau, tels que les gènes codants pour les transglutaminases, les cytokératines, la profilagrine, et sur des gènes impliqués dans l'inflammation comme les cytokines et leurs récepteurs (*TNF α* , *IL-8*, *IL-1RN*), les facteurs de croissance [Zenz and Wagner, 2006].

Chez l'homme, quelques études ont suggéré un rôle de ces protéines dans l'étiologie du psoriasis. En effet, une étude d'expression de JunB et de Jun, dans des biopsies de peau de zones non lésées et lésées de 8 patients atteints de psoriasis, montre que dans l'épiderme non atteint des patients, JunB est exprimé dans toutes les couches de l'épiderme, avec des niveaux plus élevés dans les couches basales et spineuses [Zenz et al., 2005]. Ce profil est semblable à celui observé lors de l'étude de la peau saine. En revanche, l'expression de JunB est considérablement réduite dans la peau lésée de patients atteints d'une forme grave de psoriasis (n=6) et intermédiaire dans celle de patients atteints d'une forme modérée de psoriasis (n=2), suggérant un rôle possible de JunB dans le développement de la maladie. Jun, un antagoniste de JunB, est seulement faiblement exprimé dans l'épiderme normal, excepté dans la couche granulaire. Contrairement à JunB, l'expression de Jun est augmentée dans la peau lésée. Ainsi, une réduction forte du rapport JunB/ Jun est observée dans la peau lésée, surtout dans la couche basale, ce qui

pourrait expliquer le défaut de différenciation des kératinocytes [Zenz et al., 2005]. Une étude fonctionnelle, sur un modèle murin de Knock-out inductible des protéines Jun/JunB dans les kératinocytes semble confirmer le rôle de ces protéines dans le psoriasis. Dans le cas des composants d'AP-1, la létalité embryonnaire des divers knock-outs des éléments d'AP-1, par exemple pour Jun, JunB, Fra-1 et Fra-2, empêche en grande partie des études fonctionnelles *in vivo* mais montrent l'importance de ces gènes dans le développement embryonnaire. Ainsi, les stratégies de knock-outs conditionnels et inductibles chez la souris, en particulier dans l'épiderme, sont devenues un modèle important pour étudier la régulation et la fonction des sous-unités AP-1 dans des processus physiologiques et pathologiques *in vivo*. Dans un délai de 2 semaines, contrairement aux délétions spécifiques à l'épiderme de seulement *JunB* ou *Jun* chez les souris transgéniques, un phénotype, ressemblant fortement aux lésions des patients atteints de psoriasis, tels que des plaques écailleuses affectant principalement les oreilles, les pattes et la queue, et moins fréquemment la peau arrière velue et des altérations de la peau "chauve", est observé lors de la double-délétion de *JunB* et de *Jun* propre à l'épiderme et inductible chez les souris transgéniques. D'autres caractéristiques du psoriasis sont présentes, telles que l'épaississement de l'épiderme, l'épaississement des couches supérieures kératinisées avec la parakératose (les kératinocytes nucléés dans la couche cornifiée) et l'augmentation de la vascularisation sous-épidermique. Des cellules T intra-épidermiques et des cellules inflammatoires typiques (neutrophiles et macrophages) sont présentes dans le derme et au niveau des articulations. Enfin, un grand nombre de cytokines, de chémokines et de facteurs de transcription, éléments contribuant sûrement à la pathogénie du psoriasis, s'avèrent être dérégulés [Zenz et al., 2005].

La sous-régulation de JunB/AP-1 dans les kératinocytes pourrait donc être un événement initiateur dans l'étiologie du psoriasis, caractérisé par la prolifération de cellules et l'expression dérégulée de cytokines. Des lésions arthritiques avec une pénétrance de 100% ont également été observées, rappelant fortement l'arthrite psoriasique retrouvée chez 5-40% de patients atteints de psoriasis. De plus, la double délétion des deux gènes chez les souris déficiente du gène *Rag2* (*recombinase activating gene 2*) donne un phénotype moins grave avec peu de lésions arthritiques que chez les souris délétées pour *Jun* et *JunB*. Ces souris avec knock-out du gène *Rag2* ne peuvent plus recombinaison les gènes d'immunoglobuline et ne produisent plus de lymphocytes B matures ou de cellules T. Cette étude indique que les lymphocytes T auraient un rôle seulement dans la gravité de la maladie et dans la pathogenèse des lésions arthritiques [Zenz et al., 2005]. Ce phénotype obtenu par le modèle murin de double-délétion de *JunB* et *Jun* dans l'épiderme semble donc être le plus ressemblant à celui obtenu chez les humains atteints de psoriasis.

FIG. 3.20: Structure DL du gène *JUN*TAB. 3.55: Identification et test d'association des TagSNPs de *JUN*, *JUNB* sur le Lot I par FBAT

Gène (Chr.)	SNP ID ^a	Région ^b	Acide aminé	Position ^c	Allèles	MAF	BD	FBAT Lot I			
								MAF	N	Z	P
<i>JUN</i> (1p32)	rs2760494			29210289	T>C	14.2 ¹	H	8.6	46	-1.054	0.29
	rs2760496			29213947	A>C	35.8 ¹	H	25.2	87	-0.536	0.59
	rs997768			29216838	G>A	42.5 ¹	H	24.7	80	-0.451	0.65
	rs1323288	3'NG		29218034	T>G	37.1 ¹	D	23.3	84	-0.216	0.83
	rs11688	Exon 1	Q250Q	29219912	G>A	6.7 ¹	H	2.6	18	-0.766	0.44
	rs4646999	5'NG		29222371	C>T	33.3 ²	D	40.1	96	-0.221	0.83
	rs17265089	5'NG		29222594	C>G	8.3 ²	D	2.6	23	-0.338	0.74
	rs11207306			29230798	C>T	37.5 ¹	H	25.5	86	0.073	0.94
<i>JUNB</i> (19p13)	rs1061595	3' UTR		4166800	C>T	43 ²	D				
	rs1205171			4174142	G>A	17.5 ¹	H	12.2	58	-0.593	0.55

^b NM_002228 pour JUN, NM_002229 pour JUNB, ^c NT_032977 pour JUN, NT_011295 pour JUNB

TAB. 3.56: Analyse d'association des haplotypes de *JUN* sur le Lot I par FBAT

Gènes	Haplotype	Lot I	
		MAF	P
<i>JunC</i>	H1 TAGTGCCC	38.1	0.40
	H2 TAGTGTCC	29.1	0.93
	H3 TCAGGCCT	19.6	0.98
	H4 CCATGTCC	5.9	0.99

Les protéines Jun et JunB restent des protéines clés et incontournables de la peau. Il est donc utile de choisir *Jun* et *JunB* comme gènes candidats dans l'étiologie du psoriasis, d'autant plus que ces gènes, *Jun* et *JunB* sont présents dans deux locus de prédisposition au psoriasis, *PSORS7* sur le chromosome 1p32 et *PSORS6* sur le chromosome 19p13. Pour l'analyse globale de ces gènes, le déséquilibre de liaison entre les SNPs validés dans les bases de données (HapMap/NCBI) et présents dans la région entourant le gène (+10kb) a été étudié. Peu de variants avec une fréquence de l'allèle mineur supérieure à 5% validés dans la population caucasienne ont été identifiés (Figure 3.20). L'ensemble des renseignements sur les SNPs sélectionnés ainsi que les résultats obtenus lors de leurs analyses dans le lot I par le programme FBAT individuellement ou conjointement sont décrits dans les tableaux 3.55 et 3.56. L'analyse des TagSNPs lors de la stratification des patients du lot I selon la présence ou non de l'haplotype à risque ne donne pas plus de résultats statistiquement significatifs (Table 3.57).

L'ensemble de ces analyses nous indique que le gène *Jun* ne semble pas contribuer à la pathogenèse du psoriasis. En revanche, nous ne pouvons pas exclure l'implication de *JunB* dans le psoriasis. Lors de notre étude sur le gène *JunB*, seul un variant, présent à l'extérieur du gène, a pu être analysé dû au manque d'informations sur la structure LD du gène. D'après la base de données NCBI, seul le variant rs1061595 est validé dans la population caucasienne et est à une fréquence supérieure à 5%. Il serait donc intéressant de séquencer les régions codantes et régulatrices du gène *JunB* afin d'identifier les variants qui seront au moins validés dans nos familles françaises. L'analyse de ces variants permettra de nous éclairer sur l'implication de ce gène dans le psoriasis.

3.3 Conclusion

L'identification des gènes de prédisposition aux maladies multifactorielles reste difficile de par le nombre important des gènes impliqués, la variabilité de leurs implications (gènes à effet faible ou fort) et les interactions gènes-environnement. L'existence de co-localisations de loci d'intérêt pour certaines maladies telles que les maladies auto-immunes suggèrent des facteurs génétiques communs responsables de ces maladies. Dans notre dernière étude, 22 gènes candidats ont été sélectionnés en fonction de leur association décrite dans la littérature avec d'autres maladies auto-immunes ou de la peau, ou de par leur fonction. Les associations ont été testées par deux méthodes différentes (FBAT et "LNMs") sur deux lots de familles françaises hétérogènes afin d'identifier ou de confirmer des gènes de prédisposition au psoriasis. L'utilisation de deux méthodes de calculs, prenant en compte différemment la structure des familles ainsi que l'utilisation de deux lots de structures familiales différentes, peut expliquer les différences obtenues entre les analyses.

TAB. 3.57: Analyse d'association des TagSNPs de *JUN* dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA-*Cw6* dans le Lot I

Gène (Chr.)	SNP ID	Allèles	Lot I							
			Non stratifié		Stratifié selon :					
			MAF	P	présence HLA- <i>Cw6</i>			absence HLA- <i>Cw6</i>		
		N	Z	P	N	Z	P			
<i>JUN</i> (1p32)	rs2760494	T>C	8.6	0.29	26	0.642	0.52	25	-1.991	0.05
	rs2760496	A>C	25.2	0.59	59	0.743	0.46	43	-1.619	0.11
	rs997768	G>A	24.7	0.65	54	0.676	0.50	40	-1.393	0.16
	rs1323288	T>G	23.3	0.83	54	0.656	0.51	46	-1.002	0.32
	rs11688	G>A	2.6	0.44	10	1.029	0.30	13	-1.620	0.11
	rs4646999	C>T	40.1	0.83	59	0.059	0.95	56	-0.384	0.70
	rs17265089	C>G	2.6	0.74	13	1.322	0.19	15	-1.546	0.12
	rs11207306	C>T	25.5	0.94	59	0.703	0.48	43	-0.689	0.49
JUNB (19p13)	rs1205171	G>A	12.2	0.55	43	-1.327	0.18	22	0.930	0.35

Cependant, l'ensemble des résultats confirme l'implication de *SLC12A8* dans la susceptibilité au psoriasis. Ce gène de prédisposition *SLC12A8*, codant pour une protéine de fonction encore peu connue, a été identifié par clonage positionnel sur le locus *PSORS5* en 3q21, puis confirmé par une étude indépendante sur une population différente [Enlund et al., 1999b, Hewett et al., 2002, Huffmeier et al., 2005a]. Dans nos familles françaises, l'association la plus significative est observée entre le psoriasis et un SNP présent dans la région 5' du gène, ce qui est différent des deux études précédentes où l'association est significative pour des SNPs introniques présents dans la région 3'. Ceci pourrait être dû à l'existence d'une hétérogénéité allélique, ce qui a été préalablement suggéré lors d'une étude de réplification [Huffmeier et al., 2005a]. Notre recherche est donc la seconde étude de réplification faisant suspecter l'implication de ce gène dans le psoriasis.

De plus, notre étude indique un rôle éventuel dans la pathogenèse du psoriasis de deux gènes, *FLG* et *TGM5* codant des protéines épidermiques impliquées dans la différenciation de l'épiderme pour former la couche cornée, une barrière physique modifiée chez les patients atteints de psoriasis.

Le gène *FLG* codant une protéine structurale est présent sur le locus *PSORS4*, un locus commun à une autre maladie de la peau, la dermatite atopique [Bowcock and Cookson, 2004]. Deux variants "perte de fonction" de ce gène ont été associés à deux maladies de la peau, l'ichtyose vulgaire et la dermatite atopique [Sandilands et al., 2006, Smith et al., 2006, Palmer et al., 2006]. Dans notre étude, aucune association n'est observée entre les variants prédisposant aux maladies précédentes et le psoriasis, ce que confirme les études décrites sur le psoriasis et l'arthrite psoriasique [Huffmeier et al., 2007, Weichenthal et al., 2007, Zhao et al., 2007]. La meilleure association est obtenue pour un SNP en amont du gène *FLG*, indépendamment du locus *PSORS1*. Notre étude est la première investigation à tester globalement le gène, et pas seulement les variants "perte de fonction" dans l'étiologie de la maladie.

Le gène *TGM5* code la transglutaminase 5, une enzyme qui catalyse des réactions de pontage protéique (comme la filagrine) pour permettre la formation stable de la couche cornée. Des mutations "perte de fonction" ont été identifiées comme étant la cause du syndrome de desquamation continue [Cassidy et al., 2005]. Dans notre étude, les associations les plus significatives, sont dépendantes du locus *PSORS1*, quelle que soit l'étude (SNP ou haplotype) du premier lot. Même si ces résultats sont à prendre avec précaution vu l'absence de réplification pour des raisons techniques dans le second lot, ce gène semble être potentiellement un gène de prédisposition au psoriasis.

Deux autres gènes *CARD15* et *CYLD*, qui codent des protéines modulatrices d'un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'activation des cellules T (NF- κ B) semblent être également impliqués dans le psoriasis. Ces deux gènes sont présents sur le chromosome 16q dans une région commune à plusieurs maladies telles que la maladie de Crohn, le psoriasis (*PSORS8*) et l'arthrite psoriasique [Nair et al., 1997, Hugot et al., 2001, Karason et al., 2003].

Des polymorphismes codants du gène *CARD15* ont d'ailleurs été montrés associés à la maladie de Crohn [Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001]. Même si la fonction exacte n'est pas clairement élucidée, le produit de ce gène activerait, en réponse aux bactéries, un facteur de transcription de l'homéostasie et de l'activation des cellules T, NF- κ B [Ogura et al., 2001]. Dans le cas du psoriasis, une première étude sur des patients avec une arthrite psoriasique avait révélé une association avec un de ces polymorphismes, mais aucune autre étude ne l'a confirmé par la suite [Nair et al., 2001, Borgiani et al., 2002, Rahman et al., 2003, Young et al., 2003, Giardina et al., 2004, Plant et al., 2004, Lascorz et al., 2005, Ho et al., 2005, Jenisch et al., 2006]. Suite à une étude anglaise sur des patients atteints de psoriasis, notre investigation est la deuxième étude à tester globalement le gène. En accord avec les autres analyses, aucune association n'est observée entre les variants prédisposant à la maladie de Crohn et au psoriasis. Cependant, une forte preuve d'association entre ce gène et la maladie est obtenue lors de l'analyse de nos familles, en fonction de *PSORS1*, en particulier avec deux SNPs présents dans la région 5'UTR et dans l'intron 2, dont le dernier est en fort DL avec un SNP codant non synonyme. De par leurs positions, ces SNPs pourraient modifier la régulation ou la fonction de la protéine *CARD15*, et par conséquent, être impliqués directement dans la pathogenèse de la maladie. Cependant, la seule autre analyse globale n'identifie aucune association avec le SNP codant ni avec le SNP de la région 5' [Plant et al., 2004].

Une seconde association est observée sur le chromosome 16, indépendante de la première, avec le gène *CYLD*. *CYLD* est un gène codant un suppresseur de tumeur qui a été montré muté dans le cas d'une maladie de peau, la cylindromatose familiale, caractérisée par la présence de multiples tumeurs cutanées bénignes [Bignell et al., 2000]. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore clairement identifiés, *CYLD*, une enzyme de déubiquitination, semble être une protéine inhibitrice pivot dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives [Reiley et al., 2007]. Lors de notre étude, les meilleures associations sont obtenues, de manière dépendante du locus *PSORS1*, pour différents SNPs dont en particulier un SNP présent à environ 10kb en aval de *CYLD*.

Pour l'ensemble de ces gènes, une association est donc identifiée avec certains

marqueurs de ces gènes. Cependant, même si certains pourraient être le variant causatif, nous ne pouvons exclure qu'ils sont en DL avec un autre variant de prédisposition au psoriasis. En effet, pour la plupart des gènes étudiés, l'analyse a été focalisée surtout sur le gène lui-même, et non sur les régions environnantes (promotrices). De plus, cette étude a surtout pris en compte les variants les plus communs ($MAF > 5\%$) en se basant sur l'existence d'un DL pour, dans un premier temps, identifier une association entre la maladie et un ou plusieurs gènes. L'association observée peut résulter d'un variant peu fréquent dans la population générale (donc non pris en compte dans notre analyse, qu'il soit connu ou non), mais fréquent chez les patients, en DL avec le marqueur trouvé associé.

Similairement à d'autres maladies complexes, plusieurs gènes pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie mais ils auraient des effets faibles ou spécifiques de certaines populations. Ainsi, le manque d'association avec certains des gènes pourrait être par exemple dû au biais créé par l'analyse dans le premier criblage d'un petit nombre de grandes familles (Lot I), où il est plus probable qu'un petit nombre de gènes de prédisposition à effet fort ségrégent. Pour certains gènes, seuls les variants montrés associés à d'autres maladies ont été étudiés dans notre analyse. Or, il est possible que ce soit le même gène qui soit impliqué dans plusieurs maladies mais pas les mêmes variants. Ainsi, le manque d'association peut être occasionné par l'étude de seulement certains marqueurs, sans faire une approche "TagSNPs", et par conséquent, l'association avec le gène sera manquée car ils ne sont pas en DL avec les variants causals possibles. Cette absence d'association pour certains gènes peut également amener à démentir les associations initialement trouvées dans d'autres populations. En effet, dans le cas des études sur les maladies complexes, de nombreux tests sont réalisés lors de la stratégie "gènes candidats", pouvant conduire à de nombreux résultats faux-positifs. La meilleure façon de confirmer l'implication d'un gène reste la preuve de son implication lors de différentes études indépendantes sur diverses populations.

Ainsi, la détection d'une association dépend de la stratégie employée. Même si certains gènes sont montrés associés au psoriasis dans la population française, il est important de pouvoir confirmer ces associations dans des échantillons plus grands provenant de différentes populations. Si l'association est confirmée, il est nécessaire d'identifier les variants causals et par la suite, de comprendre le rôle exact de ces facteurs génétiques dans l'étiologie du psoriasis. Ce travail va faire l'objet d'une publication et l'article soumis est intégré en annexe.

Chapitre 4

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis quelques années, le développement rapide des outils de la biologie moléculaire suivi de celle de la connaissance sur le vivant a permis d'identifier de nombreux gènes responsables de maladies mendéliennes. Cependant, dans le cas des maladies à hérédité complexe, il s'est avéré que l'identification des facteurs génétiques de risque était un réel challenge. A part l'identification de gènes majeurs (tels les gènes HLA pour de nombreuses maladies auto-immunes), peu de gènes ont pu être révélés par les méthodes utilisées pour l'étude de ces maladies avec des gènes à effet faible. La difficulté de la mise en évidence des gènes de prédisposition est résumée par la non-correspondance entre le génotype pour un gène donné et le phénotype. En effet, ces maladies "complexes" résultent de l'implication de nombreux facteurs génétiques et environnementaux, dont chacun peut contribuer au risque, souvent de manière mineure, sans être ni indispensable ni suffisant pour entraîner la maladie. Cela a donc conduit à adopter des stratégies et des méthodes différentes pour étudier ce type de maladie "complexe".

Mon travail de thèse a consisté à utiliser certaines de ces méthodes afin de rechercher les gènes de prédisposition à une maladie "complexe", le psoriasis. Le psoriasis est une maladie chronique et inflammatoire de la peau, caractérisée par des lésions érythémato-squameuses. La première étape était de caractériser les loci de prédisposition au psoriasis par l'analyse de deux criblages du génome, réalisés sur 45 grandes familles françaises. Cette étude a permis de confirmer les régions précédemment révélées lors d'une étude initiale sur 14 d'entre elles, telles que les régions 6p21, 14q, 16p, 20p, et de révéler une nouvelle région en 12q. La deuxième étape était d'identifier les gènes impliqués dans le psoriasis, présents

dans deux des loci de prédisposition au psoriasis trouvés lors du criblage des grandes familles, le chromosome 6p21 et 20p. Des études d'association au sein de ces régions ont permis de confirmer la contribution du gène *HLA-C* pour le locus majeur *PSORS1* et d'identifier un nouveau gène de prédisposition au psoriasis, *ADAM33* en 20p. La dernière étape était de confirmer et de découvrir d'autres facteurs génétiques de la maladie, par des études "gènes candidats" en prenant en compte la structure DL locale. Ces études ont aidé à la confirmation du gène *SLC12A8* dans l'étiologie du psoriasis ainsi qu'à la suggestion de l'implication de 4 autres gènes, deux codant des protéines épidermiques (*FLG* et *TGM5*) et deux codant des protéines modulatrices d'un facteur de transcription impliqué dans l'immunité (*CARD15* et *CYLD*). Ces résultats doivent cependant être confirmés par d'autres études indépendantes, sur d'autres populations et de plus grandes tailles. Si ces associations se confirment, les mutations en cause restent à être identifiées.

La caractérisation finale des gènes de prédisposition peut permettre une meilleure compréhension des voies impliquées et donc des mécanismes physiopathologiques à l'origine du psoriasis. Cependant, le psoriasis reste une "maladie complexe" qui, par définition, est la résultante d'interactions de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux. Dans notre étude, seuls les facteurs génétiques ont été recherchés. L'effet de certains facteurs environnementaux est cependant limité par l'analyse dans notre étude de grandes familles, ayant la même provenance géographique et historique. Néanmoins, différents facteurs du milieu, concernant l'individu lui-même, ne sont pas pris en compte lors de ces études. De plus, notre étude ne prend pas en compte la complexité de ce type de maladie, en partie due à l'existence d'interaction entre les nombreux facteurs génétiques ou non. La considération de ces interactions (gène-gène et gène-environnement) dans les études permettrait de découvrir d'autres facteurs génétiques et, au final, de mieux comprendre la physiopathologie réelle de la maladie.

L'étape finale, et non la moindre, est la confirmation par des études fonctionnelles de l'implication des gènes dans la maladie, et par l'identification des variants causals. La détermination des variants causals reste à l'heure actuelle laborieuse. Dans la plupart des études, une association est obtenue entre la maladie et un ou des variant(s) neutre(s), c'est-à-dire, des variants n'ayant aucune conséquence *a priori* sur la protéine correspondante. L'existence de "blocs" génomiques en déséquilibre de liaison permet de déduire que ce variant associé est sûrement en DL avec le variant causal, si il y en a qu'un seul. La nature du variant causal reste à être identifiée. Nos études ont identifiées des associations avec certains des gènes testés, mais peu de ces variants correspondants sont susceptibles d'avoir un effet, même faible dans la fonction de la protéine associée. Dans la plupart des

cas, les études ont été réalisées sur la partie codante des gènes. Il n'est donc pas improbable que le variant associé soit en DL avec un variant "fonctionnel", dans la partie promotrice du gène par exemple.

Ce raisonnement reste néanmoins traditionnel. Récemment, d'autres types de variants ont été observés à avoir une influence sur la susceptibilité à la maladie. Ce sont par exemple des régions génomiques et non pas seulement des polymorphismes géniques, variables en nombre de copies (nommées "CNV", Copy Number Variants). Les CNV sont des segments génomiques (100kb et plus) présents sous forme de multiples copies, dont le nombre varie selon les individus. Une étude récente a d'ailleurs montrée une forte association entre un CNV élevé pour les gènes des bêta-défensines et le psoriasis [Hollox et al., 2008]. L'ensemble de ces variants sont cependant des changements au niveau des séquences nucléotides. Il existe aussi des modifications épigénétiques qui pourraient intervenir dans la maladie, en modifiant l'expression des gènes. De tels changements sont d'ailleurs associés à la cancérogenèse, notamment des méthylations supplémentaires de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG et des modifications post-traductionnelles des histones [Feinberg and Tycko, 2004].

Dans tous ces cas, les études fonctionnelles sont nécessaires pour confirmer l'impact du variant en question sur la fonction de la protéine correspondante, en étudiant par exemple la différence du niveau d'expression génique en présence ou non du variant. Ces études peuvent permettre également de comprendre le rôle de manière plus globale de la protéine correspondante, surtout si sa fonction est peu connue, et d'identifier les partenaires protéiques, pouvant aussi avoir un rôle dans le processus pathogénique. Il ne faut pas en effet omettre que ce type de maladie fait intervenir de nombreux facteurs et que la régulation de ces facteurs peut se faire à tout niveau : niveau transcriptionnel, traductionnel ou post-traductionnel.

La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans le psoriasis permettrait d'améliorer le diagnostic, de définir plus facilement un pronostic et de développer des traitements plus appropriés (adaptés en fonction du patient) et plus efficaces, limitant également les effets secondaires souvent observés. En raison de la fréquence élevée du psoriasis dans la population générale, des retombées importantes sur le plan de la santé publique en découleront.

ANNEXES

A. Schémas de la localisation et de la structure des gènes ainsi que de la position des TagSNPs étudiés

Afin de bien lire les différents schémas, voici les légendes les plus importantes :

- les exons sont représentés par des rectangles et les introns par des lignes.
- la partie traduite des exons est en noir
- la partie non traduite des exons est en rouge
- la position d'un TagSNP est indiquée par une flèche.
- les TagSNPs non analysés, pour des raisons techniques, sont indiqués en caractères gras.

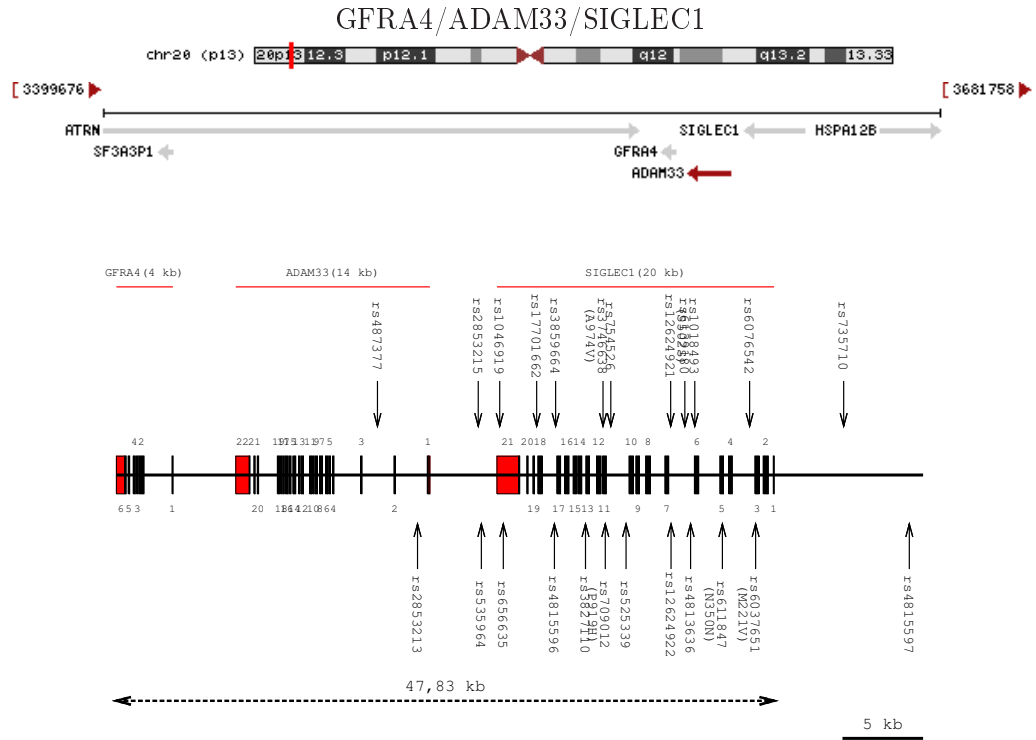
Les schémas sont de : page 238–page 248

B. Structure DL des gènes *CYLD*, *SLC12A8* et *FLG*

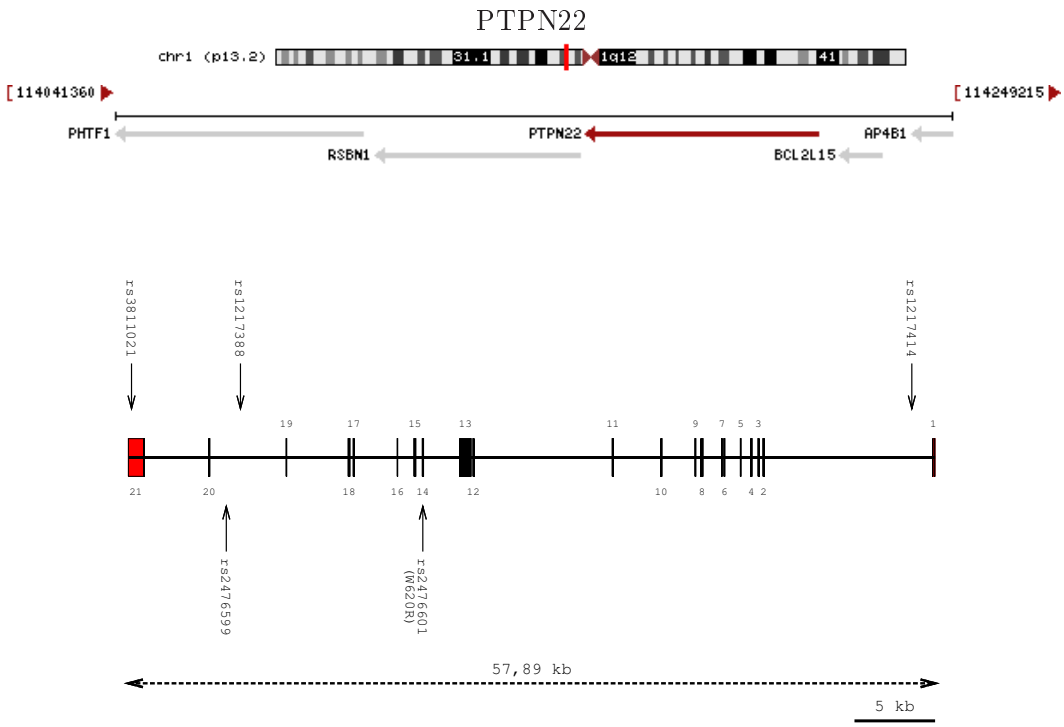
Les Structures sont de : page 249–page 251

C. Article soumis :

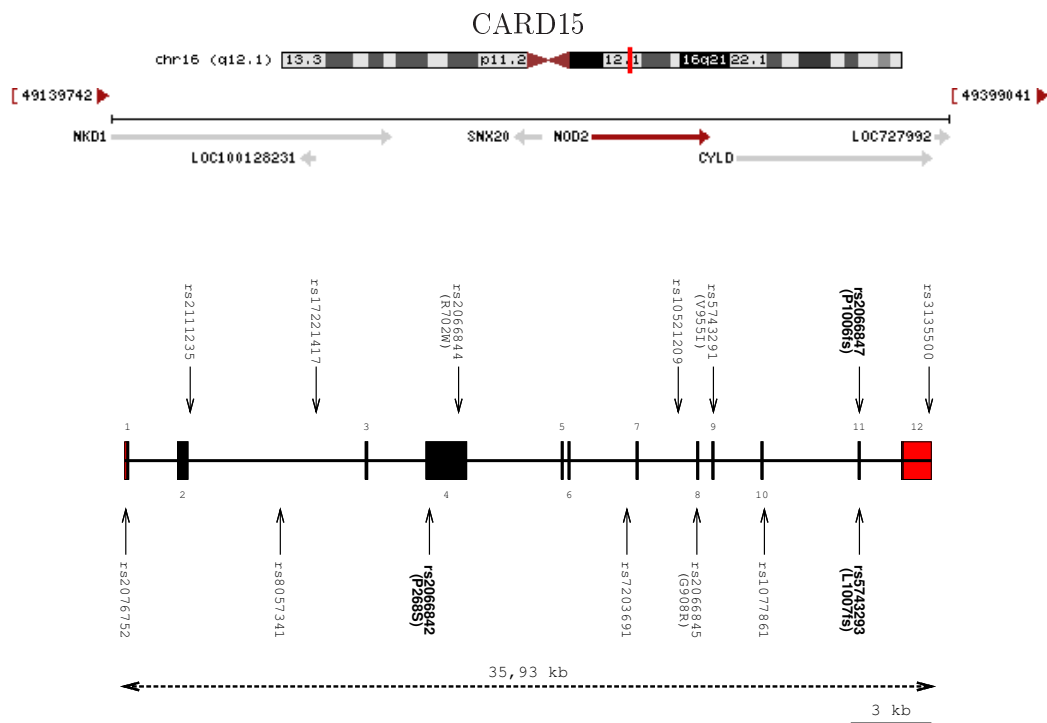
ASSOCIATION STUDY OF 22 CANDIDATE GENES IN PSORIASIS : EVIDENCE FOR SHARED GENETIC FACTORS FOR SKIN OR AUTOIMMUNE DISEASES AND PSORIASIS : page 252



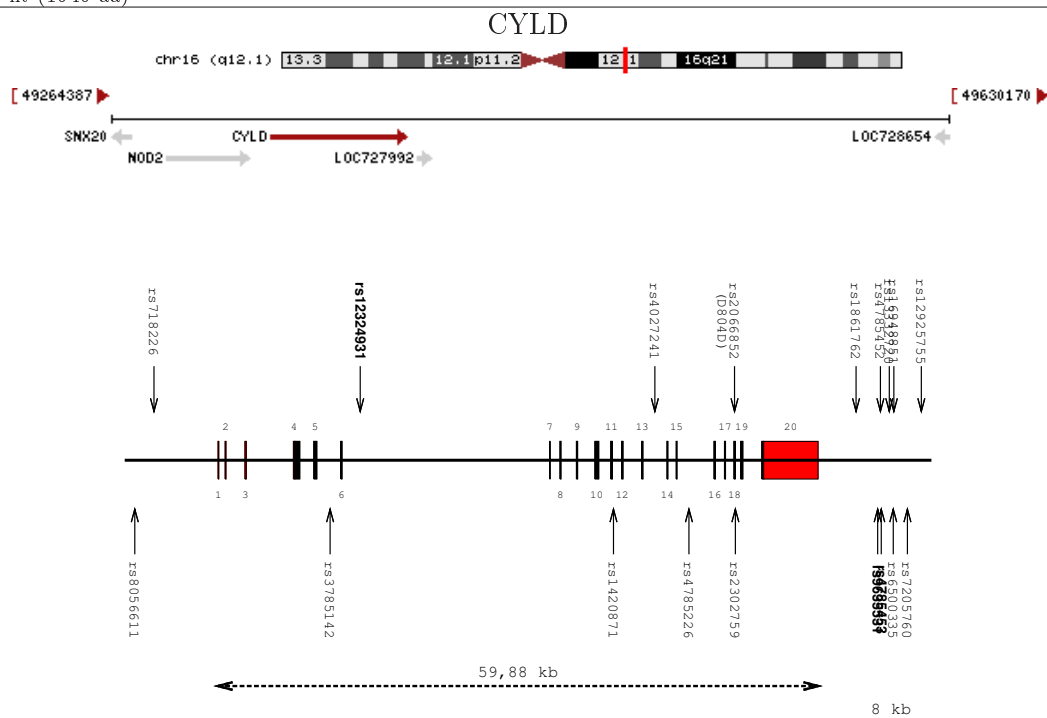
GFRA4 : NT_011387/NM_022139 [810 nt (269 aa)]
 ADAM33 : NT_011387/NM_025220 [2442 nt (813 aa)]
 SIGLEC1 : NT_011387/NM_023068 [5130 nt (1709 aa)]



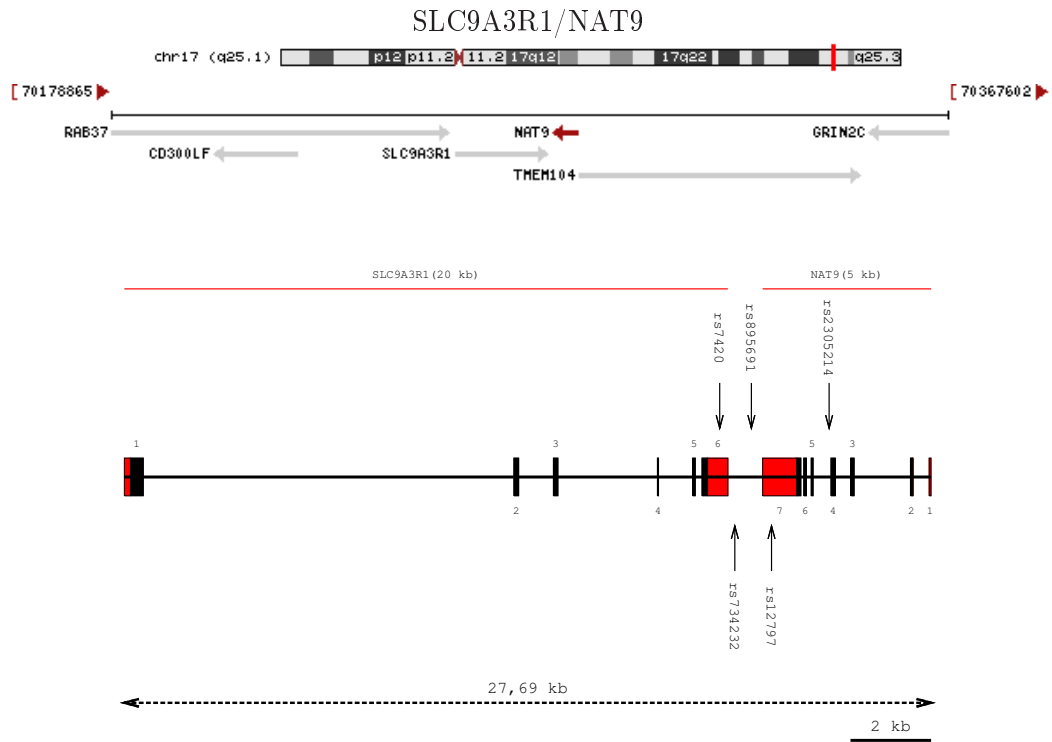
NT_019273/NM_015967
 2424nt (807 aa)



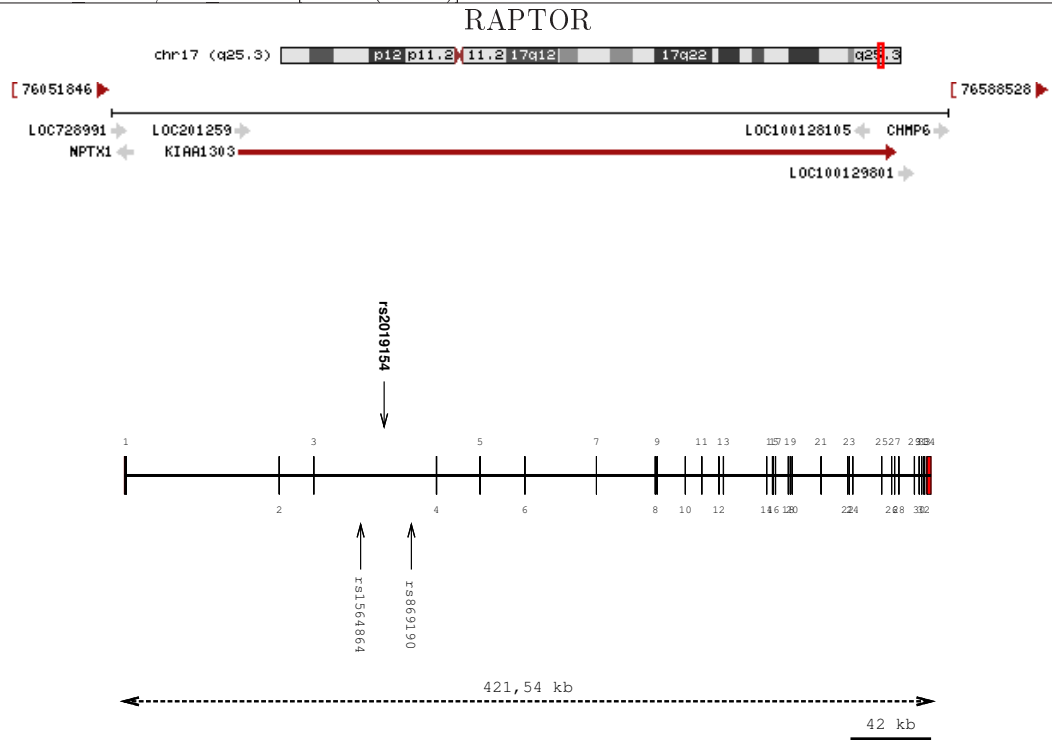
NT_010498/NM_022162
3123 nt (1040 aa)



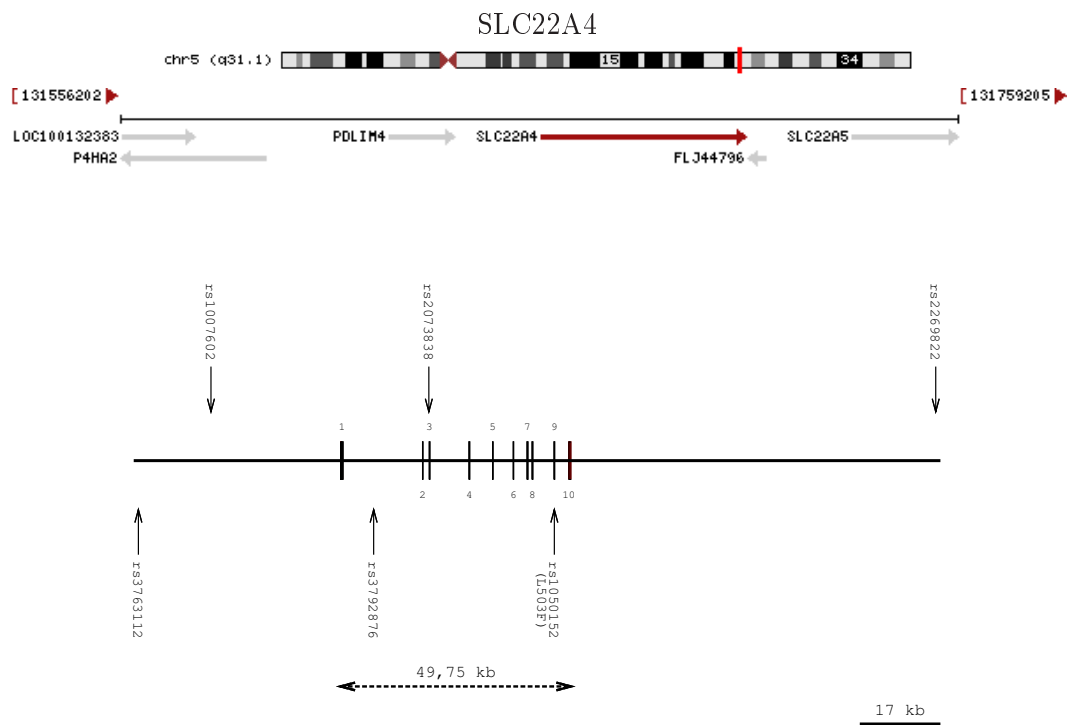
NT_010498.15/NM_015247
2862 nt (953 aa)



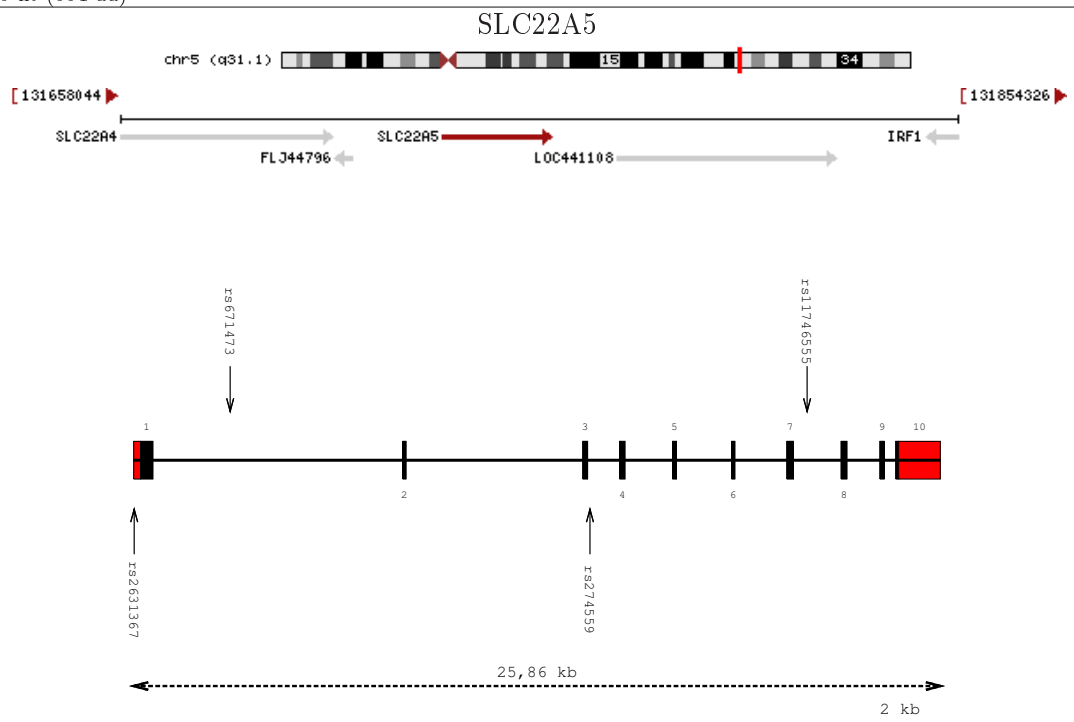
SLC9A3R1 : NT_010641/NM_004252 [1077 nt (358 aa)]
 NAT9 : NT_010641/NM_015654 [624 nt (207 aa)]



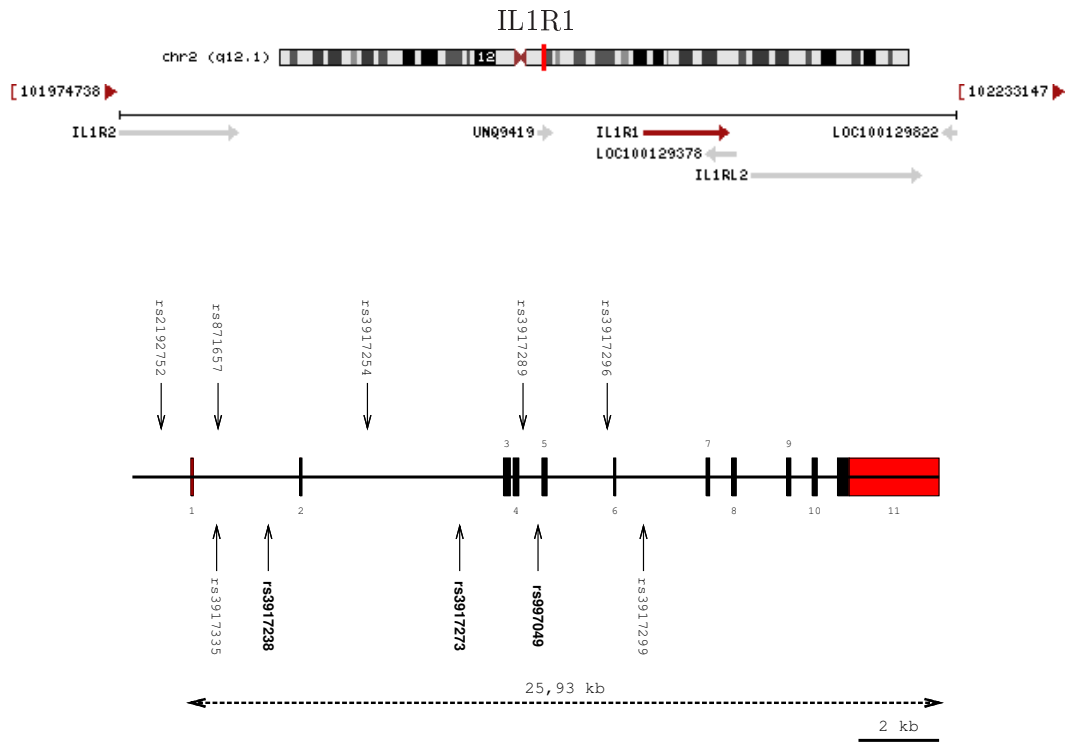
NT_024871/NM_020761
 4008 nt (1335 aa)



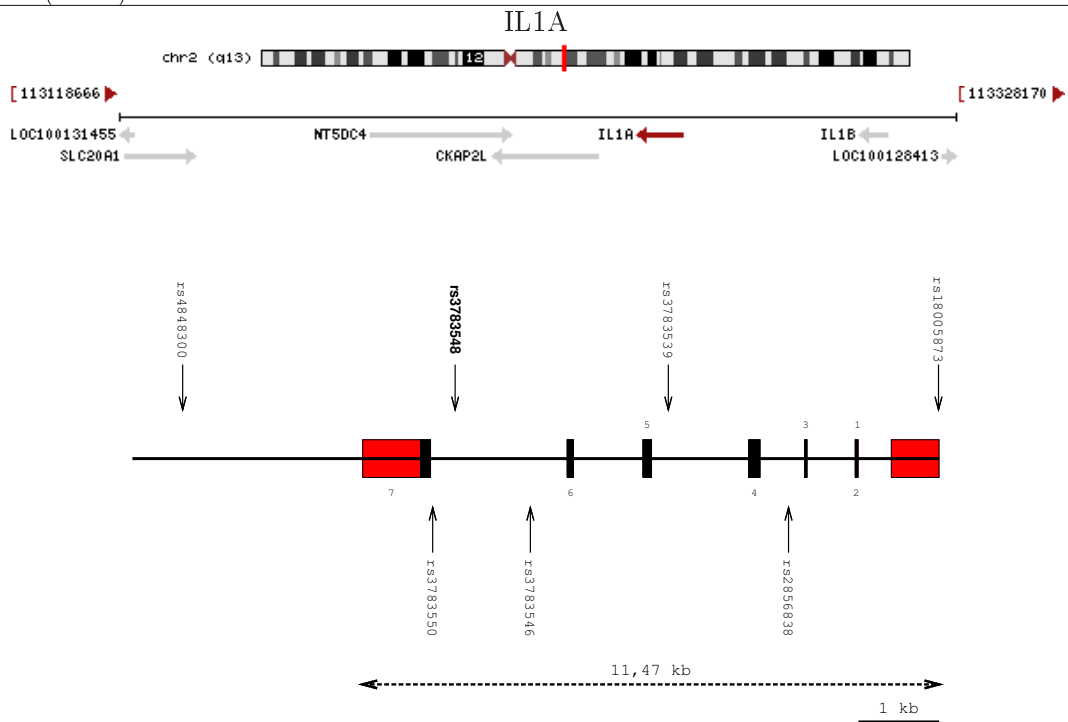
NT_034772.5 / NM_003059
1656 nt (551 aa)



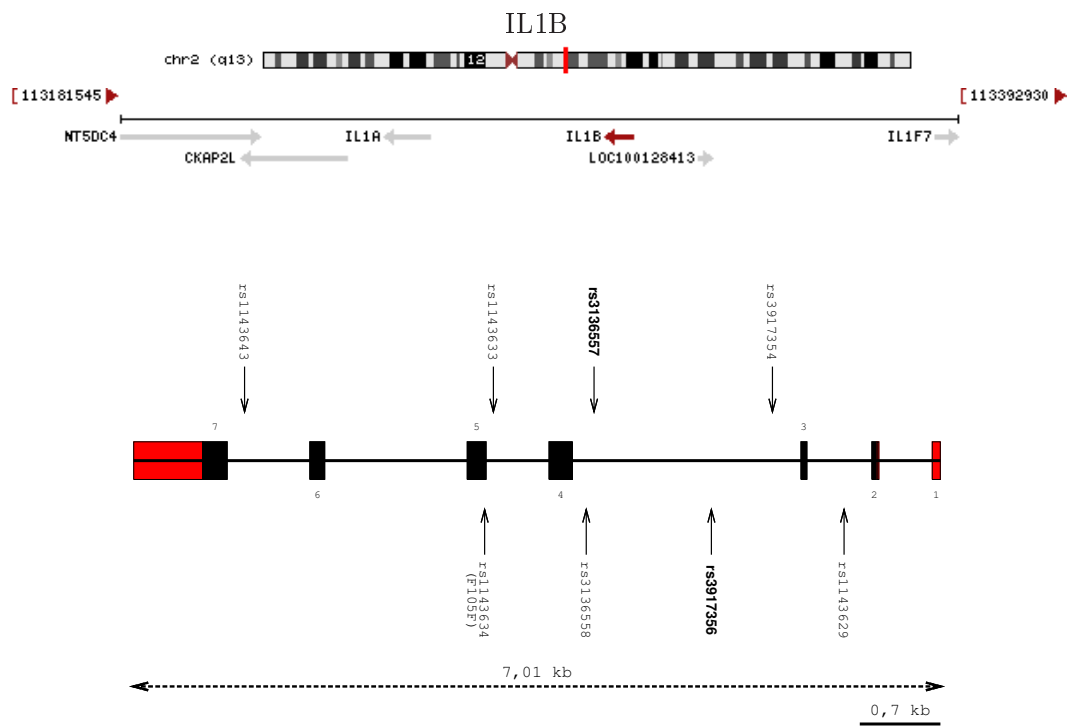
NT_034772.5/NM_003060
1674 nt (557 aa)



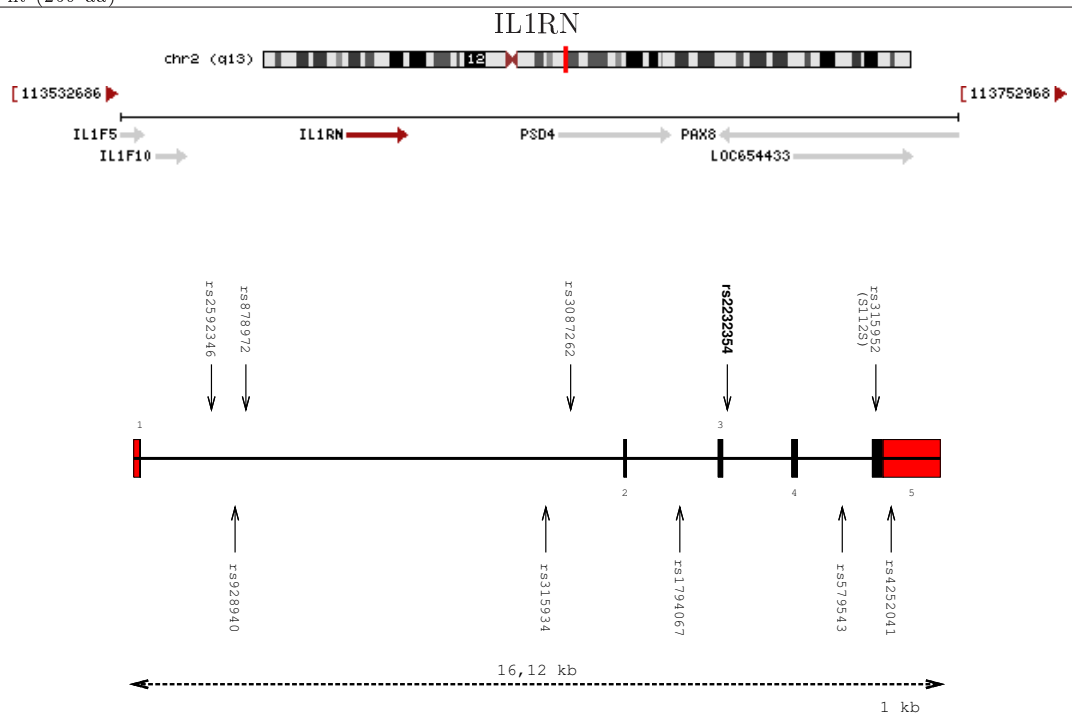
NT_022171/NM_000877
1710 nt (569 aa)



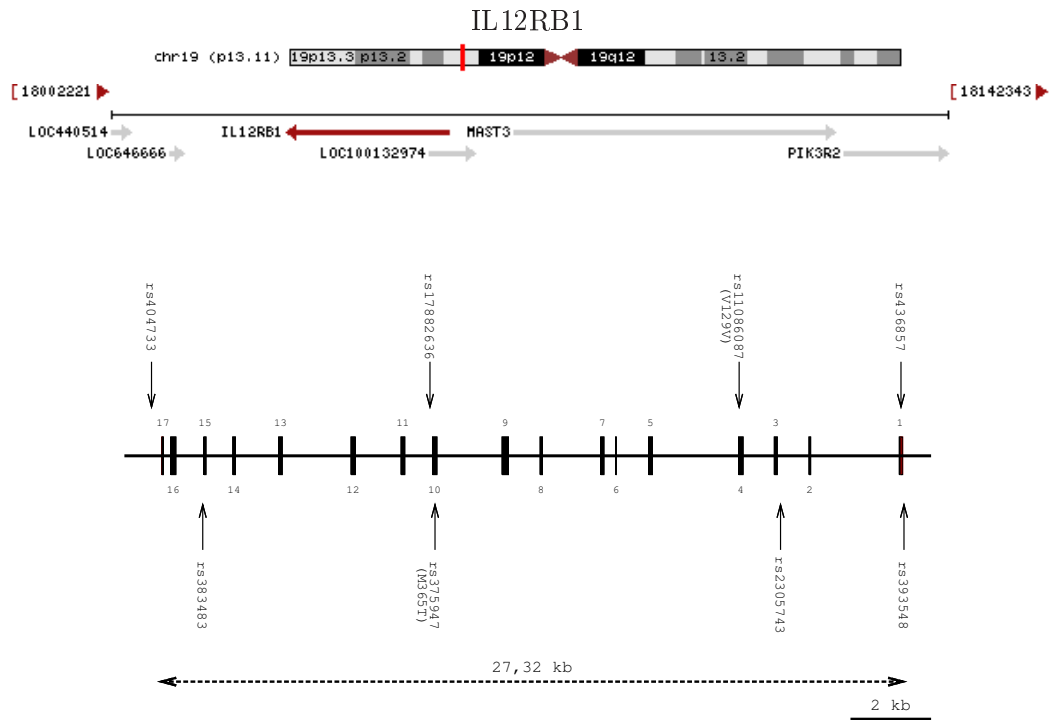
NT_022135/NM_000575
816 nt (271 aa)



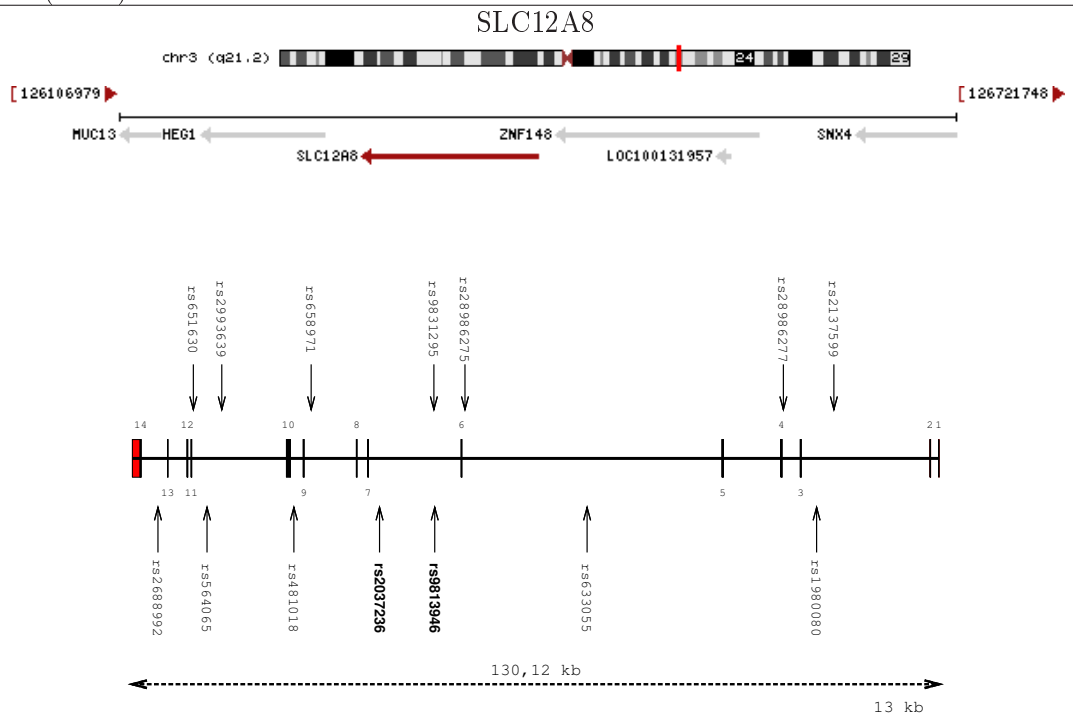
NT022135.15/ NM_000576
810 nt (269 aa)



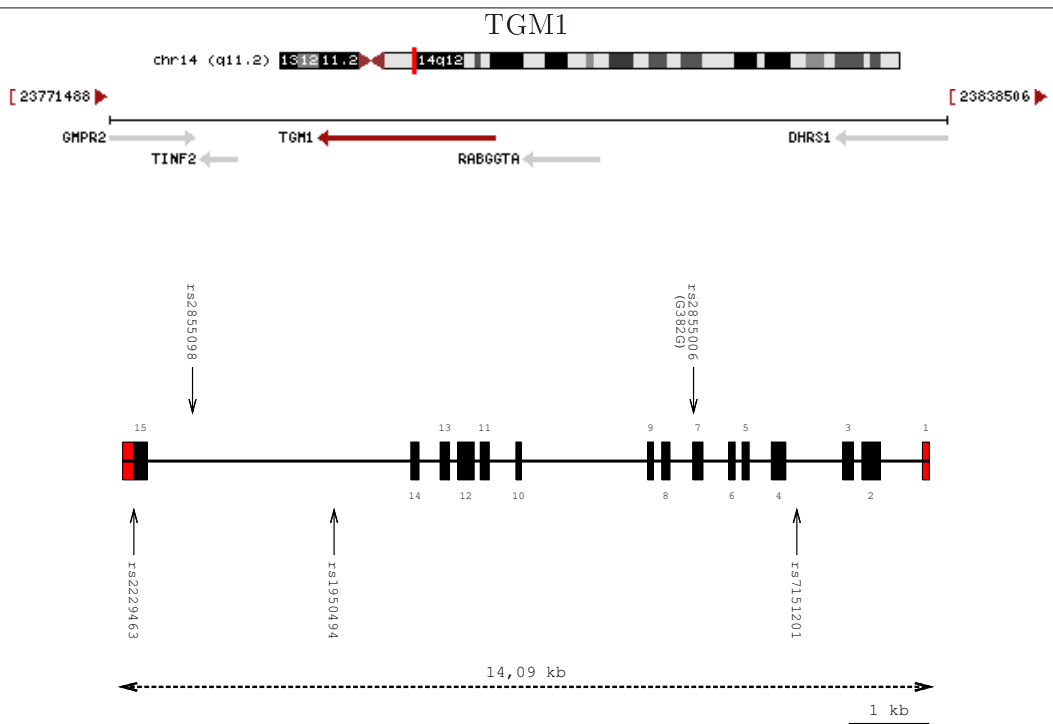
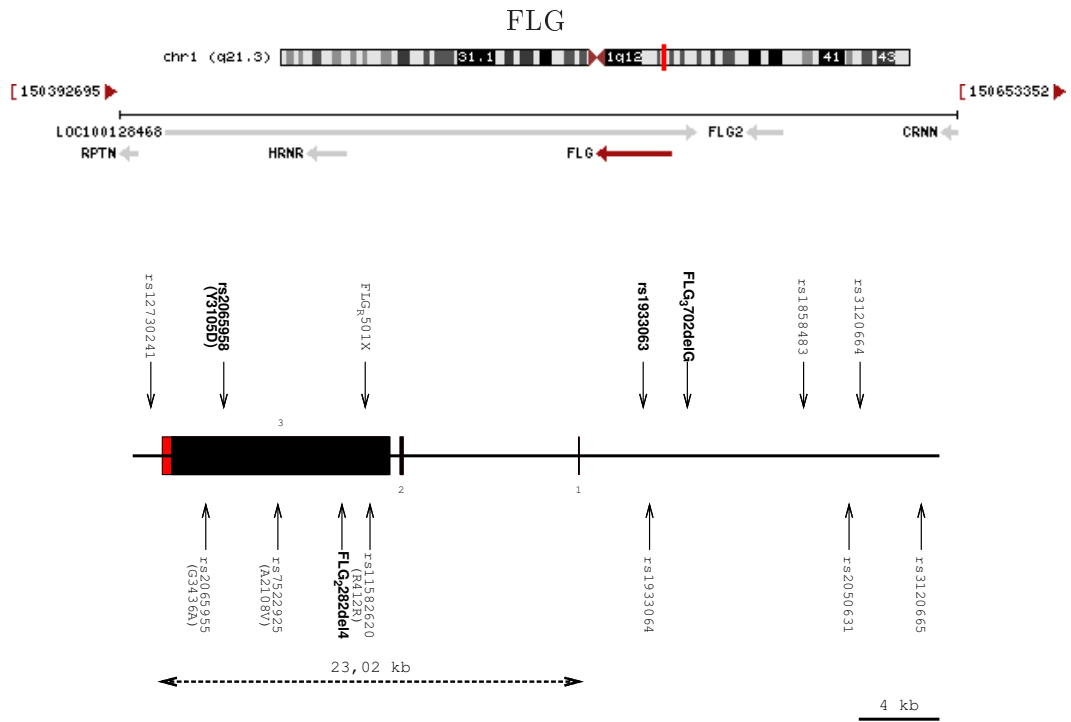
NT_022135/NM_000577
480 nt (159 aa)



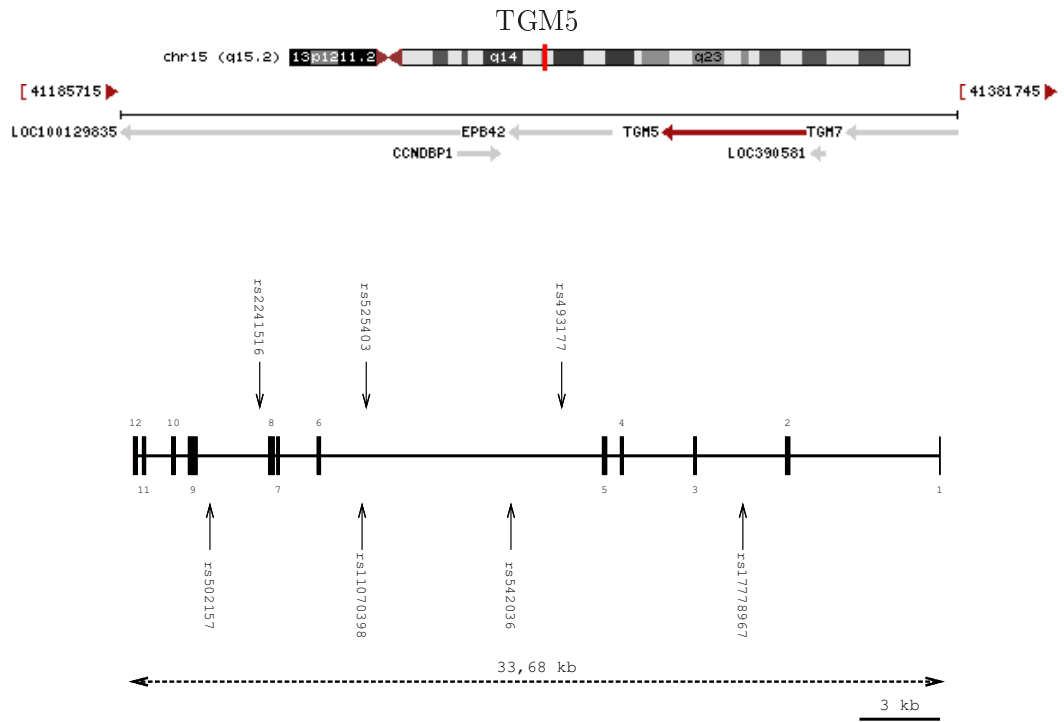
NT_011295/NM_005535
1989 nt (662 aa)



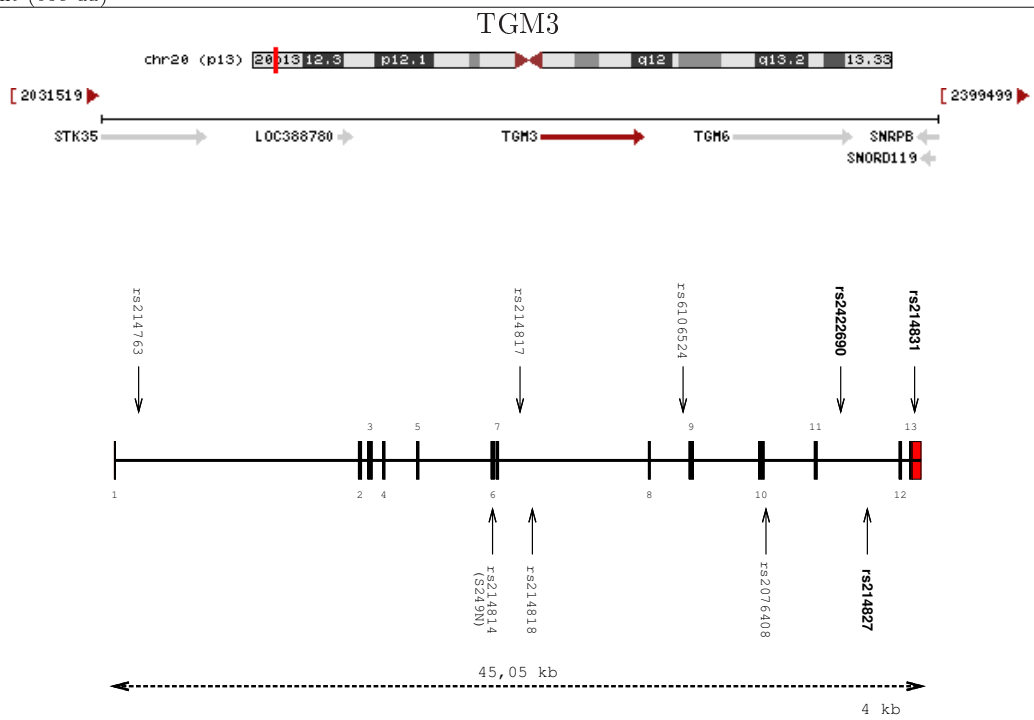
NT_005612/ NM_024628
2145 nt (714 aa)



NT_026437/NM_000359
2454 nt (817 aa)

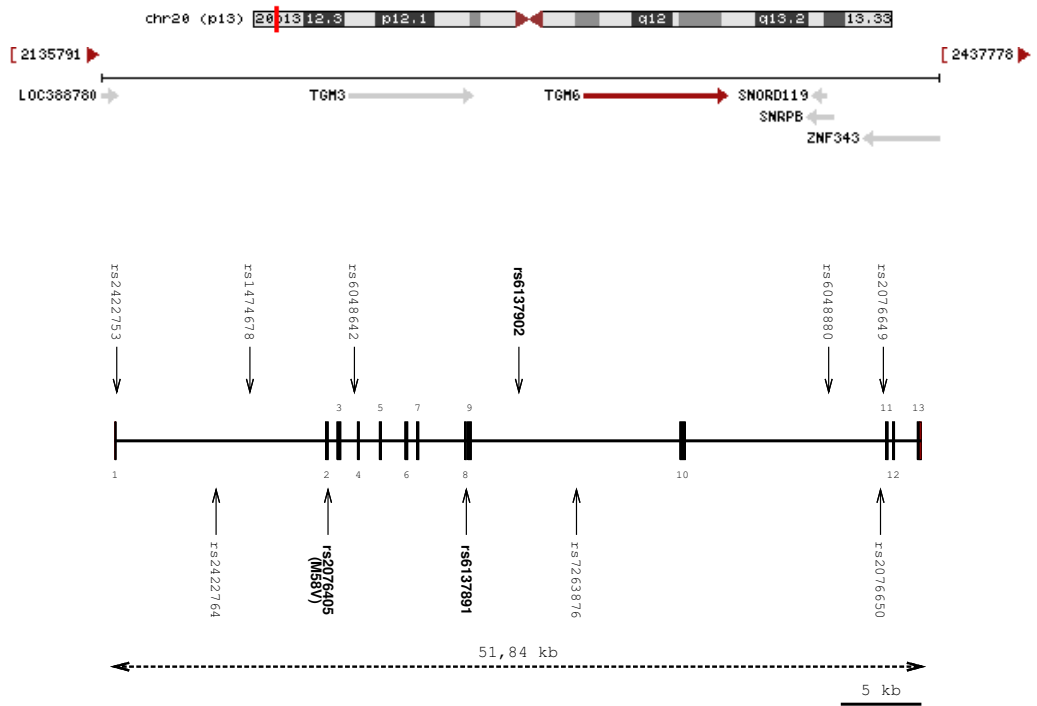


NT_010194/NM_004245
1917 nt (638 aa)



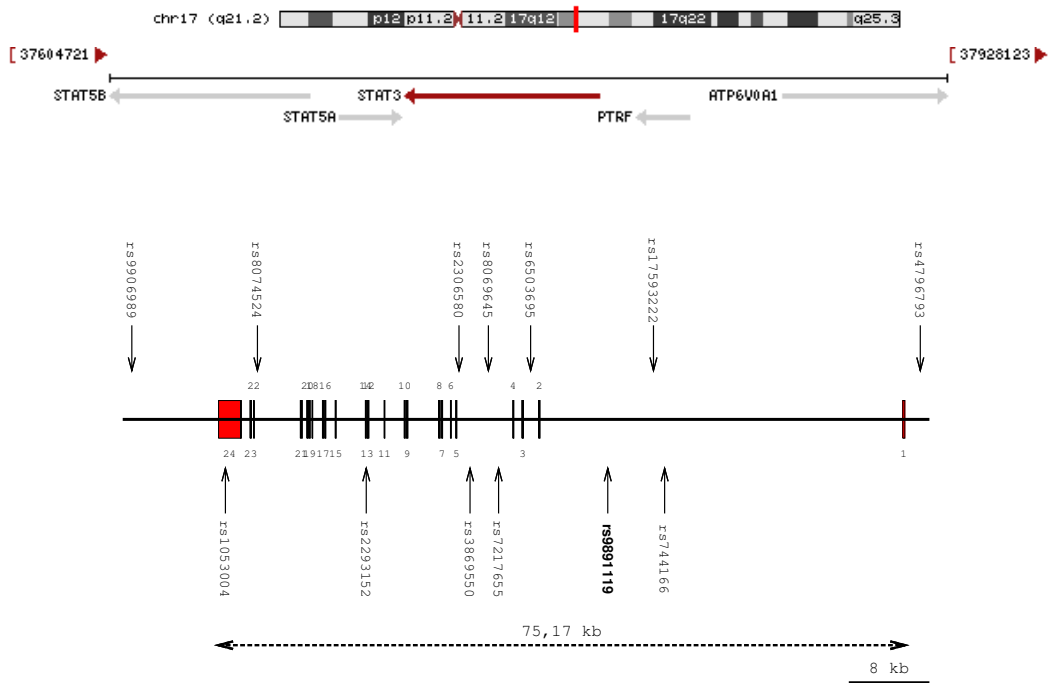
NT_011387.8/NM_003245
2082 nt (693 aa)

TGM6

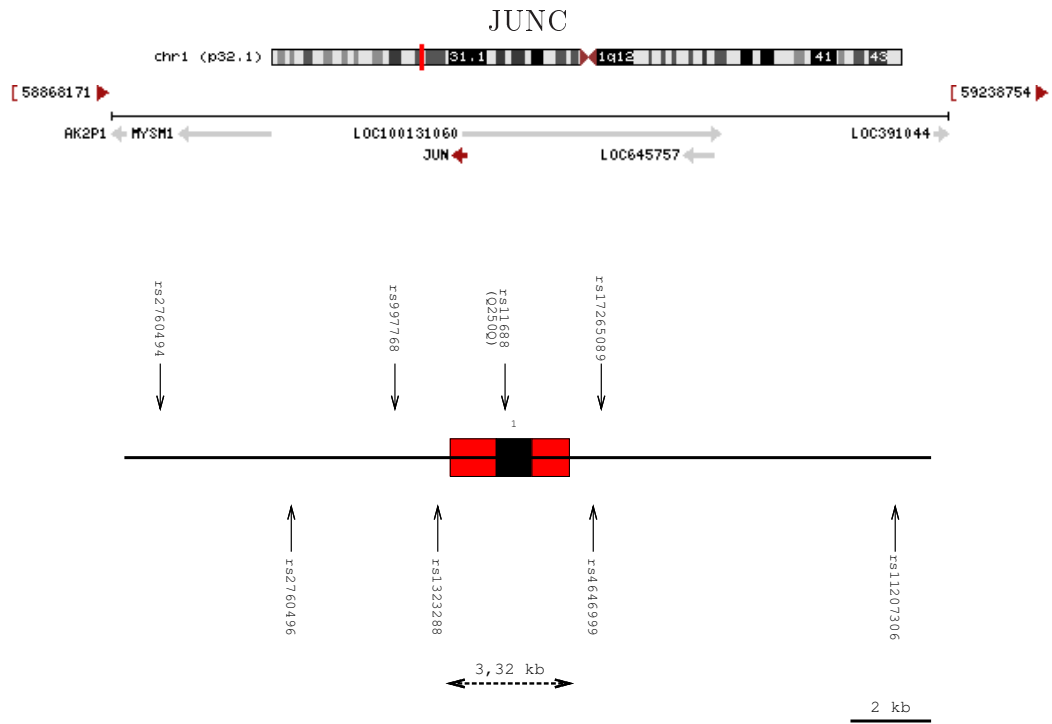


NT011387.8/ NM_198994
2121 nt (706 aa)

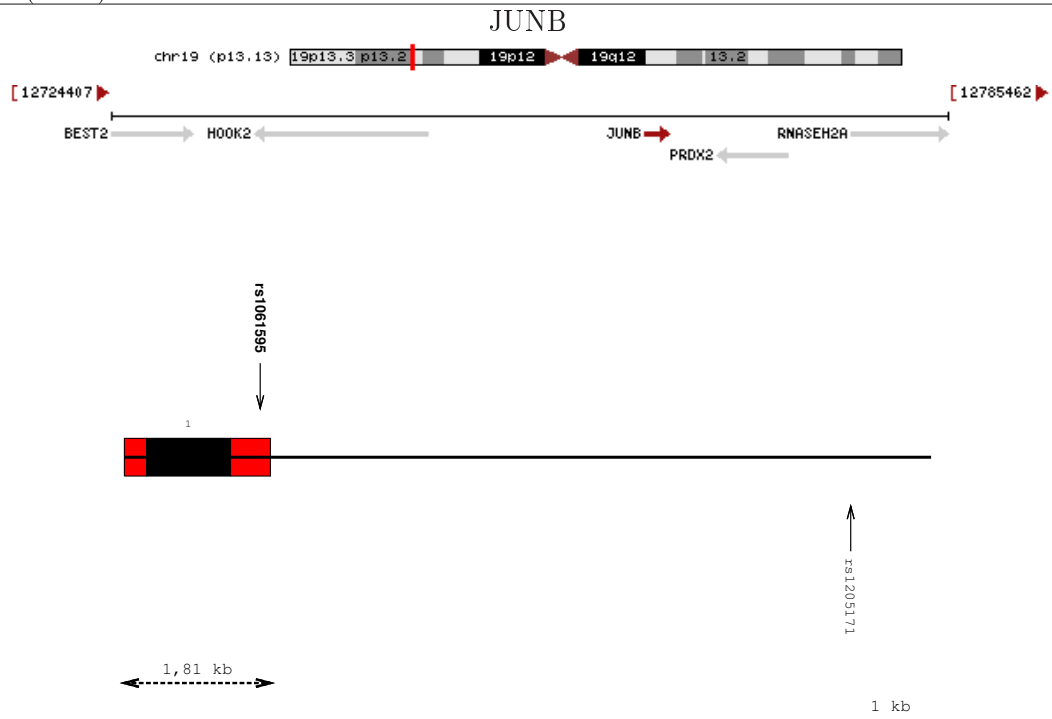
STAT3



NT_010755/ NM_003150
2310 nt (769 aa)



NT_032977.8/NM_002228
996 nt (331 aa)



NT_011295.10/NM_002229
1044 nt (347 aa)

FIG. 4.1: Structure DL du gène *CYLD*

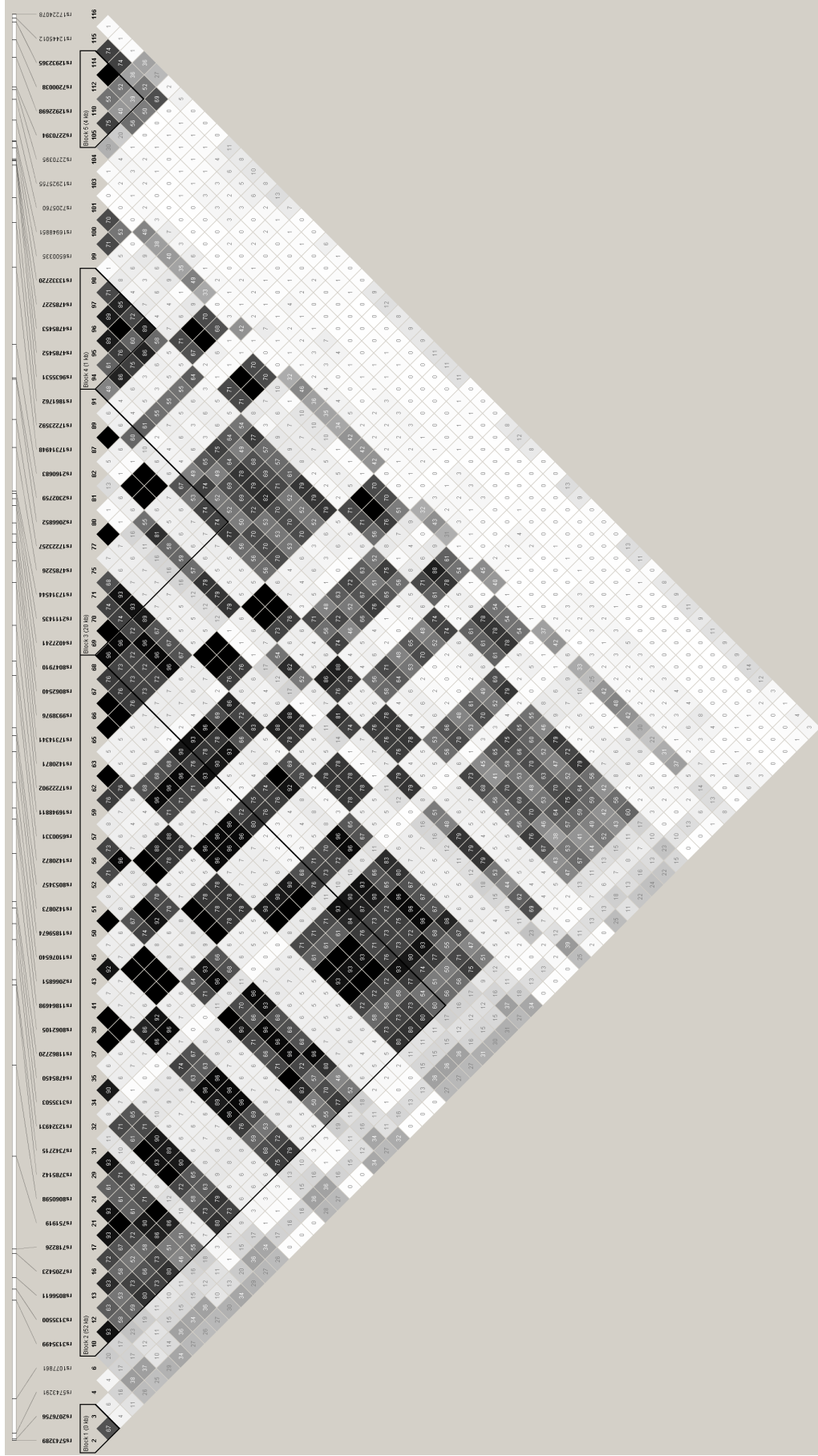


FIG. 4.2: Structure DL du gène *SLC12A8*

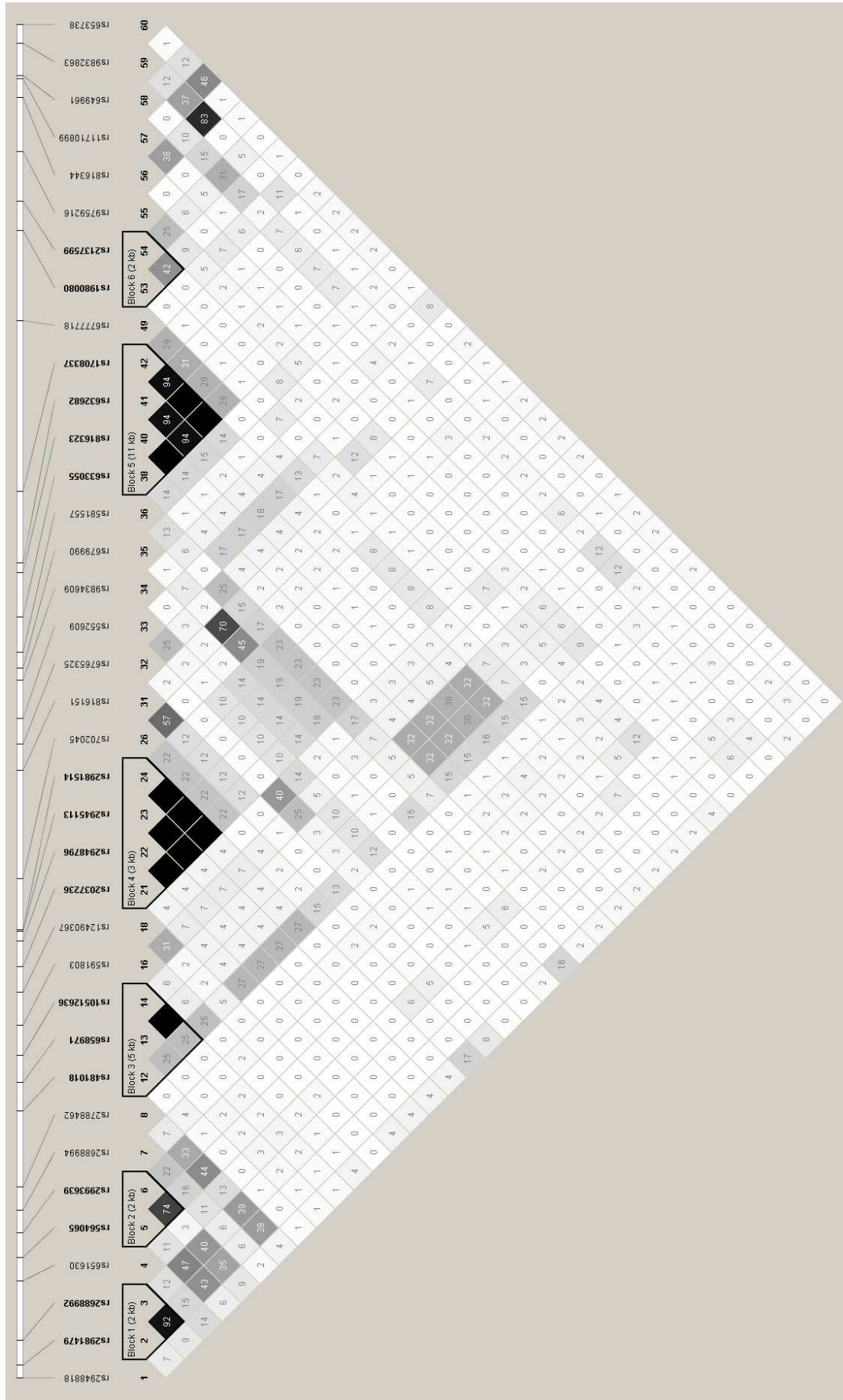
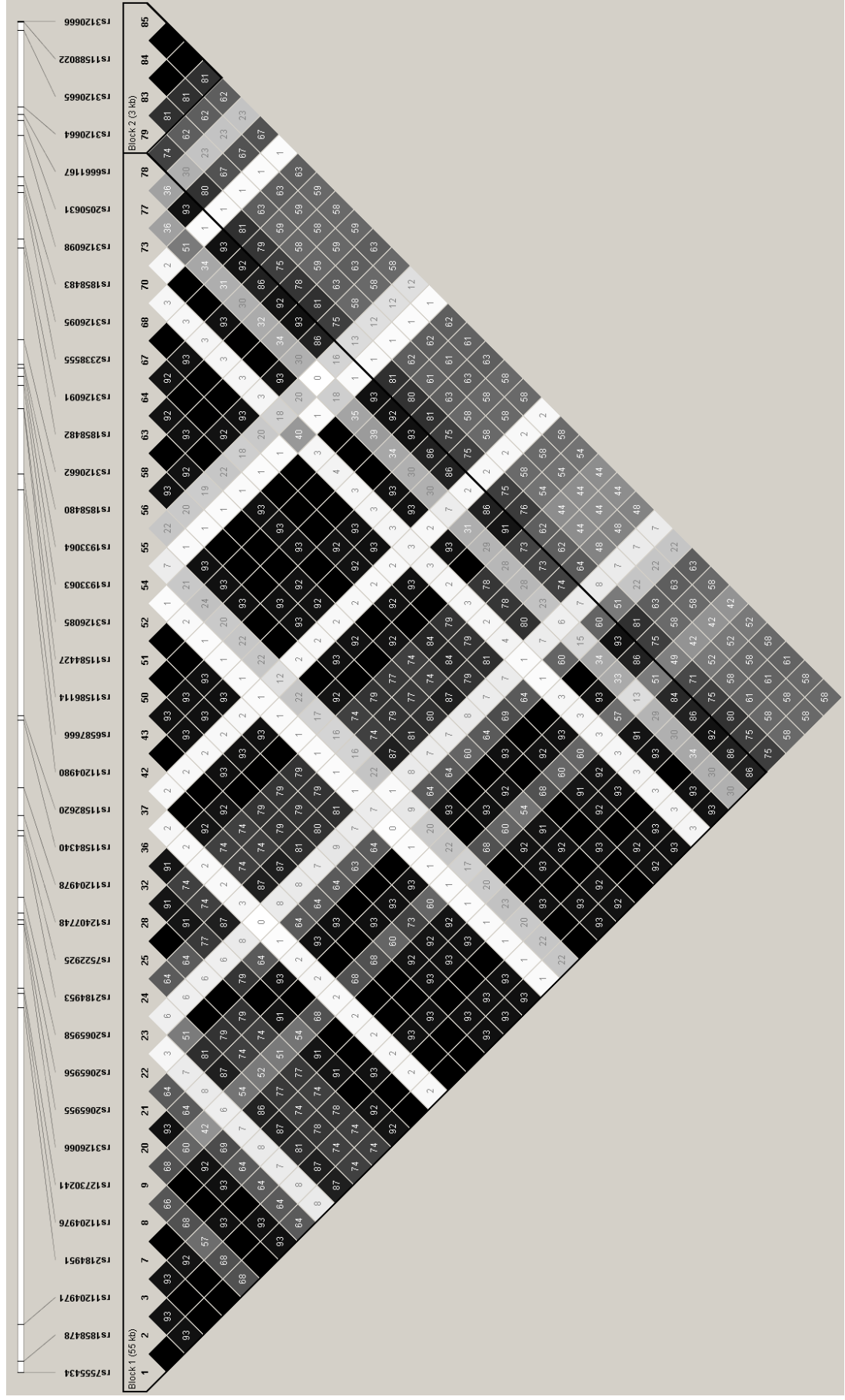


FIG. 4.3: Structure DL du gène *FLG*



ASSOCIATION STUDY OF 22 CANDIDATE GENES IN PSORIASIS: EVIDENCE FOR SHARED GENETIC FACTORS FOR SKIN OR AUTOIMMUNE DISEASES AND PSORIASIS

Tiphaine Oudot¹, Fabienne Lesueur^{1,2}, Mickaël Guedj³, Rafael de Cid¹, Steven McGinn¹, Simon Heath¹, Mario Foglio¹, Bernard Prum³, Mark Lathrop¹, Jean-François Prud'homme⁴, Judith Fischer¹

¹CEA, Institut de Génomique, Centre National de Génotypage, Evry, France, ²Genetic Susceptibility Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, ³Laboratoire Statistique et Génome, UMR CNRS 8071, INRA 152, Université d'Evry, ⁴Généthon, Evry, France

Correspondence: Judith Fischer, CEA, Institut de Génomique, Centre National de Génotypage, 2, rue Gaston Crémieux, 91057 Evry cedex, France. E-mail: fischer@cng.fr

Running title: Shared genetic factors in psoriasis and autoimmune and skin disorders

Key words: Psoriasis, autoimmune disease, SNP, association, linkage disequilibrium, haplotype

ABSTRACT

Psoriasis is a common inflammatory and hyperproliferative skin disease. Recent studies have reported that common genetic factors may underlie skin and immune-mediated disorders. We hypothesized that such genes may be involved in susceptibility to psoriasis, and undertook association analysis of 22 candidate genes in 45 large French psoriasis families using a comprehensive SNP tagging approach. SNPs that had previously been associated with psoriasis were also tested in our sample set. A total of 153 SNPs were genotyped, and transmission of alleles in nuclear families was analyzed using FBAT (Family-Based Association Test) and two additional methods, LNM (Logistic-Normal Models) and MQLS (Modified Quasi-likelihood Score), which are more powerful since they consider the whole pedigree structure information of families. Markers for which significant associations were found were further evaluated in a replication set of 81 families. Our study confirmed the involvement of seven candidate genes in psoriasis susceptibility: *SCL12A8* and *SLC22A5* which are both members of the solute carrier gene family, *FLG* and *TGM5* which are involved in epidermal differentiation, *CARD15* and *CYLD*, which modulate the transcription factor NF- κ B, and *IL1RN* which is an interleukin receptor antagonist. Furthermore, there was strong evidence for interaction between the major risk allele *HLA-Cw6* and *CARD15*, *CYLD* and

TGM5 susceptibility alleles. Our data show that shared genetic factors may contribute to the aetiology of both psoriasis and other immune-mediated disorders.

INTRODUCTION

Psoriasis [MIM 177900] is a hyperproliferative and chronic inflammatory skin disease that affects approximately 2% of the world population (Griffiths *et al.*, 2004) and up to 4% of the Caucasian population (Nevitt and Hutchinson, 1996). Red scaly plaques, generally occurring on the elbows, knees, scalp and lower back, characterize the most common form of psoriasis, known as *psoriasis vulgaris*. This disease is caused by abnormal proliferation and differentiation of epidermal keratinocytes and also by the infiltration of inflammatory cells within the lesions, in particular the activated T cells (Gottlieb *et al.*, 1991; Menter, 1998; Prinz, 2003). Psoriasis is a multifactorial disease due to genetic and environmental risk factors. Studies of twins and families affected by psoriasis have provided strong evidence for a genetic component in the development of the disease. For instance, twin studies report a higher concordance rate of psoriasis in monozygotic twins (65-72%) than in dizygotic twins (15-30%) (Bowcock and Cookson, 2004), and family studies have estimated the heritability for psoriasis to be between 60 and 90% (Elder *et al.*, 1994).

Psoriasis is considered to be an autoimmune disease, due to an overactive immune response against self-antigens involving both humoral and cellular immune systems. The pathophysiological overlaps between diverse autoimmune diseases and the co-occurrence of some of them in some families suggest the existence of common aetiological mechanisms, and notably a shared genetic background. For instance, psoriasis *vulgaris* has been found to occur together with other inflammatory diseases, such as psoriatic arthritis (PsA) in 10-40% of patients (Natl. Psoriasis Found. Bull., 2002; Gladman, 1994) or Crohn's disease (CD) (Lee *et al.*, 1990; Yates *et al.*, 1982). To identify the genetic basis of immune disorders, several genome-wide linkage studies have been undertaken, which have shown non-random clustering of susceptibility loci for these diseases, notably the human leucocyte antigen (HLA) region on chromosome 6p21 (Yamada and Yamamoto, 2005).

Concerning susceptibility to psoriasis, the 6p21 locus, referred to as *PSORS1*, is the most replicable between linkage studies (Nair *et al.*, 1997; Trembath *et al.*, 1997; Samuelsson *et al.*, 1999; Enlund *et al.*, 1999a; Veal *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Sagoo *et al.*, 2004; Lesueur *et al.*, 2007a). Association studies have narrowed this region to a 300 kb interval (Hewett *et al.*, 2002; Veal *et al.*, 2002; Lench *et al.*, 2005; Helms *et al.*, 2005; Nair *et al.*,

2006), and identified *HLA-Cw6* as a major disease allele (Nair *et al.*, 2006; Elder, 2006). However, *HLA-Cw6* contributes to the familial clustering of disease (λ) to $33 < \lambda < 50\%$ (Trembath *et al.*, 1997; The International Psoriasis Genetics Study, 2003), indicating that other susceptibility genes are likely to exist. Genome-wide linkage scans for psoriasis have highlighted potential susceptibility regions on at least 15 chromosomes (Bowcock and Cookson, 2004; Lesueur *et al.*, 2007a). Some of these regions have also been reported to harbour loci for other autoimmune diseases. For instance, 1q21, 3q21, 17q25, 20p12 are also linked to atopic dermatitis (AD), 5q31 is linked to rheumatoid arthritis (RA), AD and asthma, 16q12 is linked to PsA, systemic lupus erythematosus (SLE) and CD and finally, 1p13 is linked to type I diabetes mellitus (T1D), RA, SLE and Graves disease (GD) (Cookson *et al.*, 2001; Yamada and Yamamoto, 2005; Bowcock, 2005; Lee *et al.*, 2007). However, only a few susceptibility genes have been identified to date in these regions, such as *LOR* at 1q21 (Giardina *et al.*, 2006) and *ADAM33* on 20p13 (Lesueur *et al.*, 2007b). As in other complex disorders, the difficulty in identifying genes which predispose to psoriasis by linkage studies might be due to the involvement of several low-penetrance genes, which may interact with each other, with the major gene *HLA-C* or with environmental factors. In an effort to address this question, we chose to evaluate a list of 22 relevant candidate genes selected from the literature in a set of 45 extended French families in which previous genome-wide scans had failed to detect any evidence of linkage to these regions (Lesueur *et al.*, 2007a).

Since psoriasis is an immune mediated-disorder, a first group of eligible genes was selected for implication in immune system regulation pathways, and in particular, in pathways of T-cell development, spontaneous activation or proliferation such as *CARD15*, *CYLD*, *SLC22A4*, *SLC9A3R1/NAT9* and *RAPTOR* (Hugot *et al.*, 2001; Reiley *et al.*, 2007; Tokuhiko *et al.*, 2003; Helms *et al.*, 2003; Speckman *et al.*, 2003). A second group of genes was selected for involvement in immune synapse formation (such as *PTPN22* and *SLC9A3R1*), in solute transport (*SLC22A4* and *SLC22A5*) and in inflammatory processes, such as genes encoding cytokines (*IL1A*, *IL1B* and *IL1RN*) and cytokine receptors (*IL1R1* and *IL12RB1*) (Ravindran *et al.*, 2003; Hasegawa *et al.*, 2004; Peddle *et al.*, 2005, Huffmeier *et al.*, 2006; Peltekova *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005). Since psoriasis is a skin disorder, it is tempting to speculate that genes essential for epidermal cell homeostasis, and particularly genes involved in keratinocyte survival, migration, proliferation or differentiation such as *SLC12A8* and the transcription factor family *STAT3*, AP-1 (*JUN* and *JUNB*) (Hewett *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2005; Zenz *et al.*, 2005) and in keratinocyte structural integrity such as *FLG*, *TGM1*, *TGM3*,

TGM5 and *TGM6*, play a role in psoriasis (Huffmeier *et al.*, 2007; Russel *et al.*, 1995; Cassidy *et al.*, 2005).

RESULTS

Single-SNP analysis using the Family-Based Association (FBAT) and Modified Quasi-likelihood Score (MQLS) Tests

To assess the involvement of the 22 candidate genes in psoriasis, a SNP tagging approach was first undertaken to identify the variation at each locus. We also selected SNPs for which an association with psoriasis or other skin and autoimmune disorders has been reported in the literature. The names, positions and minor allele frequencies of 181 SNPs selected initially for genotyping in the 45 psoriasis families study are given in Supplementary Table S1. For all assayed SNPs, genotypes in founders satisfied criteria for the Hardy-Weinberg equilibrium. Overall estimates of allele frequencies for SNPs from parents in nuclear families closely reflected those reported in the CEU HapMap population.

Single-SNP analysis of the 22 candidate genes using FBAT and MQLS methods suggested association ($p \leq 0.05$) with psoriasis for 6 genes (*FLG*, *IL1RN*, *SLC12A8*, *SLC22A5*, *CARD15* and *CYLD*).

When using FBAT method, the most significant associations were found for SNP rs1858483 close to *FLG* with $P=0.001$, and rs2076752 in the 5'UTR of *CARD15* with $P=0.005$. In contrast to FBAT which is performed on nuclear families, the MQLS test (Modified Quasi-Likelihood Score Test) is a case-control association test which takes into account the complete pedigree structure of the families (Thornton and McPeck, 2007). Using MQLS method, the most significant associations were found for SNP rs12925755, close to *CYLD* ($P=0.005$), for SNP rs2076752, in the 5'UTR of *CARD15* ($P=0.006$), for SNP rs17221417, in intron 2 of *CARD15* ($P=0.007$) and for SNP rs658971, in intron 8 of *SLC12A8* ($P=0.007$) (Table 1a, Set I). There was no evidence for association between psoriasis and the following genes: *JUN*, *PTPN22*, *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B*, *SLC22A4*, *TGM1*, *TGM5*, *STAT3*, *SLC9A3R1/NAT9*, *RAPTOR*, *JUNB*, *IL12RB1*, *TGM3* and *TGM6*. The FBAT and MQLS results for all 153 SNPs in family Set I, which corresponds to 295 nuclear families, are shown in Supplementary Table S1.

Haplotype analysis

We also tested multi-SNP haplotypes covering whole genes for association with psoriasis, by using the haplotype-based association test (HBAT). However, for *FLG*, *SLC12A8*, *CARD15*, *CYLD* and *STAT3*, haplotypes could not be constructed due to the low pair-wise LD structure. Therefore, transmissions of all possible 2-SNP haplotypes to affected individuals were examined for these 5 genes. This haplotype analysis revealed that a new a 7-SNP haplotype (ACCATGG) of *TGM5*, with a frequency of 6.5% in our population, was overtransmitted in psoriasis patients ($P_{\text{Perm}}=0.04$), and represent therefore a new risk allele for psoriasis. A protective effect was identified for a haplotype (CC) constituted by the pair rs1053004/rs7217655 of *STAT3* ($P_{\text{Perm}}=0.03$).

While the haplotype analysis showed further evidence for association between psoriasis and *FLG*, *SLC12A8*, *CARD15*, *CYLD* (data not shown), it did not reveal any additional contributions to the risk of psoriasis for *JUN*, *PTPN22*, *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B*, *SLC22A4*, *TGM1*, *SLC9A3R1/NAT9*, *RAPTOR*, *JUNB*, *IL12RB1*, *TGM3* and *TGM6*, which is in agreement with the results of the univariate analysis.

Overall, the strongest associations were obtained for *FLG* and *CARD15*. The numerous 2-SNP-haplotypes that were significantly undertransmitted to the affected family members carried at least one of the SNPs showing a significant protective effect in the univariate SNP analysis. For the *FLG* gene, the best association for increased protection was obtained for the pair FLG_R501X/rs1858483 (CT haplotype (11%), $Z= -3.36$, ($P_{\text{Perm}}=0.0008$). Similarly, for *CARD15*, a significant protective effect was observed for 2-SNP haplotypes carrying the rare allele (A) of rs2076752 ($P_{\text{Perm}}<0.01$). A significant risk effect was also observed for 2-SNP haplotypes carrying the frequent allele (C) of rs17221417 and the rare allele (A) of rs5743291 ($P_{\text{Perm}}<0.05$).

Methodological replication using logistic-normal models (LNM)

To confirm all suggestive associations, we applied the logistic-normal models (LNM) method to the 12 SNPs showing a P_{FBAT} or $P_{\text{MQLS}} \leq 0.05$. Like the MQLS method, the LNM method uses the whole pedigree structure information of families, without decomposing them into nuclear families and treating them independently (Xu and Shete, 2007). The advantage of LNM over MQLS is that LNM provides an estimate of the odds ratio. This approach confirmed a reduced risk of psoriasis for carriers of the minor alleles of rs315934 (G), rs2076752 (A), rs17221417 (G) and rs2066844 (T) within *IL1RN* and *CARD15* ($P=0.004$, $P=0.003$, $P=0.003$, and $P=0.01$, respectively), and an increased risk of psoriasis for carriers of the minor allele of rs658971 (A), rs2137599 (C), rs8057341 (A) and rs12925755 (A) within

SLC12A8, *CARD15* and *CYLD* ($P=0.009$, $P=0.05$, $P=0.04$, $P=0.01$, respectively). Results obtained by this method were in agreement with those obtained by the MQLS method (Table 1a). The results of the LNM method for SNPs for *TGM5* are correlated with those obtained by single analysis using FBAT and MQLS (Data not shown).

Replication set

To confirm our findings, associated SNPs in Set I were genotyped in second set of 81 previously described smaller French families (Set II) (Lesueur *et al.*, 2007b). Although Set II presented lower informativity than Set I, combined analysis of Set I and Set II using the FBAT method confirmed association between psoriasis and rs1858483 near *FLG* ($P=0.009$), rs2137599 in the intron 2 of *SLC12A8* ($P=0.01$), rs4785452 near *CYLD* ($P=0.03$), and rs2076752 in 5'UTR of *CARD15* ($P=0.04$). Using the MQLS method, the associations with rs658971 in the intron 8 of *SLC12A8* ($P=0.002$), and rs1858483 in the intron 1 of *ILIRN* ($P=0.01$) were confirmed (Table 1b).

Testing for potential interaction between *HLA-Cw6* and the candidate genes

We have previously reported that the major risk allele *HLA-Cw6* (Asumalahti *et al.*, 2002; Capon *et al.*, 2004) is strongly associated with psoriasis in Set I and Set II (Lesueur *et al.*, 2007b). This robust association previously observed when using the classical FBAT approach was confirmed with the LNM or MQLS methods (Table 2), thus validating the efficiency of these two last approaches to detect association in our family sample. The highest odds ratios for the *HLA-Cw6* Tagging SNPs for Aa and aa genotypes obtained for rs130079 were 2.03 ([95%CI]:1.70-2.43) and 4.14 ([95%CI]:3.47-4.93) respectively in Set I and Set II, with a highly significant p-value of 6.22×10^{-15} . The most significant p-value was obtained for rs130076 ($P=2.44 \times 10^{-21}$) using MQLS method. These results agree with those obtained using the more classical FBAT method, thus validating the application of LNM and MQLS methods to our French families for the identification of susceptibility genes for psoriasis.

To investigate a possible interaction between the 153 SNPs of the candidate genes and *HLA-Cw6*, the families of Set I were stratified based on the presence or absence of the major risk haplotype (Lesueur *et al.*, 2007b; Table 2).

This analysis showed association ($P \leq 0.05$) for *FLG*, *ILIRN*, *SLC12A8*, *TGM5*, *CARD15*, *CYLD* and *STAT3* in the subgroup of *HLA-Cw6* carriers, indicating that *HLA-Cw6* is likely to interact with specific alleles of these genes. Interestingly, while the association between *TGM5* and psoriasis was seen only in the multi-SNP haplotype analysis (HBAT) of Set I,

stratification according to the presence of the *HLA-Cw6* allele revealed significant single-SNP associations for rs2241516, rs11070398 and rs542036 with psoriasis (FBAT). In the group of *HLA-Cw6* non-carriers, associations were significant for the genes *JUN*, *FLG*, *IL1R1*, *IL1B*, *SLC12A8*, *SLC22A5* and *TGM1* (Supplementary Table S2).

Finally, for the remaining candidate genes, the few observed associations were less relevant because of borderline significance, likely due to the lack of informativity of the markers in the two subgroups or to the small sample size.

DISCUSSION

Genetic analysis of multifactorial diseases is a challenging task. Non-random co-localization of susceptibility loci in some diseases, such as autoimmune disorders, suggests the presence of common biological pathways or genetic factors that may be involved in the aetiology of these diseases. In this study, we examined 22 candidate genes for psoriasis, some of which had been reported in the literature to be associated with other immune-mediated or skin diseases. Since some of the selected genes had been previously reported to be associated with psoriasis, we attempted to replicate these results in a set of 45 extended families, and chose a large statistical threshold for suggestive association (5%), taking into account the risk of obtaining a higher number of false positives. However, to limit the false positive rate and to confirm suggestive associations, we reanalyzed the data with methods which take into account the whole pedigree structure (MQLS, LNM) and we attempt to replicate our findings in a enlarged sample set (81 smaller families).

Analysis of the families with FBAT yielded evidence for association between psoriasis and *FLG*, *SLC12A8*, *SLC22A5*, *TGM5*, *CARD15*, *CYLD*. The analyses using LNM and MQLS confirmed association for the genes *SLC12A8*, *CARD15* and *CYLD*, and also revealed association for *IL1RN*. The association for a series of 5 SNPs in *CARD15* is especially powerful. Using an enlarged family set (Set I+II), association was replicated for all 6 genes, although results for *SLC22A5* did not reached statistical significance (Table 1b).

The divergence observed between some results obtained using three complementary methods, FBAT, MQLS and LNM, could be due to the fact that the LNM and MQLS methods take the structure of the families into account in the analysis. The FBAT method breaks down each pedigree into nuclear families and treats them independently, whereas the LNM and MQLS method takes the relationship between all members of the families into account, avoiding inflated false-positive rates and increasing the power of the association test (Xu and Shete, 2007). Another advantage of LNM over FBAT or MQLS is that LNM provides an estimate of

the odds ratio. This new approach for the dissection of the genetic basis of complex disorders has therefore been validated in our study through the robust association found between the major psoriasis susceptibility locus on chromosome 6p, *PSORS1* and psoriasis.

The discrepancy of results between the two family sets is likely to be due to lower informativity of Set II, as previously observed (Lesueur *et al.*, 2007b).

Finally, we examined whether the association of candidate genes was contingent on the presence of the *HLA-Cw6* risk allele. The results after stratification of Set I revealed associations for the same genes/SNPs as in the previous non-stratified analyses, but also revealed some additional hits such as in SNPs in the *TGM5* gene. The highest association scores were obtained for *FLG*, *TGM5*, *CARD15* and *CYLD*.

In conclusion, our analyses provide evidence for association with susceptibility to psoriasis for the six genes implicated in ion transport (*SLC12A8*), inflammatory processes (*IL1RN*), epidermal differentiation (*TGM5* and *FLG*), or in NF- κ B pathways (*CARD15* and *CYLD*).

The first evidence of association with psoriasis and *SLC12A8* at the locus *PSORS5* (3q21) (Enlund *et al.*, 1999b) was described in 195 Swedish psoriatic families (Hewett *et al.*, 2002). *SLC12A8* encodes a protein of unknown function which shares homology with cation-chloride-coupled cotransporters. Associations with intronic SNPs localised in the 3' portion of the gene were found and some of them were confirmed in another study in a German population, but independent of the presence of the *PSORS1* risk allele (Hüffmeier *et al.*, 2005). We were not able to replicate these results in four of the SNPs which were strongly associated in the German study ($P < 0.04$), but several combinations of SNPs conferring a risk for psoriasis and two intronic SNPs (rs658971 and rs2137599) in the 3' and 5' portions of *SLC12A8*, respectively, were shown to be associated with psoriasis in our French families. This could be due to the allelic heterogeneity in this gene, already suggested in the German study (Hüffmeier *et al.*, 2005). Thus, our study supports the previous evidence for involvement of *SLC12A8* in the pathogenesis of psoriasis.

IL1RN, which is implicated in inflammatory process, was also found to be associated with psoriasis in our study. This gene encodes a homolog and antagonist of the pleiotropic proinflammatory cytokine IL-1, which inhibits the binding of IL-1 to the functional type I IL-1 receptor (IL-1R1) with a complete lack of receptor activation. Observation of an aberrant cytokine expression such as IL-1 in psoriatic patients and evidence for associations between some of these genes found as a cluster on chromosome 2q12-14 and psoriasis or psoriatic arthritis seem to suggest that the IL-1 system has a probable role in psoriasis (Reich *et al.*, 2002; Ravindran *et al.*, 2003; Peddle *et al.*, 2005). Moreover, the transgenic (such as *IL-1*)

and gene knockout mouse models (such as *ILRN*) develop various pathologic features resembling human psoriasis under certain conditions (Shepherd *et al.*, 2004; Gudjonsson *et al.*, 2007). In our study, the analyses yielded evidence for association between psoriasis and an intronic SNP (rs315934). This study supports the initial study which found a suggestive association between *ILRN* and psoriasis, but it is in disagreement with other recent studies on psoriasis or psoriatic arthritis in different populations (Tarlow *et al.*, 1997; Reich *et al.*, 2002; Balding *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007).

FLG* and *TGM5, which are both involved in terminal differentiation of the epidermis to form the cornified cell envelope, were also found to be associated with psoriasis. Filaggrin (*FLG*) encodes a structural protein, and is located in the epidermal differentiation complex (EDC) on 1q21, one of the loci which is shared by two inflammatory skin diseases, atopic dermatitis (AD) and psoriasis *vulgaris* (Bowcock and Cookson, 2004). The EDC has recently been shown to be a major locus for psoriasis (de Cid *et al.*, 2008 in press). Moreover, two loss-of-function alleles of *FLG*, R501X and 2282del4, which lead to premature termination of profilaggrin translation cause the skin disorder ichthyosis vulgaris (Sandilands *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006) and influences susceptibility to AD (Palmer *et al.*, 2006). In our study, the analyses of this gene revealed an association between psoriasis and the SNP rs1858483, situated upstream of *FLG*, independently of the *HLA-Cw6* haplotype. Only one of the variants associated with AD, R501X, was tested in our family set, but in agreement with others studies on psoriasis or psoriatic arthritis we did not find an association (Zhao *et al.*, 2007; Hüffmeier *et al.*, 2007). Since filaggrin seems to play a role in the pathogenesis of psoriasis in our French patients, it will be interesting to determine whether the associated SNP situated upstream of *FLG* has a functional role, or if an unknown variant contributes the risk factor. *TGM5* encodes a transglutaminase which cross-links epidermal proteins such as filaggrin to form the cornified cell envelope. Recessive loss-of-function mutations in *TGM5* have been shown to cause acral peeling skin syndrome, an autosomal recessive genodermatosis characterized by the shedding of the outer epidermis (Cassidy *et al.*, 2005). In our study, only a weak association between *TGM5* and psoriasis was seen in the multi-SNP haplotype analysis, but significant single-SNP associations for three intronic SNPs of *TGM5* with psoriasis were found in the subgroup of *HLA-Cw6* carriers. A supplementary haplotype analysis after this stratification revealed a strong association for the rare haplotype with psoriasis in the carriers subgroup ($P_{\text{Perm}}=0.0002$, data not shown), indicating an interaction between *TGM5* and *PSORS1*. Thus, our study suggests for the first time a role of *TGM5* in the pathogenesis of psoriasis.

CARD15 and *CYLD*, are adjacent genes on 16q which regulate NF- κ B pathways, and which were also found to be independently associated with psoriasis. The 16q region is of interest because it overlaps with susceptibility regions which predispose to other autoimmune diseases such as psoriatic arthritis and Crohn's disease (Nair *et al.*, 1997; Karason *et al.*, 2003; Hugot *et al.*, 2001). In response to bacterial infection, the product of *CARD15* activates the transcription factor NF- κ B that plays a central role in regulating the activation and homeostasis of T cells (Ogura *et al.*, 2001). The three coding SNPs R702W, G908R, 1007fsX have been shown to confer susceptibility to Crohn's disease (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). The same functional SNPs were found to be associated in PsA patients (Rahman *et al.*, 2003). Numerous studies failed to replicate these associations with PsA or psoriasis *vulgaris* (Lascorz *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005; Giardina *et al.*, 2004; Jenisch *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2001; Borgiani *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2003; Plant *et al.*, 2004), and only one of them undertook a comprehensive study of the gene (Plant *et al.*, 2004). The present study confirms the association between *CARD15* and psoriasis in French large families, although the association was based on different SNPs. The coding SNP rs2066842 (P268S) was not directly tested here, but its association is inferred by the results obtained for rs17221417, with whom it is in strong linkage disequilibrium.

A second independent association signal for psoriasis was obtained for the *CYLD* gene, which is located adjacent to the *CARD15* gene. *CYLD* is a tumor suppressor gene that is mutated in familial cylindromatosis, an autosomal dominant genetic predisposition to multiple tumours of the skin appendages (Bignell *et al.*, 2000). Although the molecular mechanisms are not clear, *CYLD*, a deubiquitinating enzyme, seems to inhibit the activation of NF- κ B in T cells and therefore, to be a pivotal protein in the regulation of spontaneous activation and homeostasis of T-cells (Reiley *et al.*, 2007). The spontaneous development of the colonic inflammation of *Cyld* $-/-$ mice and the association of inflammatory bowel diseases (IBD) with the reduced expression of *CYLD* seem to suggest that *CYLD* has several biological activities including regulation of the innate and adaptive immune responses. The two associated SNPs rs4785452 and rs12925755 are located 6kb and 10kb downstream from *CYLD*, respectively, and they are not in LD with associated SNPs of *CARD15*. However, the possibility that these markers are tagging untested causal variants affecting *CARD15* or *CYLD* function or expression cannot be ruled out.

In conclusion, using a tagging-SNP approach in a family-based association study design to investigate some candidate genes for psoriasis, our study support evidence for shared genetic

factors between immune system disorders and skin diseases. We have identified five genes *FLG*, *IL1RN*, *TGM5*, *CARD15* and *CYLD* which are potential susceptibility genes for psoriasis and confirmed the association of *SLC12A8* with the disease, particularly in multigenerational French families. The causal variants remain to be identified. For the other genes tested, some of them could play a role in the pathogenesis of psoriasis but with only weak effects or may have a role in other populations. In fact, for genetic associations, the studies of cases and unrelated controls are the most commonly used approach because population-based studies have the advantages of easy sample collection and can be more powerful than family-based studies in identifying disease genes. Nevertheless, family-based studies, in which it is more difficult to accumulate large samples, provide absolute protection from population stratification bias (i.e., confounding by ethnicity/race). Thus, the lack of association with certain genes or variants tested here may be partly due to a bias created by the analysis, in the first scan, of a smaller sample of highly predisposed families whose psoriasis susceptibility may be due to a smaller number of loci with a stronger effect. This absence may also correctly exclude false positive results of initially reported association studies in other populations. Nevertheless, it will be necessary to confirm our findings independently in larger sample sets from different populations and to identify the exact role of these genetic factors in the aetiology of psoriasis.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The 126 French psoriasis families included in this study were recruited through a media campaign between 1996 and 2001 at Généthon (Mahé *et al.*, 2002). The structure of the 126 pedigrees and the clinical characteristics of the patients have been reported previously (Lesueur *et al.*, 2007a; Lesueur *et al.*, 2007b). The families were divided into 2 non-homogeneous family sets (Set I and Set II). Set I was composed of 45 multigenerational families (8 affected individuals per family on average), and Set II was composed of 81 smaller families (3 affected members per family on average). All subjects participating in this study provided informed consent. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki Principles. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the standard phenol/chloroform procedure and cell lines were established at the Généthon DNA Bank

SNP selection

To test the candidate genes for association with psoriasis, we first selected SNPs with a minor allele frequency (MAF) $\geq 5\%$ in Caucasian populations which were initially identified through the HapMap database (<http://www.hapmap.org/>). SNPs that efficiently reflect the variation of the remaining common variations (MAF ≥ 0.05) of the candidate genes with $r^2 > 0.8$, (*i.e.* ‘Tagging SNPs’) were selected with the Haploview software (de Bakker *et al.*, 2005). In some cases, SNPs that were poorly correlated with other single SNPs could be efficiently tagged with a haplotype defined by multiple SNPs.

The selected markers were located exclusively within candidate genes for *PTPN22*, *IL1R1*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *SLC12A8*, *SLC22A5*, *TGM1*, *TGM3*, *TGM5*, *TGM6* and *CARD15*, or located in the 10-20kb region surrounding the gene for *JunC*, *JunB*, *STAT3*, *CYLD* and *FLG*. SNPs with ambiguous flanking sequences were excluded from the study.

When coverage with HapMap SNPs was insufficient, the density of markers was increased by genotyping additional SNPs reported in other public databases, such as dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) and Perlegen (<http://genome.perlegen.com/>). Thus, 9 additional SNPs were included for *IL1RN*, 7 for *IL1B*, 5 for *IL1A*, *IL1R1* and *STAT3*, 4 for *TGM1*, 3 for *TGM5* and *JUN*, 2 for *CARD15*, 2 for *TGM6* and one for *JUNB* (Supplementary Table S1).

Moreover, SNPs of *PTPN22*, *FLG*, *IL1A*, *SLC12A8* and *CARD15* that had been shown to be significantly associated with autoimmune or skin disorders in the literature were also included in the marker selection.

These selection approaches resulted in a total set of 153 SNPs that were genotyped in our family sets (Supplementary Table S1).

SNP genotyping

SNPlex method. Most of SNP genotyping was performed using the SNPlexTM Genotyping System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). This technology enables the simultaneous genotyping of up to 48 SNPs on a single biological sample by combining SNP-non specific steps, using universal assay reagents, with one SNP-specific step, using SNP-specific ligation probes. The optimal combination of 48 SNPs to produce the highest yield per multiplex reaction and the SNP-Specific SNPlex probes of 93 SNPs were determined and obtained from Applied Biosystems online SNP selection Service (through the myScience Environment Portal at <http://myscience.appliedbiosystems.com>). Genotyping was carried out on fragmented dried genomic DNA (50 ng) arrayed into 384-well plates according to manufacturer’s instructions. The allelic discrimination was detected using the ABI PRISM[®]

3730XL DNA Analyzer and GeneMapper[®] Analysis Software v4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Taqman method. When SNP genotyping could not be achieved using the SNPlex technology, a Taqman[®] assay was performed according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Warrington, UK). Specific SNP probes and primers were obtained from Applied Biosystems Assay-by-Design[™] Service for SNP genotyping and are available on request. Allelic discrimination was performed using the ABI PRISM 7900 HT using the Sequence Detection Software (SDSv2.0, Applied Biosystems, Foster City, California, United States). The SNPs within *FLG*, *CYLD*, *SLC9A3R1*, *NAT9*, *KIAA1303 raptor*, *IL12RB1*, *TGM3* and *TGM6* genes were genotyped only with Taqman[®]. Failed genotypes were not repeated.

Quality control of genotyping assays. For each SNP, we controlled the average rate of missing genotype data and tested the Hardy–Weinberg (HW) equilibrium in unrelated unaffected subjects was controlled using the PEDSTATS procedure, embedded in Merlin (Wigginton and Abecasis, 2005). Mendelian inheritance errors were checked using FBAT (Laird *et al.*, 2000). Thirty SNPs did not pass one of the three quality control tests and were eliminated from this association study (in Supplementary Table S1).

Statistical analysis

Family-based association test (FBAT). The FBAT test (Laird *et al.*, 2000) was used to examine the transmission rates of marker alleles, in our case, under the assumption of no linkage and using an additive model. The FBAT test is a multiallelic test based on the classic transmission/disequilibrium test (TDT) developed by Spielman *et al.* (1993) in which alleles transmitted to affected offspring are compared with the expected distribution of alleles among offspring. It thus avoids confounding due to model misspecification as well as admixture or population stratification (Rabinowitz and Laird, 2000; Lazzeroni and Lange, 1998). It permits analysis of family structures larger than trios (Lange and Laird, 2002). Large pedigrees are broken down into nuclear families and are treated independently. The pedigree's contribution to the FBAT test statistics is then obtained by summing over all nuclear families within the pedigree. The FBAT program also provides estimates of allele frequencies for each marker using genotype data from parents in nuclear families and checks the offspring genotypes of every nuclear family for any discrepancies from Mendelian laws. In the majority of cases, estimates of allele frequencies for each SNP closely reflected those reported in the CEU HapMap population.

Haplotype analysis was performed using the HBAT function of FBAT. This is a method for estimating genetic association from probabilities of haplotype transmission to affected offspring. It permits detection of association even at sites that were not necessarily typed and reveals the SNP combinations that could contribute to the etiology of the disease. To circumvent the problem of multiple testing due to the large number of statistical tests performed simultaneously in the association study, the false discovery rate was controlled and permutation p-values (P_{Perm}) were computed with the FBAT program (1,000,000 permutation tests were performed).

Associations was defined by a P-value less than or equal to 0.05. A Bonferroni correction was not applied for all univariate tests because this correction for multiple testing in association studies for complex diseases is too conservative, especially when the SNPs in the candidate regions were partly correlated. Moreover, these disorders result from the interactions of environmental factors with multiple genes of which several individual genes have weak effects. Thus, the weak but real signals could be missed because of the use of Bonferroni correction.

Modified Quasi-likelihood Score Test (MQLS). MQLS is a likelihood based test applicable to association studies with completely general combinations of family and case-control designs (Thornton and McPeck, 2007). The method allows cases to be related to controls and is applicable to complex pedigrees. MQLS incorporates phenotype data about relatives with missing genotype data. To optimize MQLS power, a specific k parameter was recommended to be set at the best estimate of the population disease prevalence in the population (estimated to be 3-4% in the French population). However, no differences were observed at different k parameter specification. The interpretation of the association measure is represented by the association test P-value and LOD score.

Mixed-Effects Logistic Models (LNM). LNM can be applied to population-based association studies with families of different sizes (Xu and Shete, 2007). This method takes into account the whole family structure including affected and non-affected individuals. It is indeed important to account for correlations among family members because identity-by-descent (IBD) sharing of alleles can inflate the probability of type-I error and lead to false-positive results (Newman *et al.*, 2001). Each family defines a cluster and the correlation of family members is accounted for by the introduction of a corresponding random effect. This framework thus assumes a natural heterogeneity across families due to IBD or shared environmental factors. For ease of presentation, we consider an additive mode of inheritance

and denote A as the major allele, the allele of reference and a as the minor allele. We also assume that there is a specific probability of being affected in each family but that the effect of the risk locus is identical across the families, by including only the random intercept and keeping the effect of the risk locus fixed. The interpretation of different parameters is analogous to the standard logistic regression model. Therefore, the transformed regression coefficient $\exp(x_{it} b)$ is the odds of being affected for individuals with a genotype (aA or aa) compared with individuals with the most frequent genotype (AA) as the referent at the risk locus. The statistical analysis was performed using the R computer package (version 2.4.1).

Stratification analysis. Stratification analysis was performed on the families to investigate the effects of *PSORS1* on other loci. The 4 SNPs *HCR-325 C>T* (rs130076), *HCR-1723 G>T* (rs130079), *HCR-2327C>G* (rs1576) and *CDSN971 C>T* (rs1062470) are in strong linkage disequilibrium with the *HLA-Cw6* risk allele at *PSORS1*, giving an estimate of this allele (Asumalahti *et al.*, 2002; Capon *et al.*, 2004). As previously described in our population, the 4-SNP haplotype TTGT is a strongly associated with psoriasis (Lesueur *et al.*, 2007b). Haplotype reconstruction with these 4 SNPs in our families was done with the MERLIN program (Abecasis *et al.*, 2002). To demonstrate the effect of *PSORS1* each associated SNP was tested after stratifying the families according to the presence or absence of this risk haplotype. In the first group only affected individuals carrying the *HLA-Cw6* haplotype were taken into account, and in the second group, only affected individuals not carrying this haplotype were used.

Electronic databases and programs. HapMap data are available at <http://www.hapmap.org> (public data released at January 2007 for *FLG* and *CYLD*, October 2005 for *JUN*, *JUNB* and *Stat3* and June 2005 for the other genes). The dbSNP database is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. The FBAT program version 1.5.1 is available at <http://www.biostat.harvard.edu/~fbat/>. PEDSTATS is available at <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/PedStats/>. The MERLIN program version 1.0.1 is available at <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/Merlin/>. Tagger on Haploview, version 3.2 is available at <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/using.php>.

ACKNOWLEDGMENT

We are most grateful to all the families who have so willingly participated in this study. We are also indebted to the Association Pour la Lutte Contre le Psoriasis (APLCP), and to the National Psoriasis Foundation (NPF) for their support. We thank Ghislain Septier for his help in analyzing SNPlex data and Susan Cure for her help in writing the manuscript.

REFERENCES

- Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* **30**:97-101.
- Asumalahti K, Veal C, Laitinen T, Suomela S, Allen M, Elomaa O, et al. (2002) Coding haplotype analysis supports HCR as the putative susceptibility gene for psoriasis at the MHC PSORS1 locus. *Hum Mol Genet* **11**:589-597.
- Balding J, Kane D, Livingstone W, Mynett-Johnson L, Bresnihan B, Smith O, et al. (2003) Cytokine gene polymorphisms: association with psoriatic arthritis susceptibility and severity. *Arthritis Rheum* **48**:1408-1413.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* **75**:330-337.
- Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, et al. (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet* **25**:160-165.
- Borgiani P, Vallo L, D'Apice MR, Giardina E, Pucci S, Capon F, et al. (2002) Exclusion of CARD15/NOD2 as a candidate susceptibility gene to psoriasis in the Italian population. *Eur J Dermatol* **12**:540-542.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* **36**:337-338.
- Bowcock AM, Cookson WO (2004) The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* **13 Spec No 1**:R43-55.
- Bowcock AM (2005) The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **6**:93-122.
- Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN, et al. (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet* **13**:2361-2368.
- Cassidy AJ, van Steensel MA, Steijlen PM, van Geel M, van der Velden J, Morley SM, et al. (2005) A homozygous missense mutation in TGM5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet* **77**:909-917.
- Chang YT, Chou CT, Yu CW, Lin MW, Shiao YM, Chen CC, et al. (2007) Cytokine gene polymorphisms in Chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol* **156**:899-905.

- Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE, et al. (2001) Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* **27**:372-373.
- de Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D (2005) Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* **37**:1217-1223.
- Elder JT, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorhees JJ (1994) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* **130**:216-224.
- Elder JT (2006) PSORS1: linking genetics and immunology. *J Invest Dermatol* **126**:1205-1206.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M, et al. (1999a) Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large Swedish set of families: confirmation of linkage to chromosome 6p (HLA region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered* **49**:2-8.
- Enlund F, Samuelsson L, Enerback C, Inerot A, Wahlstrom J, Yhr M, et al. (1999b) Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest Sweden. *Eur J Hum Genet* **7**:783-790.
- Giardina E, Novelli G, Costanzo A, Nistico S, Bulli C, Sinibaldi C, et al. (2004) Psoriatic arthritis and CARD15 gene polymorphisms: no evidence for association in the Italian population. *J Invest Dermatol* **122**:1106-1107.
- Giardina E, Sinibaldi C, Chini L, Moschese V, Marulli G, Provini A, et al. (2006) Co-localization of susceptibility loci for psoriasis (PSORS4) and atopic dermatitis (ATOD2) on human chromosome 1q21. *Hum Hered* **61**:229-236.
- Gladman DD (1994) Natural history of psoriatic arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* **8**:379-394.
- Griffiths CEM, Camp RDR, Barker JNWN (2004) Psoriasis. In: Rook's textbook of dermatology. (Burns T, Breathnach S, Cox C, Griffiths C, eds) Oxford: Blackwell Scientific Publishing, **35**:31-69
- Gottlieb AB, Krueger JG, Khandke L, Grossman RM, Krane J, Carter DM (1991) Role of T cell activation in the pathogenesis of psoriasis. *Ann N Y Acad Sci* **636**:377-379.
- Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L, Chan AC (2004) PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* **303**:685-689.
- Helms C, Cao L, Krueger JG, Wijsman EM, Chamian F, Gordon D, et al. (2003) A putative RUNX1 binding site variant between SLC9A3R1 and NAT9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet* **35**:349-356.
- Helms C, Saccone NL, Cao L, Daw JA, Cao K, Hsu TM, et al. (2005) Localization of PSORS1 to a haplotype block harboring HLA-C and distinct from corneodesmosin and HCR. *Hum Genet* **118**:466-476.
- Hewett D, Samuelsson L, Polding J, Enlund F, Smart D, Cantone K, et al. (2002) Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map. *Genomics* **79**:305-314.

- Huffmeier U, Lascorz J, Traupe H, Bohm B, Schurmeier-Horst F, Stander M, et al. (2005) Systematic linkage disequilibrium analysis of SLC12A8 at PSORS5 confirms a role in susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* **125**:906-912.
- Huffmeier U, Steffens M, Burkhardt H, Lascorz J, Schurmeier-Horst F, Stander M, et al. (2006) Evidence for susceptibility determinant(s) to psoriasis vulgaris in or near PTPN22 in German patients. *J Med Genet* **43**:517-522.
- Huffmeier U, Traupe H, Oji V, Lascorz J, Stander M, Lohmann J, et al. (2007) Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in German patients. *J Invest Dermatol* **127**:1367-1370.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.
- Ho P, Bruce IN, Silman A, Symmons D, Newman B, Young H, et al. (2005) Evidence for common genetic control in pathways of inflammation for Crohn's disease and psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* **52**:3596-3602.
- Jenisch S, Hampe J, Elder JT, Nair R, Stuart P, Voorhees JJ, et al. (2006) CARD15 mutations in patients with plaque-type psoriasis and psoriatic arthritis: lack of association. *Arch Dermatol Res* **297**:409-411.
- Karason A, Gudjonsson JE, Upmanyu R, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Runasdottir EH, et al. (2003) A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome 16q: evidence for imprinting. *Am J Hum Genet* **72**:125-131.
- Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. (2004) Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* **75**:504-507.
- Laird NM, Horvath S, Xu X (2000) Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol* **19 Suppl 1**:S36-42.
- Lange C, Laird NM (2002) Power calculations for a general class of family-based association tests: dichotomous traits. *Am J Hum Genet* **71**:575-584.
- Lascorz J, Burkhardt H, Huffmeier U, Bohm B, Schurmeyer-Horst F, Lohmann J, et al. (2005) Lack of genetic association of the three more common polymorphisms of CARD15 with psoriatic arthritis and psoriasis in a German cohort. *Ann Rheum Dis* **64**:951-954.
- Lazzeroni LC, Lange K (1998) A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered* **48**:67-81.
- Lee FI, Bellary SV, Francis C (1990) Increased occurrence of psoriasis in patients with Crohn's disease and their relatives. *Am J Gastroenterol* **85**:962-963.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, et al. (2007) The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* **46**:49-56.
- Lench N, Iles MM, Mackay I, Patel R, Sagoo GS, Ward SJ, et al. (2005) Single-point haplotype scores telomeric to human leukocyte antigen-C give a high susceptibility major

histocompatibility complex haplotype for psoriasis in a caucasian population. *J Invest Dermatol* **124**:545-552.

Lesueur F, Lefevre C, Has C, Guilloud-Bataille M, Oudot T, Mahe E, et al. (2007a) Confirmation of psoriasis susceptibility loci on chromosome 6p21 and 20p13 in French families. *J Invest Dermatol* **127**:1403-1409.

Lesueur F, Oudot T, Heath S, Foglio M, Lathrop M, Prud'homme JF, et al. (2007b) ADAM33, a new candidate for psoriasis susceptibility. *PLoS ONE* **2**:e906.

Mahe E, Lahfa M, Mansouri S, Mosharraf-Olmolk H, Le Rebours J, Prud'Homme JF, et al. (2002) Physicians' response to a letter to confirm diagnosis in a genetic study of psoriasis. *Eur J Dermatol* **12**:66-69.

Menter A (1998) Pathogenesis and genetics of psoriasis. *Cutis* **61**:8-10.

Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, et al. (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet* **6**:1349-1356.

Nair RP, Stuart P, Ogura Y, Inohara N, Chia NV, Young L, et al. (2001) Lack of association between NOD2 3020InsC frameshift mutation and psoriasis. *J Invest Dermatol* **117**:1671-1672.

Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NV, Jenisch S, et al. (2006) Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet* **78**:827-851.

Natl. Psoriasis Found. Bull.2002. Psoriatic arthritis more common than suspected. **33**:6

Nevitt GJ, Hutchinson PE (1996) Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients' beliefs and attitudes towards the disease. *Br J Dermatol* **135**:533-537.

Newman DL, Abney M, McPeck MS, Ober C, Cox NJ (2001) The importance of genealogy in determining genetic associations with complex traits. *Am J Hum Genet* **69**:1146-1148.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-606.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* **38**:441-446.

Palmer CN, Ismail T, Lee SP, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, et al. (2007) Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* **120**:64-68.

Peddle L, Butt C, Snelgrove T, Rahman P (2005) Interleukin (IL) 1alpha, IL1beta, IL receptor antagonist, and IL10 polymorphisms in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* **64**:1093-1094.

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, et al. (2004) Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **36**:471-475.

- Plant D, Lear J, Marsland A, Worthington J, Griffiths CE (2004) CARD15/NOD2 single nucleotide polymorphisms do not confer susceptibility to type I psoriasis. *Br J Dermatol* **151**:675-678.
- Prinz JC (2003) The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **17**:257-270.
- Rabinowitz D, Laird N (2000) A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered* **50**:211-223.
- Rahman P, Bartlett S, Siannis F, Pellett FJ, Farewell VT, Peddle L, et al. (2003) CARD15: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis. *Am J Hum Genet* **73**:677-681.
- Ravindran JS, Owen P, Lagan A, Lewis J, Korendowych E, Welsh K, et al. (2004) Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **43**:22-26.
- Reich K, Mossner R, Konig IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C (2002) Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* **118**:155-163.
- Reiley WW, Jin W, Lee AJ, Wright A, Wu X, Tewalt EF, et al. (2007) Deubiquitinating enzyme CYLD negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase Tak1 and prevents abnormal T cell responses. *J Exp Med* **204**:1475-1485.
- Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, Steinert PM, Hashem N, Compton JG, et al. (1995) Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Genet* **9**:279-283.
- Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L, et al. (2004) Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *J Invest Dermatol* **122**:1401-1405.
- Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A, Yhr M, Inerot A, Enerback C, et al. (1999) A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* **105**:523-529.
- Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Watson RM, et al. (2006) Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **126**:1770-1775.
- Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, et al. (2005) Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med* **11**:43-49.
- Shepherd J, Little MC, Nicklin MJ (2004) Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J Invest Dermatol* **122**:665-669.
- Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, et al. (2006) Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* **38**:337-342.

Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, et al. (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* **53**:3020-3023.

Speckman RA, Wright Daw JA, Helms C, Duan S, Cao L, Taillon-Miller P, et al. (2003) Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility. *Hum Genet* **112**:34-41.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* **52**:506-516.

Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Ebe K, Inomata N, Obara K, et al. (2005) Association of the IL12RB1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet* **14**:3149-3159.

Tarlow JK, Cork MJ, Clay FE, Schmitt-Egenolf M, Crane AM, Stierle C, et al. (1997) Association between interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene polymorphism and early and late-onset psoriasis. *Br J Dermatol* **136**:147-148.

The International Psoriasis Genetics Study (2003): assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet* **73**:430-437.

Thornton T, McPeck MS (2007) Case-control association testing with related individuals: a more powerful quasi-likelihood score test. *Am J Hum Genet* **81**:321-337.

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, et al. (2003) An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **35**:341-348.

Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, et al. (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* **6**:813-820.

Veal CD, Clough RL, Barber RC, Mason S, Tillman D, Ferry B, et al. (2001) Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between PSORS1 and candidate loci. *J Med Genet* **38**:7-13.

Veal CD, Capon F, Allen MH, Heath EK, Evans JC, Jones A, et al. (2002) Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at PSORS1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet* **71**:554-564.

Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, et al. (2004) The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* **89**:5862-5865.

Weidinger S, Klopp N, Rummeler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, et al. (2005) Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clin Exp Allergy* **35**:866-872.

- Wigginton JE, Abecasis GR (2005) PEDSTATS: descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics* **21**:3445-3447.
- Wu Z, Gu JR (2007) [A meta-analysis on interleukin-1 gene cluster polymorphism and genetic susceptibility for ankylosing spondylitis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **87**:433-437.
- Xu H, Shete S (2007) Mixed-effects logistic approach for association following linkage scan for complex disorders. *Ann Hum Genet* **71**:230-237.
- Yamada R, Yamamoto K (2005) Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutat Res* **573**:136-151.
- Yates VM, Watkinson G, Kelman A (1982) Further evidence for an association between psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis. *Br J Dermatol* **106**:323-330.
- Young C, Allen MH, Cuthbert A, Ameen M, Veal C, Leman J, et al. (2003) A Crohn's disease-associated insertion polymorphism (3020insC) in the NOD2 gene is not associated with psoriasis vulgaris, palmo-plantar pustular psoriasis or guttate psoriasis. *Exp Dermatol* **12**:506-509.
- Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, et al. (2005) Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature* **437**:369-375.
- Zhang XJ, He PP, Wang ZX, Zhang J, Li YB, Wang HY, et al. (2002) Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(PSORS1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in Chinese hans. *J Invest Dermatol* **119**:1361-1366.
- Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Liao H, Lee SP, Allen MH, Hull PR, et al. (2007) Filaggrin null alleles are not associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* **127**:1878-1882.

Table 1a. Association analysis in Set I. Best scores for FBAT, MQLS and LNM methods

Chr.	Gene	N°	SNP ID	Region ^a	Amino acid change	Allele ^b	FBAT			MQLS		LNM ⁱ			
							MAF ^c	N ^d	Z ^e	P ^f	LOD ^g	P ^h	OR _{Aa} [95% CI]	OR _{aa} [95% CI]	P
1q21	<i>FLG</i>	24	rs1858483			C>T	13.1	50	-3.28	0.001	0.45	0.150	0.84 [0.59-1.19]	0.71 [0.50-1.00]	0.336
2q14	<i>IL1RN</i>	56	rs315934	IN 1		A>G	19.7	61	-0.973	0.331	1.34	0.013	0.67 [0.51-0.88]	0.45 [0.34-0.59]	0.004
3q21	<i>SLC12A8</i>	68	rs658971	IN 8		G>A	21.2	80	1.453	0.146	1.6	0.007	1.35 [1.08-1.70]	1.84 [1.46-2.30]	0.009
		76	rs2137599	IN 2		T>C	43.8	97	2.25	0.025	0.05	0.630	1.22 [1.00-1.48]	1.48 [1.22-1.80]	0.047
5q31	<i>SLC22A5</i>	85	rs274559	IN 3		T>C	36	95	2.03	0.042	0.05	0.630	0.93 [0.76-1.13]	0.86 [0.70-1.05]	0.450
		99	rs2076752	5' UTR		G>A	33	92	-2.79	0.005	1.65	0.006	0.71 [0.57-0.89]	0.51 [0.40-0.63]	0.003
		100	rs2111235	IN 2		C>T	29	92	0.848	0.396	0.86	0.047	1.23 [0.99-1.51]	1.50 [1.22-1.85]	0.055
16q12	<i>CARD15</i>	101	rs8057341	IN 2		G>A	29.1	92	0.677	0.499	0.86	0.047	1.25 [1.01-1.54]	1.55 [1.26-1.91]	0.041
		102	rs17221417	IN 2		C>G	35.5	91	-2.45	0.014	1.57	0.007	0.71 [0.57-0.89]	0.51 [0.41-0.64]	0.003
16q12	<i>CYLD</i>	104	rs2066844	EX 4	R702W	C>T	7.4	31	-2.07	0.038	1.02	0.030	0.56 [0.36-0.88]	0.31 [0.20-0.49]	0.012
		124	rs4785452			C>T	50.4	104	-2.12	0.034	0.55	0.110	1.10 [0.91-1.34]	1.21 [1.00-1.48]	0.320
		130	rs12925755			C>A	33	109	1.037	0.299	1.7	0.005	1.33 [1.07-1.65]	1.76 [1.42-2.19]	0.010

^a Position according to Reference sequence: *NM_002016* for *FLG*, *NM_000577* for *IL1RN*, *NM_024628* for *SLC12A8*, *NM_003060* for *SLC22A5*, *NM_022162* for *CARD15*, *NM_015247* for *CYLD*

^b Most common allele, according to NCBI, is given first.

^c Minor Allele Frequency (%) estimated by FBAT, with minor allele of reference chosen according to NCBI.

^d Number of informative nuclear families estimated by FBAT.

^e Score given by the association test for minor allele, performed by FBAT, under assumption of no linkage. A positive Z value indicates an excess of minor allele transmitted to affected subjects (increased risk for psoriasis).

^f FBAT association test P-value under assumption of no linkage.

^g LOD score given for association calculated by method using the More Powerful Quasi Linkage Score approach (MQLS).

^h MQLS association test P-value.

ⁱ Association test P-value, OR (Odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval) calculated by method using Mixed-Effects Logistic models (LNM).

Table 1b. Association analysis in Set I, Set II and Set I+Set II, for SNPs showing best associations in set I, using FBAT or MQLS methods

Chr.	Gene	SNP ID	Allele ^a	FBAT						MQLS											
				Set I ^b			Set II ^b			Set I + Set II			Set I ^b			Set II ^b			Set I + Set II		
				MAF ^b	N ^c	Z ^d	P ^e	MAF ^b	N ^c	Z ^d	P ^e	MAF ^b	N ^c	Z ^d	P ^e	LOD ^f	P ^g	LOD ^f	P ^g	LOD ^f	P ^g
1q21	<i>FLG</i>	rs1858483	C>T	13.1	50	-3.28	0.001	12.6	30	0.16	0.875	12.8	80	-2.61	0.009	0.45	0.150	0.01	0.807	0.27	0.264
2q14	<i>ILIRN</i>	rs315934	A>G	19.7	61	-0.97	0.331	20.7	51	-0.72	0.474	20.2	112	-1.20	0.231	1.34	0.013	0.08	0.543	1.36	0.012
3q21	<i>SLC12A8</i>	rs658971	G>A	21.2	80	1.45	0.146	18.2	41	0.43	0.670	19.7	121	1.46	0.145	1.60	0.007	0.36	0.196	2.12	0.002
		rs2137599	T>C	43.8	97	2.25	0.025	43.4	62	1.15	0.252	43.6	159	2.47	0.014	0.05	0.630	0.21	0.330	0.20	0.341
5q31	<i>SLC22A5</i>	rs274559	T>C	36.0	95	2.03	0.042	36.3	56	0.00	0.997	36.2	151	1.63	0.103	0.06	0.599	0.04	0.653	0.01	0.835
		rs2076752	G>A	33.0	92	-2.79	0.005	31.3	65	0.33	0.742	32.0	156	-2.02	0.043	1.65	0.006	0.33	0.215	0.72	0.069
		rs2111235	C>T	29.0	92	0.85	0.396	23.5	48	-0.30	0.765	26.4	139	0.61	0.540	0.86	0.047	1.06	0.027	0.19	0.346
16q12	<i>CARD15</i>	rs8057341	G>A	29.1	92	0.68	0.499	24.0	50	-0.14	0.892	26.6	141	0.55	0.583	0.86	0.047	0.26	0.273	0.42	0.162
		rs17221417	C>G	35.5	91	-2.45	0.014	29.3	59	0.16	0.873	32.2	149	-1.92	0.055	1.57	0.007	0.30	0.237	0.65	0.083
		rs2066844	C>T	7.4	31	-2.07	0.038	7.2	21	2.12	0.034	7.3	52	-0.05	0.960	1.02	0.030	0.61	0.093	0.24	0.294
16q12	<i>CYLD</i>	rs4785452	C>T	50.4	104	-2.12	0.034	46.0	54	-0.90	0.370	48.1	158	-2.24	0.025	0.55	0.110	0.09	0.530	0.63	0.089
		rs12925755	C>A	33.0	109	1.04	0.299	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.70	0.005	ND	ND	ND	ND

^a Most common allele, according to NCBI, is given first

^b Minor Allele Frequency (%) estimated by FBAT, with minor allele of reference chosen according to NCBI

^c Number of informative nuclear families estimated by FBAT

^d Score given by the association test for minor allele, performed by FBAT, under assumption of no linkage. A positive Z value indicates an excess of minor allele transmitted to affected subjects (increased risk for psoriasis). "ND" indicates no data.

^e FBAT association test P-value under assumption of no linkage.

^f LOD score given for association using the MQLS.

^g MQLS association test P-value

^h Forty five families in Set I and eighty one families in Set II

Table 2. Comparative analysis for HLA-Cw6 tagging SNPs in the two sets using the three methods FBAT, MQLS and LNNMs

Gene	SNP	Other name ^a	Amino acid	MAF ^b	FBAT ^c		MQLS ^d		LNNMs ^e		
					Set I + Set II	<i>Z</i>	<i>P</i>	Set I + Set II	<i>LOD</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
HCR	Rs130076	-325 C>T	R109W	22	4.74	2 x 10 ⁻⁶	19.53	2.44 x 10 ⁻²¹	1.36 x 10 ⁻¹⁴	2.00 [1.68-2.39]	4.01 [3.37-4.78]
	Rs130079	-1723 G>T	G575C	24	5.05	1 x 10 ⁻⁶	19.32	4.00 x 10 ⁻²¹	6.22 x 10 ⁻¹⁵	2.03 [1.70-2.43]	4.14 [3.47-4.93]
CDSN	Rs1576	-2327 C>G	S776C	33	4.17	3 x 10 ⁻⁵	14.29	4.88 x 10 ⁻¹⁶	6.47 x 10 ⁻¹²	1.79 [1.52-2.12]	3.22 [2.73-3.79]
	Rs1062470	971 C>T	UTR	37	4.52	6 x 10 ⁻⁶	7.63	3.08 x 10 ⁻⁹	3.15 x 10 ⁻⁷	1.54 [1.30-1.81]	2.36 [2.00-2.78]

^a Most common allele, according to NCBI, is given first

^b Minor Allele Frequency (%) estimated by FBAT in the two sets

^c Score and P-value given by the association test for minor allele under assumption of linkage, performed by FBAT

^d LOD score and P-value given by the association test performed by method using the More Powerful Quasi Linkage Score approach (MQLS)

^e Association test P-value, OR (Odds ratio) and 95% CI (95% confidence interval) obtained by method using Mixed-Effects Logistic models (LNM).

Supplementary Table S1. Results for all SNPs tested in Set I using FBAT and MQLS methods

Gene (Chr.)	N°	SNP ID ^a	Region ^b	Amino acid	Position ^c	Nucleotide change ^d	MAF ^e	Database ^f	FBAT			MQLS		
									MAF ^g	N ^h	Z ⁱ	P ^j	LOD ^k	P ^l
<i>JUN</i> (1p32)	1	rs2760494			29210289	T>C	14.2 ¹	H	8.6	46	-1.054	0.29	0.07	0.56
	2	rs2760496			29213947	A>C	35.8 ¹	H	25.2	87	-0.536	0.59	0.11	0.48
	3	rs997768			29216838	G>A	42.5 ¹	H	24.7	80	-0.451	0.65	0.11	0.48
	4	rs1323288	3'NG		29218034	T>G	37.1 ¹	D	23.3	84	-0.216	0.83	0.43	0.16
	5	rs11688	EX 1	Q250Q	29219912	G>A	6.7 ¹	H	2.6	18	-0.766	0.44	0.02	0.74
	6	rs4646999	5'NG		29222371	C>T	33.3 ²	D	40.1	96	-0.221	0.83	0.27	0.26
	7	rs17265089	5'NG		29222594	C>G	8.3 ²	D	2.6	23	-0.338	0.74	0.14	0.42
	8	rs11207306			29230798	C>T	37.5 ¹	H	25.5	86	0.073	0.94	0.24	0.30
<i>PTPN22</i> (1p13)	9	rs3811021	3' UTR		10264348	T>C	22.5 ¹	H	23	64	0.410	0.68	0.45	0.15
	10	rs2476599	IN 19		10271144	G>A	21.7 ¹	H	27.1	88	-1.744	0.08	0.29	0.25
	11	rs1217388	IN 19		10272161	A>G	27.5 ¹	H	21.5	73	0.567	0.57	0.28	0.26
	12	rs2476601 ¹	EX 14	W620R	10285253	G>A	14.2 ¹	H	7.3	38	-0.470	0.64	0.02	0.79
	13	rs1217414	IN 1		10320352	C>T	26.7 ¹	H	27.8	87	-1.777	0.07	0.40	0.18
	14	rs12730241	3' NG		2764371	G>A	11.4 ¹	H	14.2	68	1.008	0.31	0.23	0.30
<i>FLG</i> (1q21)	15	rs2065955	EX 3	G3436A	2767410	C>G	14.2 ¹	H	12.8	63	0.416	0.68	0.20	0.34
	16	rs2065958	EX 3	Y3105D	2768404	C>A	24.8 ¹	H						
	17	rs7522925	EX 3	A2108V	2771394	G>A	12.1 ¹	H	11.5	59	0.634	0.53	0.14	0.43
	18	FLG_3702delG²	EX 3	G1234GfsX1445	2774015	->G	NC	P						
	19	FLG_2282delA²	EX 3	S761CfsX796	2775432 ³ 35	->CAGT	3.4 ³	P						
	20	FLG_R501X ²	EX 3	R501X	2776216	C>T	5.8 ³	P	1.7	13	-1.793	0.07	7.23x10 ⁻⁵	0.86
	21	rs11582620	EX 3	R412R	2776481	A>G	13.3 ¹	H	9.7	46	-0.490	0.62	1.49x10 ⁻⁵	0.99
	22	rs1933063			2791576	G>A	8.3 ¹	H						
	23	rs1933064			2791931	G>A	44.2 ¹	H	42.9	97	1.390	0.17	0.12	0.47
	24	rs1858483			2800441	C>T	19.3 ¹	H	13.1	50	-3.285	0.001	0.45	0.15
	25	rs2050631			2802952	A>G	32.5 ¹	H	25.6	82	-1.216	0.22	0.04	0.68
	26	rs3120664			2803561	T>G	15 ¹	H	15.6	59	0.093	0.93	3.38x10 ⁻³	0.90
	27	rs3120665			2806945	A>G	14.2 ¹	H	13.2	56	-0.084	0.93	1.05x10 ⁻³	0.94
<i>ILIR1</i> (2q12)	28	rs2192752			4838958	A>C	25 ¹	D	22.9	83	-0.843	0.40	0.01	0.83
	29	rs3917335	IN 1		4840878	C>T	5.9 ¹	D	4.3	17	0.043	0.97	0.04	0.66
	30	rs871657	IN 1		4840926	C>T	14.2 ¹	D	19.7	80	1.233	0.22	0.40	0.18
	31	rs3917238	IN 1		4842668	C>T	38.1 ²	D						
	32	rs3917254	IN 2		4846103	G>A	5.8 ¹	H	9.6	35	0.234	0.82	0.02	0.78
	33	rs3917273	IN 2		4849304	A>T	37.3 ¹	D						
	34	rs3917289	IN 4		4851496	G>T	8.3 ¹	H	6.9	41	-0.769	0.44	0.02	0.76
<i>IL1A</i> (2q14)	35	rs997049	IN 4		4852018	A>T	43.3 ¹	H	11.5	37	-0.346	0.73	0.12	0.46
	36	rs3917296	IN 5		4854418	A>G	11.7 ¹	H	5.9	36	-0.330	0.74	0.14	0.43
	37	rs3917299	IN 6		4855671	A>G	7.5 ¹	H	20.7	91	0.319	0.75	0.70	0.07
	38	rs4848300			2235829	T>C	30.8 ¹	D	30.1	99	-0.017	0.99	0.29	0.25
39	rs3783550	IN 6		2240808	A>C	29.2 ¹	D							

40	rs3783548	IN 6		2241256	T>C	7 ²	D							
41	rs3783546	IN 6		2242753	G>C	29.2 ¹	H		30.1	99	-0.017	0.99	0.26	0.27
42	rs3783539	IN 4		2245502	G>A	23.7 ²	D		30.1	99	0.005	0.99	0.25	0.28
43	rs2856838	IN 3		2247895	C>T	40 ¹	D		49.3	101	-0.124	0.90	0.05	0.62
44	rs1800587 ³	5' UTR		2250883	C>T	30.8 ¹	P		21.7	86	0.404	0.69	0.55	0.11
45	rs1143643	IN 6		2296225	G>A	39.2 ¹	H		36.8	99	0.687	0.49	1.88x10 ⁻³	0.93
46	rs1143634	EX 5	F105F	2298313	C>T	22.3 ¹	D		18.9	76	-0.668	0.50	0.76	0.06
47	rs1143633	IN 4		2298390	G>A	39.7 ¹	D		36	100	0.423	0.67	0.02	0.75
48	rs3136558	IN 3		2299198	T>C	30.4 ²	D		18.1	72	-1.143	0.25	0.61	0.09
49	rs3136557	IN 3		2299265	C>T	21.7 ²	D							
50	rs3917356	IN 3		2300286	G>A	45 ²	D							
51	rs3917354	IN 3		2300818	T>-	23.9 ²	D		15.5	65	-1.068	0.29	0.59	0.10
52	rs1143629	IN 2		2301441	T>C	16.7 ²	D		35.1	98	-0.421	0.67	0.39	0.18
53	rs2592346	IN 1		2584946	T>C	25 ²	D		41.1	101	0.517	0.60	0.19	0.35
54	rs928940	IN 1		2585418	T>G	11.7 ¹	D		13.6	56	0.536	0.59	0.24	0.29
55	rs878972	IN 1		2585636	A>C	17.4 ²	D		26.6	89	0.167	0.87	0.03	0.73
56	rs315934	IN 1		2591629	A>G	28.3 ²	D		19.7	61	-0.973	0.33	1.34	0.01
57	rs3087262	IN 1		2592125	G>C	8.7 ²	D		14.3	56	0.220	0.83	0.15	0.40
58	rs1794067	IN 2		2594307	G>A	27.1 ¹	D		27.2	92	0.108	0.92	0.09	0.53
59	rs2232354	IN 3		2595258	T>G	28.6 ²	D							
60	rs579543	IN 4		2597554	C>T	27.1 ¹	D		28.3	92	0.415	0.68	0.13	0.45
61	rs315952	EX 5	S112S	2598227	T>C	25.8 ¹	H		27.8	80	-0.340	0.73	0.34	0.21
62	rs4252041	3' UTR		2598533	C>T	6.8 ¹	D		2.4	17	-0.983	0.33	0.06	0.59
63	rs2688992	IN 13		31300756	G>T	42.5 ¹	H		49.1	99	-1.325	0.18	0.07	0.58
64	rs651630 ⁴	IN 10		31306460	C>T	44.2 ¹	P		47.4	97	-0.269	0.79	4.95x10 ⁻³	0.88
65	rs564065	IN 10		31308668	G>C	45.8 ¹	H		52.9	94	-1.697	0.09	0.28	0.26
66	rs2993639	IN 10		31311042	T>C	46.7 ¹	H		41.9	98	1.632	0.10	0.44	0.16
67	rs481018	IN 9		31322684	T>A	38.1 ¹	H		49.7	101	0.793	0.43	0.29	0.25
68	rs658971	IN 8		31325461	G>A	14.2 ¹	H		21.2	80	1.453	0.15	1.60	0.007
69	rs2037236	IN 6		31336496	C>G	20.8 ¹	H							
70	rs9831295 ⁴	IN 6		31345269	A>G	25.9 ¹	P		21.3	64	-0.988	0.32	1.65x10 ⁻³	0.93
71	rs9813946⁴	IN 6		31345391	G/T	NC ²	P							
72	rs28986275 ⁴	IN 5		31350276	C>T	38 ²	P		16.8	66	-1.412	0.16	0.02	0.79
73	rs633055	IN 5		31369981	C>T	17.5 ¹	H		22.7	72	1.628	0.10	0.59	0.10
74	rs28986277 ⁴	IN 3		31401634	A>T	20 ²	P		15.6	52	-1.218	0.22	0.44	0.15
75	rs1980080	IN 2		31406987	A>G	30 ¹	H		32.9	93	-1.817	0.07	0.03	0.73
76	rs2137599	IN 2		31409791	T>C	33 ²	H		43.8	97	2.247	0.03	0.05	0.63
77	rs3763112 ⁵			34001493	G>A	37.1 ¹	P		38.9	96	0.083	0.93	1.41x10 ⁻⁴	0.98
78	rs1007602 ⁵			34017179	G>A	26.7 ¹	P		33.7	89	0.678	0.50	6.21x10 ⁻³	0.87
79	rs3792876 ⁵	IN 1		34052322	C>T	11.4 ¹	P		5.6	22	0.456	0.65	0.05	0.64
80	rs2073838 ⁵	IN 2		34064235	G>A	10.8 ¹	P		5.6	22	0.456	0.65	0.05	0.63
81	rs1050152 ⁶	EX 9	L503F	34091333	C>T	45.8 ¹	P		46.2	106	-0.478	0.63	0.15	0.40
82	rs2269822 ⁵			34173725	C>T	15.8 ¹	P		13.5	48	-0.680	0.50	0.18	0.36

83	rs2631367 ⁶	5' UTR	34120471	C/G	NC ²	P	46.8	109	1.043	0.30	0.08	0.54
84	rs671473	IN 1	34123548	G>T	23.3 ¹	H	29.3	87	1.573	0.12	4.65x10 ⁻³	0.88
85	rs274559	IN 3	34135083	T>C	35.3 ¹	H	36	95	2.034	0.04	0.06	0.60
86	rs11746555	IN 7	34142046	G>A	42.5 ¹	H	44	101	-0.764	0.45	0.06	0.60
87	rs2229463	3' UTR	5718355	T>C	15.5 ¹	D	12.4	54	-0.500	0.62	5.00x10 ⁻³	0.88
88	rs2855098	IN 14	5719380	G>C	14.6 ²	D	12.2	55	-0.180	0.86	2.99x10 ⁻³	0.91
89	rs1950494	IN 14	5721853	C>T	15 ¹	D	11.8	52	0.182	0.86	0.01	0.81
90	rs2855006	EX 7	5728134	C>A	15 ¹	H	21.4	78	0.071	0.94	0.13	0.45
91	rs7151201	IN 3	5729940	A>C	11.7 ¹	D	16.7	66	0.418	0.68	0.14	0.42
92	rs502157	IN 8	14319130	C>A	35.8 ¹	H	36.9	77	0.287	0.77	0.02	0.77
93	rs2241516	IN 8	14321204	G>C	9.2 ¹	H	11.8	43	1.427	0.15	0.03	0.70
94	rs11070398	IN 5	14325479	T>C	8.3 ²	D	13.2	47	1.443	0.15	0.03	0.71
95	rs525403	IN 5	14325653	G>A	33.3 ¹	H	35.2	78	0.116	0.91	8.50x10 ⁻³	0.84
96	rs542036	IN 5	14331696	T>C	28.3 ¹	H	26.5	71	-1.357	0.17	0.11	0.47
97	rs493177	IN 5	14333815	T>G	31.7 ¹	D	38.3	98	0.100	0.92	0.20	0.34
98	rs17778967	IN 2	14341379	G>A	4.2 ¹	D	2.3	11	0.177	0.86	0.06	0.60
99	rs2076752 ⁹	5' UTR	4345295 ⁹ 96	G>A	22 ²	P	33	92	-2.790	0.005	1.65	0.006
100	rs2111235	IN 2	4348168	C>T	25 ¹	D	29	92	0.848	0.40	0.86	0.05
101	rs8057341	IN 2	4352179	G>A	25.8 ¹	H	29.1	92	0.677	0.50	0.86	0.05
102	rs17221417	IN 2	4353781	C>G	35.8 ¹	H	35.5	91	-2.447	0.01	1.57	0.007
103	rs2066842	EX 4	4358823	C>T	36.2 ¹	H	7.4	31	-2.065	0.04	1.02	0.03
104	rs2066844 ^{7,8}	EX 4	4360125	C>T	11 ¹	P	36.2	107	1.612	0.11	0.16	0.39
105	rs7203691	IN 6	4367623	G>A	36.4 ²	D	36.5	108	1.462	0.14	0.24	0.29
106	rs10521209	IN 7	4369908	T>G	40.8 ¹	H	1	6	NC	NC	0.03	0.69
107	rs2066845 ⁷	EX 8	4370739	G>C	1.7 ¹	P	10.9	48	1.550	0.12	0.75	0.06
108	rs5743291	EX 9	4371475	G>A	10.8 ¹	H	33.3	99	0.122	0.90	0.11	0.49
109	rs1077861 ⁹	IN 10	4373746	A>T	25 ¹	P	37.3	108	1.063	0.29	0.06	0.60
110	rs2066847 ⁷	EX 11	4377977 ⁷ 8	->C	0 ²	P	49.3	106	1.490	0.14	0.12	0.46
111	rs5743293 ⁷	EX 11	4377980 ⁷ 81	->C	2.5 ²	P	39.4	103	1.476	0.14	0.42	0.16
112	rs3135500 ⁹	3' UTR	4381085	G>A	39.7 ¹	P	50.7	100	0.967	0.33	0.16	0.40
113	rs8056611		4381846	A>G	48.3 ¹	H	10.6	44	0.213	0.83	6.50x10 ⁻³	0.86
114	rs718226		4383762	A>G	43.3 ¹	H	51	101	0.944	0.35	0.23	0.30
115	rs3785142	IN 5	4401346	C>T	49.2 ¹	H	44.5	96	-1.109	0.27	0.37	0.19
116	rs12324931	IN 6	4404357	A>C	9.6 ¹	H	9.7	46	0.035	0.97	4.84x10 ⁻³	0.88
117	rs1420871	IN 11	4429631	G>A	6.7 ¹	H	13.5	56	-0.708	0.48	0.02	0.77
118	rs4027241	IN 13	4433765	G>A	49.2 ¹	H	51	100	-1.871	0.06	0.71	0.07
119	rs4785226	IN 15	4437163	C>A	49.1 ¹	H	50.4	104	-2.123	0.03	0.55	0.11
120	rs2066852	EX 18	4441717	C>T	6.7 ¹	H	49.3	106	1.490	0.14	0.12	0.46
121	rs2302759	IN 18	4441800	C>T	14.2 ¹	H	39.4	103	1.476	0.14	0.42	0.16
122	rs1861762		4453847	G>A	48.3 ¹	H	50.7	100	0.967	0.33	0.16	0.40
123	rs9635531		4455994	C>T	38.8 ¹	H	10.6	44	0.213	0.83	6.50x10 ⁻³	0.86
124	rs4785452		4456276	C>T	47.5 ¹	H	51	100	-1.871	0.06	0.71	0.07
125	rs4785453		4456361	C>T	49.1 ¹	H	50.4	104	-2.123	0.03	0.55	0.11

126	rs13332720	4457160	A>G	46.4 ¹	H	40.6	93	1.115	0.27	0.33	0.22
127	rs6500335	4457555	G>C	7.3 ¹	H	8.8	38	-0.134	0.89	0.01	0.82
128	rs16948851	4457608	A>G	6.9 ¹	H	8.9	42	-0.249	0.80	0.01	0.83
129	rs7205760	4458972	G>C	9.2 ¹	H	13.1	54	0.456	0.65	0.19	0.36
130	rs12925755	4460361	C>A	33.6 ¹	H	33	109	1.037	0.33	1.70	0.005
131	rs9906989	4180142	G>T	14.7 ¹	H	13.4	55	-0.109	0.91	0.04	0.68
132	rs1053004	4190388	T>C	41.7 ²	D	38.6	91	0.609	0.54	0.58	0.10
133	rs8074524	4193894	C>T	15.8 ¹	H	15.5	57	0.166	0.87	0.07	0.58
134	rs2293152	4205825	G>C	38.8 ¹	H	33	104	-1.868	0.06	0.03	0.73
135	rs2306580	4215976	C>G	10.8 ¹	H	9.5	36	0.722	0.47	0.37	0.19
136	rs3869550	4217183	A>G	37.5 ²	D	35.9	91	1.252	0.21	0.42	0.16
137	rs8069645	4219198	A>G	24.2 ¹	H	26	77	0.999	0.32	0.05	0.63
138	rs7217655	4220320	C>T	35 ¹	D	34.9	88	1.417	0.16	0.29	0.24
139	rs6503695	4223829	T>C	34.8 ¹	D	30.6	96	0.958	0.34	0.01	0.84
140	rs9891119	4232276	A>C	35.8 ¹	H						
141	rs17593222	4237286	C>G	10.2 ¹	D	8.8	34	0.875	0.38	0.31	0.23
142	rs744166	4238497	T>C	44.8 ¹	H	40.8	102	1.320	0.19	0.22	0.31
143	rs4796793	4266506	C>G	22.5 ¹	H	25	80	0.890	0.37	0.02	0.77
144	rs7420 ¹⁰	6691487	A>G	45.8 ¹	P	51	100	-0.195	0.85	0.21	0.33
145	rs734232 ¹⁰	6692003	G>A	44.9 ¹	P	41.7	99	-0.266	0.79	0.08	0.55
146	rs895691 ¹⁰	6692572	G>T	44 ¹	P	41.7	102	-0.159	0.87	0.09	0.51
147	rs12797 ¹⁰	6693265	C>T	45.8 ¹	P	42	99	-0.395	0.69	0.11	0.48
148	rs2305214 ¹⁰	6695242	C>T	49.1 ¹	P	41	100	-0.372	0.71	0.13	0.45
149	rs1564864 ¹⁰	1045584	T>C	35.4 ²	P	23.4	89	0.710	0.48	0.26	0.27
150	rs2019154¹⁰	1057883	C/T	NC ²	P						
151	rs869190 ¹⁰	1072132	G>T	37 ²	P	24.2	88	0.830	0.41	0.21	0.33
152	rs1061595	4166800	C>T	43 ²	D						
153	rs1205171	4174142	G>A	17.5 ¹	H	12.2	58	-0.593	0.55	0.02	0.74
154	rs404733 ¹¹	9432799	T>A	49.1 ¹	P	51.3	104	1.059	0.29	0.23	0.30
155	rs383483 ¹¹	9434688	G>A	49 ²	P	50.6	97	0.779	0.44	0.09	0.50
156	rs17882636* ¹¹	9443067	G>A	21.7 ²	P	18.7	75	-0.898	0.36	0.08	0.55
157	rs375947 ¹¹	9443253	A>G	37.5 ¹	P	28.6	85	-1.554	0.12	0.03	0.72
158	rs11086087 ¹¹	9454466	G>C	8.7 ²	P	9.9	46	-0.983	0.33	6.53x10 ⁻⁴	0.96
159	rs2305743* ¹¹	9455993	G>A	24.2 ¹	P	19.2	77	-1.390	0.16	0.01	0.84
160	rs436857* ¹¹	9460437	G>A	23.3 ¹	P	18.5	76	-0.936	0.35	0.03	0.73
161	rs393548* ¹¹	9460546	T>A	24.1 ¹	P	19.2	78	-0.975	0.33	0.04	0.68
162	rs214763	2218028	T>C	15.8 ¹	H	15.7	62	0.346	0.73	0.07	0.57
163	rs214814	2237790	G>A	8.5 ¹	H	10.5	48	-0.270	0.79	0.15	0.41
164	rs214817	2239329	A>G	17.5 ¹	H	18.2	78	0.791	0.43	0.42	0.16
165	rs214818	2240017	A>G	20.8 ¹	H	19.9	77	0.233	0.82	0.47	0.14
166	rs6106524	2248430	C>T	25 ¹	H	22.9	73	-0.708	0.48	0.44	0.16
167	rs2076408	2253059	A>C	19.2 ¹	H	18.2	88	-0.235	0.82	0.16	0.39
168	rs2422690	2257233	C>G	21.7 ¹	H						

169	rs214827	IN 11	2258723	G>C	41.7 ¹	H							
170	rs214831	3' UTR	2261363	G>A	37.5 ¹	H							
171	rs2422753	IN 1	2301684	T>C	18.3 ¹	H		25.6	79	0.452	0.65	0.38	0.19
172	rs2422764	IN 1	2308068	G>C	30.8 ¹	D		27.8	81	-1.097	0.27	0.04	0.66
173	rs1474678	IN 1	2310242	A>T	12.5 ¹	H		14	56	-1.167	0.24	0.01	0.80
174	rs2076405	EX 2	2315262	C>T	5.1 ¹	H	M58V	7.1	24	-0.857	0.39	4.00x10 ⁻³	0.89
175	rs6048642	IN 3	2316963	A>T	6.9 ¹	H							
176	rs6137891	IN 8	2324151	G>A	7.5 ¹	H							
177	rs6137902	IN 9	2327527	G>A	13.3 ¹	H							
178	rs7263876	IN 9	2331229	C>T	11.7 ¹	H							
179	rs6048880	IN 10	2347441	T>C	19.2 ¹	H							
180	rs2076650	IN 10	2350766	A>G	32.8 ¹	H							
181	rs2076649	IN 10	2350952	G>A	27.1 ²	D							

^a SNPs excluded for technical reasons are indicated in black bold,

and SNPs selected from the literature: ¹ associated with different autoimmune disorders such as T1D, RA and SLE (Bottini *et al.*, 2004; Begovich *et al.*, 2004; Smyth *et al.*, 2004; Kyogoku *et al.*, 2004; Velega *et al.*, 2004; meta-analysis Lee *et al.*, 2007), ² associated with atopic dermatitis, eczema-associated asthma and for ichthyosis vulgaris (Palmer *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007; Sandilands *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006), ³ associated with ankylosing spondylitis (Wu and Gu, 2007), ⁴ associated with psoriasis (Hüffmeier *et al.*, 2005), ⁵ associated with RA (Tokuhito *et al.*, 2003), ⁶ associated with Crohn's disease (Peltekova *et al.*, 2004), ⁷ associated with Crohn's disease (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001), ⁸ associated with PsA (Rahman *et al.*, 2003), ⁹ associated with asthma or allergic rhinocconjunctivitis (Weidinger *et al.*, 2005), ¹⁰ associated with psoriasis (Helms *et al.*, 2003), ¹¹ according to study on AD (Takahashi *et al.*, 2005), * indicated the results of SNPs taken of literature in spite of a problem of Hardy-Weinberg.

^b Intronic (IN), exonic (EX) or near gene (NG) position according to Reference sequence: NM_002228 for JUN., NM_015967 for PTPN22, NM_002016 for FLG, NM_000877 for IL1R1, NM_000575 for IL1A, NM_000576 for IL1B, NM_000577 for IL1RN, NM_024628 for SLC12A8, NM_003059 for SLC22A4, NM_003060 for SLC22A5, NM_000359 for TGM1, NM_004245 for TGM5, NM_022162 for CARD15, NM_015247 for CYLD, NM_003150 for STAT3, NM_015654 for SLC9A3R1/NAT9, NM_020761 for KIAA1303 raptor, NM_002229 for JUNB, NM_005535 for IL12RB1, NM_003245 for TGM3 and NM_198994 for TGM6.

^c Position according to Reference sequence: NT_032977.8 for JUN, NT_019273.18 for PTPN22, NT_004487.18 for FLG, NT_022171.14 for IL1R1, NT_022135.15 for IL1A, IL1B and IL1RN, NT_005612.15 for SLC12A8, NT_034772.5 for SLC22A4 and SLC22A5, NT_026437.11 for TGM1, NT_010194.16 for TGM5, NT_010498.15 for CARD15 and CYLD, NT_010753.15 for STAT3, NT_010641.15 for SLC9A3R1/NAT9, NT_024871.11 for KIAA1303 raptor, NT_011295.10 for JUNB and IL12RB1, NT_011387.8 for TGM3 and TGM6.

^d Most common allele, according to NCBI, is given first

^e Minor Allele Frequency according to NCBI; ¹ HapMap reference or ² dbSNP reference or according to ³ Palmer *et al.*, 2006, NC: not communicated

^f Selected SNPs according to database: HapMap (H) or dbSNP (D) or according to a paper (P)

^g Minor Allele Frequency, estimated by FBAT, in the set I, with reference minor allele according to NCBI

^h Number of informative nuclear families, estimated by FBAT, in three tests performed on Set I.

ⁱ Score given by the association test for minor allele performed by FBAT under assumption of no linkage.

^j FBAT association test P-value under assumption of no linkage. Significant P values are indicated in bold.

^k LOD score given for association calculated by method using the More Powerful Quasi Linkage Score approach (MQLS).

^l MQLS association test P-value.

Supplementary Table S2. Results for all tested SNPs after stratification according to presence or absence of HLA-Cw6 allele for Set I using FBAT

Gene (Chr.)	N°	SNP ID ^a	Nucleotide change ^b	MAF ^c	Not stratified				Stratified according to affected individuals carrying					
									HLA-Cw6			Not HLA-Cw6		
					MAF ^d	N ^e	Z ^f	P ^g	N ^e	Z ^f	P ^g	N ^e	Z ^f	P ^g
<i>JUN</i> (1p32)	1	rs2760494	T>C	14.2 ¹	8.6	46	-1.054	0.29	26	0.642	0.52	25	-1.991	0.05
	2	rs2760496	A>C	35.8 ¹	25.2	87	-0.536	0.59	59	0.743	0.46	43	-1.619	0.11
	3	rs997768	G>A	42.5 ¹	24.7	80	-0.451	0.65	54	0.676	0.50	40	-1.393	0.16
	4	rs1323288	T>G	37.1 ¹	23.3	84	-0.216	0.83	54	0.656	0.51	46	-1.002	0.32
	5	rs11688	G>A	6.7 ¹	2.6	18	-0.766	0.44	10	1.029	0.30	13	-1.620	0.11
	6	rs4646999	C>T	33.3 ²	40.1	96	-0.221	0.83	59	0.059	0.95	56	-0.384	0.70
	7	rs17265089	C>G	8.3 ²	2.6	23	-0.338	0.74	13	1.322	0.19	15	-1.546	0.12
	8	rs11207306	C>T	37.5 ¹	25.5	86	0.073	0.94	59	0.703	0.48	43	-0.689	0.49
<i>PTPN22</i> (1p13)	9	rs3811021	T>C	22.5 ¹	23	64	0.410	0.68	36	-0.498	0.62	37	1.222	0.22
	10	rs2476599	G>A	21.7 ¹	27.1	88	-1.744	0.08	52	-0.916	0.36	52	-1.538	0.12
	11	rs1217388	A>G	27.5 ¹	21.5	73	0.567	0.57	49	0.745	0.46	33	-0.052	0.96
	12	rs2476601 ¹	G>A	14.2 ¹	7.3	38	-0.470	0.64	23	-0.845	0.40	19	0.252	0.80
	13	rs1217414	C>T	26.7 ¹	27.8	87	-1.777	0.07	52	-1.127	0.26	51	-1.346	0.18
<i>FLG</i> (1q21)	14	rs12730241	G>A	11.4 ¹	14.2	68	1.008	0.31	45	0.895	0.37	32	0.429	0.67
	15	rs2065955	C>G	14.2 ¹	12.8	63	0.416	0.68	43	0.319	0.75	28	0.236	0.81
	16	rs2065958	C>A	24.8 ¹										
	17	rs7522925	G>A	12.1 ¹	11.5	59	0.634	0.53	42	0.739	0.46	25	0.031	0.98
	18	FLG_3702delG²	->G	NC										
	19	FLG_2282del4²	->CAGT	3.4 ³										
	20	FLG_R501X ²	C>T	5.8 ³	1.7	13	-1.793	0.07	9	***	***	5	***	***
	21	rs11582620	A>G	13.3 ¹	9.7	46	-0.490	0.62	29	0.000	1.0	25	-0.703	0.48
	22	rs1933063	G>A	8.3 ¹										
	23	rs1933064	G>A	44.2 ¹	42.9	97	1.390	0.17	58	-0.792	0.43	52	2.793	0.005
	24	rs1858483	C>T	19.3 ¹	13.1	50	-3.285	0.001	26	-2.300	0.02	35	-2.226	0.02
25	rs2050631	A>G	32.5 ¹	25.6	82	-1.216	0.22	52	-0.739	0.46	45	-0.910	0.36	
26	rs3120664	T>G	15 ¹	15.6	59	0.093	0.93	42	0.269	0.79	28	-0.196	0.84	
27	rs3120665	A>G	14.2 ¹	13.2	56	-0.084	0.93	39	-0.030	0.98	27	-0.092	0.93	
<i>ILIR1</i> (2q12)	28	rs2192752	A>C	25 ¹	22.9	83	-0.843	0.40	53	0.669	0.50	43	-2.009	0.05
	29	rs3917335	C>T	5.9 ¹	4.3	17	0.043	0.97	9	***	***	11	0.205	0.84
	30	rs871657	C>T	14.2 ¹	19.7	80	1.233	0.22	50	0.694	0.49	45	1.045	0.30
	31	rs3917238	C>T	38.1 ²										
	32	rs3917254	G>A	5.8 ¹	9.6	35	0.234	0.82	22	0.577	0.56	19	-0.310	0.76
	33	rs3917273	A>T	37.3 ¹										
	34	rs3917289	G>T	8.3 ¹	6.9	41	-0.769	0.44	28	-0.413	0.68	20	-0.640	0.52
	35	rs997049	A>T	43.3 ¹										
	36	rs3917296	A>G	11.7 ¹	11.5	37	-0.346	0.73	23	-1.424	0.15	21	1.059	0.29
	37	rs3917299	A>G	7.5 ¹	5.9	36	-0.330	0.74	27	-0.152	0.88	16	-0.310	0.76
<i>IL1A</i> (2q14)	38	rs4848300	T>C	30.8 ¹	20.7	91	0.319	0.75	57	0.510	0.61	49	-0.134	0.89
	39	rs3783550	A>C	29.2 ¹	30.1	99	-0.017	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.125	0.26
	40	rs3783548	T>C	7 ²										
	41	rs3783546	G>C	29.2 ¹	30.1	99	-0.017	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.125	0.26
	42	rs3783539	G>A	23.7 ²	30.1	99	0.005	0.99	58	-1.094	0.27	52	1.159	0.25
	43	rs2856838	C>T	40 ¹	49.3	101	-0.124	0.90	63	0.386	0.70	51	-0.599	0.55
	44	rs1800587 ³	C>T	30.8 ¹	21.7	86	0.404	0.69	54	1.047	0.30	46	-0.629	0.53
	45	rs1143643	G>A	39.2 ¹	36.8	99	0.687	0.49	59	0.370	0.71	53	0.584	0.56
<i>IL1B</i> (2q14)	46	rs1143634	C>T	22.3 ¹	18.9	76	-0.668	0.50	46	0.534	0.59	43	-1.454	0.15
	47	rs1143633	G>A	39.7 ¹	36	100	0.423	0.67	60	0.353	0.72	54	0.224	0.82
	48	rs3136558	T>C	30.4 ²	18.1	72	-1.143	0.25	41	-0.079	0.94	44	-1.436	0.15

	161	rs393548* ¹¹	T>A	24.1 ¹	19.2	78	-0.975	0.33	44	-1.240	0.22	42	-0.007	0.99
TGM3 (20p13)	162	rs214763	T>C	15.8 ¹	15.7	62	0.346	0.73	43	0.153	0.88	28	0.383	0.70
	163	rs214814	G>A	8.5 ¹	10.5	48	-0.270	0.79	33	-0.776	0.44	28	0.503	0.62
	164	rs214817	A>G	17.5 ¹	18.2	78	0.791	0.43	56	0.729	0.47	35	0.304	0.76
	165	rs214818	A>G	20.8 ¹	19.9	77	0.233	0.82	56	0.322	0.75	33	-0.067	0.95
	166	rs6106524	C>T	25 ¹	22.9	73	-0.708	0.48	46	-0.727	0.47	40	-0.230	0.82
	167	rs2076408	A>C	19.2 ¹	18.2	88	-0.235	0.82	56	-0.694	0.49	41	0.445	0.66
	168	rs2422690	C>G	21.7 ¹										
	169	rs214827	G>C	41.7 ¹										
	170	rs214831	G>A	37.5 ¹										
TGM6 (20p13)	171	rs2422753	T>C	18.3 ¹	25.6	79	0.452	0.65	51	0.253	0.80	41	0.367	0.71
	172	rs2422764	G>C	30.8 ¹	27.8	81	-1.097	0.27	47	-0.756	0.45	45	-0.760	0.45
	173	rs1474678	A>T	12.5 ¹	14	56	-1.167	0.24	34	0.126	0.90	31	-1.758	0.08
	174	rs2076405	C>T	5.1 ¹										
	175	rs6048642	A>T	6.9 ¹	7.1	24	-0.857	0.39	17	-0.301	0.76	14	-0.894	0.37
	176	rs6137891	G>A	7.5 ¹										
	177	rs6137902	G>A	13.3 ¹										
	178	rs7263876	C>T	11.7 ¹	11.5	46	0.469	0.64	27	0.084	0.93	25	0.596	0.55
	179	rs6048880	T>C	19.2 ¹	18.3	76	-0.889	0.37	47	0.224	0.82	42	-1.555	0.12
	180	rs2076650	A>G	32.8 ¹	33.8	100	-0.473	0.64	64	0.536	0.59	52	-1.496	0.14
	181	rs2076649	G>A	27.1 ²	33.9	96	-0.250	0.80	61	0.769	0.44	51	-1.431	0.15

^a SNPs excluded for technical reasons are indicated in black bold, and SNPs selected from the literature: ¹ associated with different autoimmune disorders such as T1D, RA, SLE (Bottini *et al.*, 2004, Begovich *et al.*, 2004, Smyth *et al.*, 2004; Kyogoku *et al.*, 2004, Velega *et al.*, 2004; meta-analysis Lee *et al.*, 2007), ² associated with atopic dermatitis, eczema-associated asthma and for ichthyosis vulgaris (Palmer *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007; Sandilands *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006), ³ associated with ankylosing spondylitis (Wu and Gu, 2007), ⁴ associated with psoriasis (Hüffmeier *et al.*, 2005), ⁵ associated with RA (Tokuhiro *et al.*, 2003), ⁶ associated with Crohn's disease (Peltekova *et al.*, 2004), ⁷ associated with Crohn's disease (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001), ⁸ associated with PsA (Rahman *et al.*, 2003), ⁹ associated with asthma or allergic rhinoconjunctivitis (Weidinger *et al.*, 2005), ¹⁰ associated with psoriasis (Helms *et al.*, 2003), ¹¹ according to study on AD (Takahashi *et al.*, 2005), * indicated the results of SNPs taken of literature in spite of a problem of Hardy-Weinberg.

^b Most common allele, according to NCBI, is given first.

^c Minor Allele Frequency according to NCBI: ¹ HapMap reference or ² dbSNP reference or according to ³ Palmer *et al.*, 2006, NC: not communicated

^d Minor Allele Frequency, estimated by FBAT, in the set I, with reference minor allele according to NCBI

^e Number of informative nuclear families estimated by FBAT in three tests performed on Set I: 1-without stratification of families, 2-with stratification according to affected individuals carrying the risk haplotype, HLA-Cw6 and 3-according to affected individuals not carrying the HLA-Cw6 haplotype.

^f Score given by the association test for minor allele performed by FBAT under assumption of no linkage.

^g FBAT association test P-value under assumption of no linkage. Significant P-values are indicated in bold and '***' indicates that association test could not be performed due to insufficient number of informative families.

Bibliographie

- [Abecasis et al., 2002] Abecasis, G. R., Cherny, S. S., Cookson, W. O., and Cardon, L. R. (2002). Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*, 30(1) :97–101.
- [Abel and Muller-Myhsok, 1998] Abel, L. and Muller-Myhsok, B. (1998). Robustness and power of the maximum-likelihood-binomial and maximum-likelihood-score methods, in multipoint linkage analysis of affected-sibship data. *Am J Hum Genet*, 63(2) :638–47.
- [Abrams et al., 2000] Abrams, J. R., Kelley, S. L., Hayes, E., Kikuchi, T., Brown, M. J., Kang, S., Lebwohl, M. G., Guzzo, C. A., Jegasothy, B. V., Linsley, P. S., and Krueger, J. G. (2000). Blockade of t lymphocyte costimulation with cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (ctla4ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med*, 192(5) :681–94.
- [Allen et al., 2003] Allen, M., Barker, J., A., B., A., B., N., C., and F., C. (2003). The international psoriasis genetics study : assessing linkage to 14 candidate susceptibility loci in a cohort of 942 affected sib pairs. *Am J Hum Genet*, 73(2) :430–7.
- [Allen et al., 2001] Allen, M., Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J., Davison, S., Iizuka, H., Simon, M., Guerrin, M., Hayday, A., Vaughan, R., Serre, G., Trembath, R., and Barker, J. (2001). Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. *Lab Invest*, 81(7) :969–76.
- [Allen et al., 1999] Allen, M. H., Veal, C., Faassen, A., Powis, S. H., Vaughan, R. W., Trembath, R. C., and Barker, J. N. (1999). A non-hla gene within the mhc in psoriasis. *Lancet*, 353(9164) :1589–90.
- [Ameen et al., 2005] Ameen, M., Allen, M. H., Fisher, S. A., Lewis, C. M., Cutthbert, A., Kondeatis, E., Vaughan, R. W., Murakami, H., Nakagawa, H., and

- Barker, J. N. (2005). Corneodesmosin (*cdsn*) gene association with psoriasis vulgaris in caucasian but not in japanese populations. *Clin Exp Dermatol*, 30(4) :414–8.
- [Asensi et al., 2003] Asensi, V., Alvarez, V., Valle, E., Meana, A., Fierer, J., Coto, E., Carton, J. A., Maradona, J. A., Paz, J., Dieguez, M. A., de la Fuente, B., Moreno, A., Rubio, S., Tuya, M. J., Sarasua, J., Llames, S., and Arribas, J. M. (2003). Il-1 alpha (-889) promoter polymorphism is a risk factor for osteomyelitis. *Am J Med Genet A*, 119A(2) :132–6.
- [Asumalahti et al., 2003a] Asumalahti, K., Ameen, M., Suomela, S., Hagforsen, E., Michaelsson, G., Evans, J., Munro, M., Veal, C., Allen, M., Leman, J., David Burden, A., Kirby, B., Connolly, M., Griffiths, C. E., Trembath, R. C., Kere, J., Saarialho-Kere, U., and Barker, J. N. (2003a). Genetic analysis of psors1 distinguishes guttate psoriasis and palmoplantar pustulosis. *J Invest Dermatol*, 120(4) :627–32.
- [Asumalahti et al., 2000] Asumalahti, K., Laitinen, T., Itkonen-Vatjus, R., Lokki, M. L., Suomela, S., Snellman, E., Saarialho-Kere, U., and Kere, J. (2000). A candidate gene for psoriasis near *hla-c*, *hcr* (*pg8*), is highly polymorphic with a disease-associated susceptibility allele. *Hum Mol Genet*, 9(10) :1533–42.
- [Asumalahti et al., 2003b] Asumalahti, K., Laitinen, T., Lahermo, P., Suomela, S., Itkonen-Vatjus, R., Jansen, C., Karvonen, J., Karvonen, S. L., Reunala, T., Snellman, E., Uurasmaa, T., Saarialho-Kere, U., and Kere, J. (2003b). Psoriasis susceptibility locus on 18p revealed by genome scan in finnish families not associated with psors1. *J Invest Dermatol*, 121(4) :735–40.
- [Asumalahti et al., 2003c] Asumalahti, K., Saarialho-Kere, U., and Kere, J. (2003c). [the pathogenesis of psoriasis—investigating the genetics of a multifactorial disease]. *Duodecim*, 119(16) :1517–22.
- [Asumalahti et al., 2002] Asumalahti, K., Veal, C., Laitinen, T., Suomela, S., Allen, M., Elomaa, O., Moser, M., de Cid, R., Ripatti, S., Vorechovsky, I., Marcusson, J. A., Nakagawa, H., Lazaro, C., Estivill, X., Capon, F., Novelli, G., Saarialho-Kere, U., Barker, J., Trembath, R., and Kere, J. (2002). Coding haplotype analysis supports *hcr* as the putative susceptibility gene for psoriasis at the *mhc psors1* locus. *Hum Mol Genet*, 11(5) :589–97.
- [Balding et al., 2003] Balding, J., Kane, D., Livingstone, W., Mynett-Johnson, L., Bresnihan, B., Smith, O., and FitzGerald, O. (2003). Cytokine gene polymorphisms : association with psoriatic arthritis susceptibility and severity. *Arthritis Rheum*, 48(5) :1408–13.
- [Balendran et al., 1999] Balendran, N., Clough, R. L., Arguello, J. R., Barber, R., Veal, C., Jones, A. B., Rosbotham, J. L., Little, A. M., Madrigal, A., Barker,

- J. N., Powis, S. H., and Trembath, R. C. (1999). Characterization of the major susceptibility region for psoriasis at chromosome 6p21.3. *J Invest Dermatol*, 113(3) :322–8.
- [Barker, 1991] Barker, J. N. (1991). The pathophysiology of psoriasis. *Lancet*, 338(8761) :227–30.
- [Barker et al., 2007] Barker, J. N., Palmer, C. N., Zhao, Y., Liao, H., Hull, P. R., Lee, S. P., Allen, M. H., Meggitt, S. J., Reynolds, N. J., Trembath, R. C., and McLean, W. H. (2007). Null mutations in the flaggrin gene (flg) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol*, 127(3) :564–7.
- [Barton et al., 2005] Barton, A., Eyre, S., Bowes, J., Ho, P., John, S., and Worthington, J. (2005). Investigation of the slc22a4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a japanese population) in a united kingdom population of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 52(3) :752–8.
- [Begovich et al., 2004] Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., Ardlie, K. G., Huang, Q., Smith, A. M., Spoerke, J. M., Conn, M. T., Chang, M., Chang, S. Y., Saiki, R. K., Catanese, J. J., Leong, D. U., Garcia, V. E., McAllister, L. B., Jeffery, D. A., Lee, A. T., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L. A., Seldin, M. F., Kastner, D. L., Amos, C. I., Sninsky, J. J., and Gregersen, P. K. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (ptpn22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75(2) :330–7.
- [Bessis et al., 2005a] Bessis, D., Brun, P., Guilhou, J., Le Maître, M., Ortonne, J., and Samuelson, M. (2005a). *Le Psoriasis en médecine générale*, chapter 3, pages 84–107. Arnette.
- [Bessis et al., 2005b] Bessis, D., Brun, P., Guilhou, J., Le Maître, M., Ortonne, J., and Samuelson, M. (2005b). *Le Psoriasis en médecine générale*, chapter 3, pages 109–113. Arnette.
- [Bhalerao and Bowcock, 1998] Bhalerao, J. and Bowcock, A. M. (1998). The genetics of psoriasis : a complex disorder of the skin and immune system. *Hum Mol Genet*, 7(10) :1537–45.
- [Bignell et al., 2000] Bignell, G. R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P. J., Lakhani, S. R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D. G., Schrandt-Stumpel, C., Beemer, F. A., van Den Ouweland, A., Halley, D., Delpech, B., Cleveland, M. G., Leigh, I., Leisti, J., and Rasmussen, S. (2000). Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*, 25(2) :160–5.

- [Birnbaum et al., 2006] Birnbaum, R. Y., Zvulunov, A., Hallel-Halevy, D., Cagnano, E., Finer, G., Ofir, R., Geiger, D., Silberstein, E., Feferman, Y., and Birk, O. S. (2006). Seborrhea-like dermatitis with psoriasiform elements caused by a mutation in *znf750*, encoding a putative c2h2 zinc finger protein. *Nat Genet*, 38(7) :749–51.
- [Blackwelder and Elston, 1985] Blackwelder, W. C. and Elston, R. C. (1985). A comparison of sib-pair linkage tests for disease susceptibility loci. *Genet Epidemiol*, 2(1) :85–97.
- [Blakemore et al., 1994] Blakemore, A. I., Tarlow, J. K., Cork, M. J., Gordon, C., Emery, P., and Duff, G. W. (1994). Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 37(9) :1380–5.
- [Bois and Jollet, 2004] Bois, M. and Jollet, I. (2004). Hla-cw, -dqb1 and -drb1 alleles in a population from west france. *Hum Immunol*, 65 :940–43.
- [Bonney, 1986] Bonney, G. E. (1986). Regressive logistic models for familial disease and other binary traits. *Biometrics*, 42(3) :611–25.
- [Borgiani et al., 2002] Borgiani, P., Vallo, L., D’Apice, M. R., Giardina, E., Pucci, S., Capon, F., Nistico, S., Chimenti, S., Pallone, F., and Novelli, G. (2002). Exclusion of *card15/nod2* as a candidate susceptibility gene to psoriasis in the italian population. *Eur J Dermatol*, 12(6) :540–2.
- [Bottini et al., 2004] Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G. F., Lucarelli, P., Pellecchia, M., Eisenbarth, G. S., Comings, D., and Mustelin, T. (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type i diabetes. *Nat Genet*, 36(4) :337–8.
- [Bottini et al., 2006] Bottini, N., Vang, T., Cucca, F., and Mustelin, T. (2006). Role of *ptpn22* in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol*, 18(4) :207–13.
- [Bowcock, 2005] Bowcock, A. M. (2005). The genetics of psoriasis and autoimmunity. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 6 :93–122.
- [Bowcock and Cookson, 2004] Bowcock, A. M. and Cookson, W. O. (2004). The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1 :R43–55.
- [Bowcock and Krueger, 2005] Bowcock, A. M. and Krueger, J. G. (2005). Getting under the skin : the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol*, 5(9) :699–711.
- [Brookes, 1999] Brookes, A. J. (1999). The essence of snps. *Gene*, 234(2) :177–86.

- [Brown, 2002] Brown, T. (2002). *Genomes 2*, chapter 5, page 130. Bios Scientific Publishers.
- [Butt et al., 2006] Butt, C., Peddle, L., Greenwood, C., Hamilton, S., Gladman, D., and Rahman, P. (2006). Association of functional variants of ptpn22 and tp53 in psoriatic arthritis : a case-control study. *Arthritis Res Ther*, 8(1) :R27.
- [Butt et al., 2005] Butt, C., Sun, S., Greenwood, C., Gladman, D., and Rahman, P. (2005). Lack of association of slc22a4, slc22a5, slc9a3r1 and runx1 variants in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 44(6) :820–1.
- [Cambien et al., 1992] Cambien, F., Poirier, O., Lecerf, L., Evans, A., Cambou, J. P., Arveiler, D., Luc, G., Bard, J. M., Bara, L., Ricard, S., and et al. (1992). Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 359(6396) :641–4.
- [Camp et al., 1990] Camp, R. D., Fincham, N. J., Ross, J. S., Bacon, K. B., and Gearing, A. J. (1990). Leukocyte chemoattractant cytokines of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 95(6 Suppl) :108S–110S.
- [Campion, 2001] Campion, D. (2001). Dissection génétique des maladies à hérédité complexe. *Med Sci*, 11(17) :1139–48.
- [Candi et al., 2005] Candi, E., Schmidt, R., and Melino, G. (2005). The cornified envelope : a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4) :328–40.
- [Capon et al., 2004a] Capon, F., Allen, M. H., Ameen, M., Burden, A. D., Tillman, D., Barker, J. N., and Trembath, R. C. (2004a). A synonymous snp of the corneodesmosin gene leads to increased mrna stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Hum Mol Genet*, 13(20) :2361–8.
- [Capon et al., 2007] Capon, F., Di Meglio, P., Szaub, J., Prescott, N. J., Dunster, C., Baumber, L., Timms, K., Gutin, A., Abkevic, V., Burden, A. D., Lanchbury, J., Barker, J. N., Trembath, R. C., and Nestle, F. O. (2007). Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (il23r) and its ligand (il12b) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*, 122(2) :201–206.
- [Capon et al., 2004b] Capon, F., Helms, C., Veal, C. D., Tillman, D., Burden, A. D., Barker, J. N., Bowcock, A. M., and Trembath, R. C. (2004b). Genetic analysis of psors2 markers in a uk dataset supports the association between raptor snps and familial psoriasis. *J Med Genet*, 41(6) :459–60.
- [Capon et al., 1999a] Capon, F., Novelli, G., Semprini, S., Clementi, M., Nudo, M., Vultaggio, P., Mazzanti, C., Gobello, T., Botta, A., Fabrizi, G., and Dal-lapiccola, B. (1999a). Searching for psoriasis susceptibility genes in italy : genome scan and evidence for a new locus on chromosome 1. *J Invest Dermatol*, 112(1) :32–5.

- [Capon et al., 2001] Capon, F., Semprini, S., Chimenti, S., Fabrizi, G., Zamburino, G., Murgia, S., Carcassi, C., Fazio, M., Mingarelli, R., Dallapiccola, B., and Novelli, G. (2001). Fine mapping of the psors4 psoriasis susceptibility region on chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 116(5) :728–30.
- [Capon et al., 1999b] Capon, F., Semprini, S., Dallapiccola, B., and Novelli, G. (1999b). Evidence for interaction between psoriasis-susceptibility loci on chromosomes 6p21 and 1q21. *Am J Hum Genet*, 65(6) :1798–800.
- [Capon et al., 2003] Capon, F., Toal, I. K., Evans, J. C., Allen, M. H., Patel, S., Tillman, D., Burden, D., Barker, J. N., and Trembath, R. C. (2003). Haplotype analysis of distantly related populations implicates corneodesmosin in psoriasis susceptibility. *J Med Genet*, 40(6) :447–52.
- [Cargill et al., 1999] Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C. R., Lim, E. P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G. Q., and Lander, E. S. (1999). Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22(3) :231–8.
- [Cargill et al., 2007] Cargill, M., Schrodi, S. J., Chang, M., Garcia, V. E., Brandon, R., Callis, K. P., Matsunami, N., Ardlie, K. G., Civello, D., Catanese, J. J., Leong, D. U., Panko, J. M., McAllister, L. B., Hansen, C. B., Papenfuss, J., Prescott, S. M., White, T. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G., and Begovich, A. B. (2007). A large-scale genetic association study confirms il12b and leads to the identification of il23r as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*, 80(2) :273–90.
- [Carlton et al., 2005] Carlton, V. E., Hu, X., Chokkalingam, A. P., Schrodi, S. J., Brandon, R., Alexander, H. C., Chang, M., Catanese, J. J., Leong, D. U., Ardlie, K. G., Kastner, D. L., Seldin, M. F., Criswell, L. A., Gregersen, P. K., Beasley, E., Thomson, G., Amos, C. I., and Begovich, A. B. (2005). Ptpn22 genetic variation : evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 77(4) :567–81.
- [Cassidy et al., 2005] Cassidy, A. J., van Steensel, M. A., Steijlen, P. M., van Geel, M., van der Velden, J., Morley, S. M., Terrinoni, A., Melino, G., Candi, E., and McLean, W. H. (2005). A homozygous missense mutation in tgm5 abolishes epidermal transglutaminase 5 activity and causes acral peeling skin syndrome. *Am J Hum Genet*, 77(6) :909–17.
- [Cebrian et al., 2005] Cebrian, A., Lesueur, F., Martin, S., Leyland, J., Ahmed, S., Luccarini, C., Smith, P. L., Luben, R., Whittaker, J., Pharoah, P. D., Dunning, A. M., and Ponder, B. A. (2005). Polymorphisms in the initiators of ret (rearranged during transfection) signaling pathway and susceptibility to sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(11) :6268–74.

- [Chae et al., 2003] Chae, S. C., Yoon, K. H., and Chung, H. T. (2003). Identification of novel polymorphisms in the adam33 gene. *J Hum Genet*, 48(5) :278–81.
- [Chamaillard et al., 2003] Chamaillard, M., Philpott, D., Girardin, S. E., Zouali, H., Lesage, S., Chareyre, F., Bui, T. H., Giovannini, M., Zaehring, U., Penard-Lacronique, V., Sansonetti, P. J., Hugot, J. P., and Thomas, G. (2003). Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(6) :3455–60.
- [Chang et al., 2008a] Chang, M., Li, Y., Yan, C., Callis-Duffin, K. P., Matsunami, N., Garcia, V. E., Cargill, M., Civello, D., Bui, N., Catanese, J. J., Leppert, M. F., Krueger, G. G., Begovich, A. B., and Schrodi, S. J. (2008a). Variants in the 5q31 cytokine gene cluster are associated with psoriasis. *Genes Immun*, 9(2) :176–81.
- [Chang et al., 2008b] Chang, Y. C., Wu, W. M., Chen, C. H., Hu, C. F., and Hsu, L. A. (2008b). Association between p478s polymorphism of the filaggrin gene and risk of psoriasis in a chinese population in taiwan. *Arch Dermatol Res*, 300(3) :133–7.
- [Chang et al., 2006] Chang, Y. T., Chou, C. T., Shiao, Y. M., Lin, M. W., Yu, C. W., Chen, C. C., Huang, C. H., Lee, D. D., Liu, H. N., Wang, W. J., and Tsai, S. F. (2006). Psoriasis vulgaris in chinese individuals is associated with psors1c3 and cdsn genes. *Br J Dermatol*, 155(4) :663–9.
- [Chang et al., 2007] Chang, Y. T., Chou, C. T., Yu, C. W., Lin, M. W., Shiao, Y. M., Chen, C. C., Huang, C. H., Lee, D. D., Liu, H. N., Wang, W. J., and Tsai, S. F. (2007). Cytokine gene polymorphisms in chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 156(5) :899–905.
- [Chang et al., 2004] Chang, Y. T., Shiao, Y. M., Chin, P. J., Liu, Y. L., Chou, F. C., Wu, S., Lin, Y. F., Li, L. H., Lin, M. W., Liu, H. N., and Tsai, S. F. (2004). Genetic polymorphisms of the hcr gene and a genomic segment in close proximity to hla-c are associated with patients with psoriasis in taiwan. *Br J Dermatol*, 150(6) :1104–11.
- [Chang et al., 2003] Chang, Y. T., Tsai, S. F., Lee, D. D., Shiao, Y. M., Huang, C. Y., Liu, H. N., Wang, W. J., and Wong, C. K. (2003). A study of candidate genes for psoriasis near hla-c in chinese patients with psoriasis. *Br J Dermatol*, 148(3) :418–23.
- [Chen et al., 2006] Chen, X., Tan, Z., Yue, Q., Liu, H., Liu, Z., and Li, J. (2006). The expression of interleukin-23 (p19/p40) and inteleukin-12 (p35/p40) in psoriasis skin. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 26(6) :750–2.
- [Chia et al., 2001] Chia, N. V., Stuart, P., Nair, R. P., Henseler, T., Jenisch, S., Lim, H. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2001). Varia-

- tions in the hcr (pg8) gene are unlikely to be causal for familial psoriasis. *J Invest Dermatol*, 116(5) :823–4.
- [Christophers, 2001] Christophers, E. (2001). Psoriasis—epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, 26(4) :314–20.
- [Cloutier and Veillette, 1999] Cloutier, J. F. and Veillette, A. (1999). Cooperative inhibition of t-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med*, 189(1) :111–21.
- [Consortium, 2003] Consortium, T. I. H. (2003). The international hapmap project. *Nature*, 426(6968) :789–96.
- [Consortium, 2005] Consortium, T. I. H. (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, 437(7063) :1299–320.
- [Cookson et al., 2001] Cookson, W. O., Ubhi, B., Lawrence, R., Abecasis, G. R., Walley, A. J., Cox, H. E., Coleman, R., Leaves, N. I., Trembath, R. C., Moffatt, M. F., and Harper, J. I. (2001). Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet*, 27(4) :372–3.
- [Cox et al., 1999] Cox, A., Camp, N. J., Cannings, C., di Giovine, F. S., Dale, M., Worthington, J., John, S., Ollier, W. E., Silman, A. J., and Duff, G. W. (1999). Combined sib-tdt and tdt provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet*, 8(9) :1707–13.
- [Criswell et al., 2005] Criswell, L. A., Pfeiffer, K. A., Lum, R. F., Gonzales, B., Novitzke, J., Kern, M., Moser, K. L., Begovich, A. B., Carlton, V. E., Li, W., Lee, A. T., Ortmann, W., Behrens, T. W., and Gregersen, P. K. (2005). Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (madgc) collection : the ptpn22 620w allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet*, 76(4) :561–71.
- [de Bakker et al., 2005] de Bakker, P. I., Yelensky, R., Pe'er, I., Gabriel, S. B., Daly, M. J., and Altshuler, D. (2005). Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet*, 37(11) :1217–23.
- [Demenais et al., 1996] Demenais, F., Martinez, M., and Lathrop, M. (1996). Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles. *Ann Instit Pasteur*, 7(1) :3–12.
- [Derrickson and Tortora, 2007] Derrickson, D. and Tortora, G. (2007). *Principes d'anatomie et de physiologie*, chapter 5, pages 155–60. de boeck.
- [Dib et al., 1996] Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., and Weissenbach, J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 380(6570) :152–4.

- [Diehl et al., 1999] Diehl, S. R., Wang, Y., Brooks, C. N., Burmeister, J. A., Califano, J. V., Wang, S., and Schenkein, H. A. (1999). Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 70(4) :418–30.
- [Dubois and Gebuhrer, 2004] Dubois, V. and Gebuhrer, L. (2004). Hla-a, -b, -cw, -dqb1, -dqb1 and -drb1 alleles and kir gene frequencies in a population from south east france. *Hum Immunol*, 65 :937–39.
- [Duffy et al., 1993] Duffy, D. L., Spelman, L. S., and Martin, N. G. (1993). Psoriasis in australian twins. *J Am Acad Dermatol*, 29(3) :428–34.
- [Duvic, 1990] Duvic, M. (1990). Immunology of aids related to psoriasis. *J Invest Dermatol*, 95(5 Suppl) :38S–40S.
- [Elder, 2006] Elder, J. T. (2006). Psors1 : linking genetics and immunology. *J Invest Dermatol*, 126(6) :1205–6.
- [Elder et al., 1994] Elder, J. T., Nair, R. P., Guo, S. W., Henseler, T., Christophers, E., and Voorhees, J. J. (1994). The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol*, 130(2) :216–24.
- [Elomaa et al., 2004] Elomaa, O., Majuri, I., Suomela, S., Asumalahti, K., Jiao, H., Mirzaei, Z., Rozell, B., Dahlman-Wright, K., Pispala, J., Kere, J., and Saarialho-Kere, U. (2004). Transgenic mouse models support her as an effector gene in the psors1 locus. *Hum Mol Genet*, 13(15) :1551–61.
- [Enerback et al., 1997] Enerback, C., Martinsson, T., Inerot, A., Wahlstrom, J., Enlund, F., Yhr, M., and Swanbeck, G. (1997). Evidence that hla-cw6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (pcr-ssp). *Acta Derm Venereol*, 77(4) :273–6.
- [Enerback et al., 2000] Enerback, C., Nilsson, S., Enlund, F., Inerot, A., Samuelsson, L., Wahlstrom, J., Swanbeck, G., and Martinsson, T. (2000). Stronger association with hla-cw6 than with corneodesmosin (s-gene) polymorphisms in swedish psoriasis patients. *Arch Dermatol Res*, 292(11) :525–30.
- [Enlund et al., 1999a] Enlund, F., Samuelsson, L., Enerback, C., Inerot, A., Wahlstrom, J., Yhr, M., Torinsson, A., Martinsson, T., and Swanbeck, G. (1999a). Analysis of three suggested psoriasis susceptibility loci in a large swedish set of families : confirmation of linkage to chromosome 6p (hla region), and to 17q, but not to 4q. *Hum Hered*, 49(1) :2–8.
- [Enlund et al., 1999b] Enlund, F., Samuelsson, L., Enerback, C., Inerot, A., Wahlstrom, J., Yhr, M., Torinsson, A., Riley, J., Swanbeck, G., and Martinsson, T. (1999b). Psoriasis susceptibility locus in chromosome region 3q21 identified in patients from southwest sweden. *Eur J Hum Genet*, 7(7) :783–90.

- [Fan et al., 2008] Fan, X., Yang, S., Huang, W., Wang, Z. M., Sun, L. D., Liang, Y. H., Gao, M., Ren, Y. Q., Zhang, K. Y., Du, W. H., Shen, Y. J., Liu, J. J., and Zhang, X. J. (2008). Fine mapping of the psoriasis susceptibility locus psors1 supports hla-c as the susceptibility gene in the han chinese population. *PLoS Genet*, 4(3) :e1000038.
- [Feinberg and Tycko, 2004] Feinberg, A. P. and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2) :143–53.
- [Feingold, 2005] Feingold, J. (2005). Maladies multifactorielles : un cauchemar pour le généticien. *Med Sci*, 11(21) :927–33.
- [Feingold et al., 1998] Feingold, J., Fellous, M., and Solignac, M. (1998). *Principes de génétique humaine*, chapter 12, pages 305–319. Hermann.
- [Friberg et al., 2006] Friberg, C., Bjorck, K., Nilsson, S., Inerot, A., Wahlstrom, J., and Samuelsson, L. (2006). Analysis of chromosome 5q31-32 and psoriasis : confirmation of a susceptibility locus but no association with snps within slc22a4 and slc22a5. *J Invest Dermatol*, 126(5) :998–1002.
- [Giardina et al., 2004] Giardina, E., Novelli, G., Costanzo, A., Nistico, S., Bulli, C., Sinibaldi, C., Sorgi, M. L., Chimenti, S., Pallone, F., Taccari, E., and Borganiani, P. (2004). Psoriatic arthritis and card15 gene polymorphisms : no evidence for association in the italian population. *J Invest Dermatol*, 122(5) :1106–7.
- [Giardina et al., 2006] Giardina, E., Predazzi, I., Sinibaldi, C., Peconi, C., Amerio, P., Costanzo, A., Paradisi, A., Capizzi, R., Paradisi, M., Chimenti, S., Taccari, E., and Novelli, G. (2006). Psors2 markers are not associated with psoriatic arthritis in the italian population. *Hum Hered*, 61(2) :120–2.
- [Gjorloff-Wingren et al., 1999] Gjorloff-Wingren, A., Saxena, M., Williams, S., Hammi, D., and Mustelin, T. (1999). Characterization of tcr-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase pep. *Eur J Immunol*, 29(12) :3845–54.
- [Gladman, 1994] Gladman, D. D. (1994). Natural history of psoriatic arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 8(2) :379–94.
- [Gottlieb et al., 1991] Gottlieb, A. B., Krueger, J. G., Khandke, L., Grossman, R. M., Krane, J., and Carter, D. M. (1991). Role of t cell activation in the pathogenesis of psoriasis. *Ann N Y Acad Sci*, 636 :377–9.
- [Gottlieb et al., 1995] Gottlieb, S. L., Heftler, N. S., Gilleaudeau, P., Johnson, R., Vallat, V. P., Wolfe, J., Gottlieb, A. B., and Krueger, J. G. (1995). Short-contact anthralin treatment augments therapeutic efficacy of cyclosporine in psoriasis : a clinical and pathologic study. *J Am Acad Dermatol*, 33(4) :637–45.

- [Griffiths and Barker, 2007] Griffiths, C. E. and Barker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet*, 370(9583) :263–71.
- [Groves et al., 1995] Groves, R. W., Mizutani, H., Kieffer, J. D., and Kupper, T. S. (1995). Inflammatory skin disease in transgenic mice that express high levels of interleukin 1 alpha in basal epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25) :11874–8.
- [Groves et al., 1996] Groves, R. W., Rauschmayr, T., Nakamura, K., Sarkar, S., Williams, I. R., and Kupper, T. S. (1996). Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the il-1 receptor (type i) on epidermal keratinocytes. evidence that il-1-inducible secondary cytokines produced by keratinocytes in vivo can cause skin disease. *J Clin Invest*, 98(2) :336–44.
- [Gudbjartsson et al., 2000] Gudbjartsson, D. F., Jonasson, K., Frigge, M. L., and Kong, A. (2000). Allegro, a new computer program for multipoint linkage analysis. *Nat Genet*, 25(1) :12–3.
- [Gudjonsson et al., 2007] Gudjonsson, J. E., Johnston, A., Dyson, M., Valdimarsson, H., and Elder, J. T. (2007). Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 127(6) :1292–308.
- [Gudjonsson et al., 2003] Gudjonsson, J. E., Karason, A., Antonsdottir, A., Runarsdottir, E. H., Hauksson, V. B., Upmanyu, R., Gulcher, J., Stefansson, K., and Valdimarsson, H. (2003). Psoriasis patients who are homozygous for the hla-cw*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with cw6 heterozygotes. *Br J Dermatol*, 148(2) :233–5.
- [Gudjonsson et al., 2002] Gudjonsson, J. E., Karason, A., Antonsdottir, A. A., Runarsdottir, E. H., Gulcher, J. R., Stefansson, K., and Valdimarsson, H. (2002). Hla-cw6-positive and hla-cw6-negative patients with psoriasis vulgaris have distinct clinical features. *J Invest Dermatol*, 118(2) :362–5.
- [Guerrin et al., 1998] Guerrin, M., Simon, M., Montezin, M., Haftek, M., Vincent, C., and Serre, G. (1998). Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with the product of the s gene and allows improved characterization of its processing during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, 273(35) :22640–7.
- [Guillaudeux et al., 1998] Guillaudeux, T., Janer, M., Wong, G. K., Spies, T., and Geraghty, D. E. (1998). The complete genomic sequence of 424,015 bp at the centromeric end of the hla class i region : gene content and polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16) :9494–9.
- [Haines and Pericak-Vance, 2006] Haines, J. and Pericak-Vance, M. (2006). *Genetic analysis of complex disease*, chapter 15, page 437. Wiley-liss.

- [Hall et al., 1990] Hall, J. M., Lee, M. K., Newman, B., Morrow, J. E., Anderson, L. A., Huey, B., and King, M. C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988) :1684–9.
- [Hasegawa et al., 2004] Hasegawa, K., Martin, F., Huang, G., Tumas, D., Diehl, L., and Chan, A. C. (2004). Pest domain-enriched tyrosine phosphatase (pep) regulation of effector/memory t cells. *Science*, 303(5658) :685–9.
- [Helms et al., 2003] Helms, C., Cao, L., Krueger, J. G., Wijsman, E. M., Chammian, F., Gordon, D., Heffernan, M., Daw, J. A., Robarge, J., Ott, J., Kwok, P. Y., Menter, A., and Bowcock, A. M. (2003). A putative runx1 binding site variant between slc9a3r1 and nat9 is associated with susceptibility to psoriasis. *Nat Genet*, 35(4) :349–56.
- [Helms et al., 2005] Helms, C., Saccone, N. L., Cao, L., Daw, J. A., Cao, K., Hsu, T. M., Taillon-Miller, P., Duan, S., Gordon, D., Pierce, B., Ott, J., Rice, J., Fernandez-Vina, M. A., Kwok, P. Y., Menter, A., and Bowcock, A. M. (2005). Localization of psors1 to a haplotype block harboring hla-c and distinct from corneodesmosin and hcr. *Hum Genet*, 118(3-4) :466–76.
- [Henseler and Christophers, 1985] Henseler, T. and Christophers, E. (1985). Psoriasis of early and late onset : characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13(3) :450–6.
- [Hensen et al., 2003] Hensen, P., Windemuth, C., Huffmeier, U., Ruschendorf, F., Stadelmann, A., Hoppe, V., Fenneker, D., Stander, M., Schmitt-Egenolf, M., Wienker, T. F., Traupe, H., and Reis, A. (2003). Association scan of the novel psoriasis susceptibility region on chromosome 19 : evidence for both susceptible and protective loci. *Exp Dermatol*, 12(4) :490–6.
- [Hewett et al., 2002] Hewett, D., Samuelsson, L., Polding, J., Enlund, F., Smart, D., Cantone, K., See, C. G., Chadha, S., Inerot, A., Enerback, C., Montgomery, D., Christodolou, C., Robinson, P., Matthews, P., Plumpton, M., Wahlstrom, J., Swanbeck, G., Martinsson, T., Roses, A., Riley, J., and Purvis, I. (2002). Identification of a psoriasis susceptibility candidate gene by linkage disequilibrium mapping with a localized single nucleotide polymorphism map. *Genomics*, 79(3) :305–14.
- [Hinds et al., 2005] Hinds, D. A., Stuve, L. L., Nilsen, G. B., Halperin, E., Eskin, E., Ballinger, D. G., Frazer, K. A., and Cox, D. R. (2005). Whole-genome patterns of common dna variation in three human populations. *Science*, 307(5712) :1072–9.
- [Hinks et al., 2005] Hinks, A., Barton, A., John, S., Bruce, I., Hawkins, C., Griffiths, C. E., Donn, R., Thomson, W., Silman, A., and Worthington, J. (2005). Association between the ptpn22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile

- idiopathic arthritis in a uk population : further support that ptpn22 is an autoimmunity gene. *Arthritis Rheum*, 52(6) :1694–9.
- [Ho et al., 2005] Ho, P., Bruce, I. N., Silman, A., Symmons, D., Newman, B., Young, H., Griffiths, C. E., John, S., Worthington, J., and Barton, A. (2005). Evidence for common genetic control in pathways of inflammation for crohn’s disease and psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 52(11) :3596–602.
- [Holgate et al., 2006] Holgate, S. T., Davies, D. E., Powell, R. M., and Holloway, J. W. (2006). Adam33 : a newly identified protease involved in airway remodelling. *Pulm Pharmacol Ther*, 19(1) :3–11.
- [Hollox et al., 2008] Hollox, E. J., Huffmeier, U., Zeeuwen, P. L., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D., van de Kerkhof, P. C., Traupe, H., de Jongh, G., den Heijer, M., Reis, A., Armour, J. A., and Schalkwijk, J. (2008). Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number. *Nat Genet*, 40(1) :23–5.
- [Horai et al., 2004] Horai, R., Nakajima, A., Habiro, K., Kotani, M., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Saijo, S., Kotaki, H., Sudo, K., Okahara, A., Tanioka, H., Ikuse, T., Ishii, N., Schwartzberg, P. L., Abe, R., and Iwakura, Y. (2004). Tnf-alpha is crucial for the development of autoimmune arthritis in il-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Clin Invest*, 114(11) :1603–11.
- [Horvath et al., 2001] Horvath, S., Xu, X., and Laird, N. M. (2001). The family based association test method : strategies for studying general genotype-phenotype associations. *Eur J Hum Genet*, 9(4) :301–6.
- [Horvath et al., 2004] Horvath, S., Xu, X., Lake, S. L., Silverman, E. K., Weiss, S. T., and Laird, N. M. (2004). Family-based tests for associating haplotypes with general phenotype data : application to asthma genetics. *Genet Epidemiol*, 26(1) :61–9.
- [Hosomi et al., 2005] Hosomi, N., Fukai, K., Oiso, N., Kato, A., Fukui, M., and Ishii, M. (2005). No association between atopic dermatitis and the slc9a3r1-nat9 runx1 binding site polymorphism in japanese patients. *Clin Exp Dermatol*, 30(2) :192–3.
- [Howard et al., 2003] Howard, T. D., Postma, D. S., Jongepier, H., Moore, W. C., Koppelman, G. H., Zheng, S. L., Xu, J., Bleecker, E. R., and Meyers, D. A. (2003). Association of a disintegrin and metalloprotease 33 (adam33) gene with asthma in ethnically diverse populations. *J Allergy Clin Immunol*, 112(4) :717–22.
- [Huffmeier et al., 2005a] Huffmeier, U., Lascorz, J., Traupe, H., Bohm, B., Schurmeier-Horst, F., Stander, M., Kelsch, R., Baumann, C., Kuster, W., Burkhardt, H., and Reis, A. (2005a). Systematic linkage disequilibrium analysis of

- slc12a8 at psors5 confirms a role in susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 125(5) :906–12.
- [Huffmeier et al., 2006a] Huffmeier, U., Reis, A., Steffens, M., Lascorz, J., Bohm, B., Lohmann, J., Wendler, J., Traupe, H., Kuster, W., Wienker, T. F., and Burkhardt, H. (2006a). Male restricted genetic association of variant r620w in ptpn22 with psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol*, 126(4) :932–5.
- [Huffmeier et al., 2006b] Huffmeier, U., Steffens, M., Burkhardt, H., Lascorz, J., Schurmeier-Horst, F., Stander, M., Kelsch, R., Baumann, C., Kuster, W., Mossner, R., Reich, K., Wienker, T. F., Traupe, H., and Reis, A. (2006b). Evidence for susceptibility determinant(s) to psoriasis vulgaris in or near ptpn22 in german patients. *J Med Genet*, 43(6) :517–22.
- [Huffmeier et al., 2005b] Huffmeier, U., Traupe, H., Burkhardt, H., Schurmeier-Horst, F., Lascorz, J., Bohm, B., Lohmann, J., Stander, M., Wendler, J., Kelsch, R., Baumann, C., Kuster, W., Wienker, T. F., and Reis, A. (2005b). Lack of evidence for genetic association to runx1 binding site at psors2 in different german psoriasis cohorts. *J Invest Dermatol*, 124(1) :107–10.
- [Huffmeier et al., 2007] Huffmeier, U., Traupe, H., Oji, V., Lascorz, J., Stander, M., Lohmann, J., Wendler, J., Burkhardt, H., and Reis, A. (2007). Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in german patients. *J Invest Dermatol*, 127(6) :1367–70.
- [Hugot et al., 2001] Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O’Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001). Association of nod2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn’s disease. *Nature*, 411(6837) :599–603.
- [Hwu et al., 2005] Hwu, W. L., Yang, C. F., Fann, C. S., Chen, C. L., Tsai, T. F., Chien, Y. H., Chiang, S. C., Chen, C. H., Hung, S. I., Wu, J. Y., and Chen, Y. T. (2005). Mapping of psoriasis to 17q terminus. *J Med Genet*, 42(2) :152–8.
- [Ishihara et al., 1996] Ishihara, M., Yamagata, N., Ohno, S., Naruse, T., Ando, A., Kawata, H., Ozawa, A., Ohkido, M., Mizuki, N., Shiina, T., Ando, H., and Inoko, H. (1996). Genetic polymorphisms in the keratin-like s gene within the human major histocompatibility complex and association analysis on the susceptibility to psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*, 48(3) :182–6.
- [Janeway et al., 2003] Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Duverlie, G., Shlomchik, M., and Masson, P. (2003). *Immunobiologie*, chapter 8, page 296. de boeck.

- [Jenisch et al., 2006] Jenisch, S., Hampe, J., Elder, J. T., Nair, R., Stuart, P., Voorhees, J. J., Schreiber, S., Kabelitz, D., Christophers, E., and Weichen-
thal, M. (2006). Card15 mutations in patients with plaque-type psoriasis and
psoriatic arthritis : lack of association. *Arch Dermatol Res*, 297(9) :409–11.
- [Jenisch et al., 1998] Jenisch, S., Henseler, T., Nair, R. P., Guo, S. W., West-
phal, E., Stuart, P., Kronke, M., Voorhees, J. J., Christophers, E., and Elder,
J. T. (1998). Linkage analysis of human leukocyte antigen (hla) markers in
familial psoriasis : strong disequilibrium effects provide evidence for a major
determinant in the hla-b/-c region. *Am J Hum Genet*, 63(1) :191–9.
- [Jenisch et al., 1999] Jenisch, S., Koch, S., Henseler, T., Nair, R. P., Elder, J. T.,
Watts, C. E., Westphal, E., Voorhees, J. J., Christophers, E., and Kronke,
M. (1999). Corneodesmosin gene polymorphism demonstrates strong linkage
disequilibrium with hla and association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens*,
54(5) :439–49.
- [JK. and RC., 1972] JK., H. and RC., E. (1972). The investigation of linkage
between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet*, 2(1) :3–19.
- [Julier et al., 1991] Julier, C., Hyer, R. N., Davies, J., Merlin, F., Soularue, P.,
Briant, L., Cathelineau, G., Deschamps, I., Rotter, J. I., Froguel, P., and et al.
(1991). Insulin-igf2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in
hla-dr4-dependent diabetes susceptibility. *Nature*, 354(6349) :155–9.
- [Kaijzel et al., 2002] Kaijzel, E. L., van Dongen, H., Bakker, A. M., Breedveld,
F. C., Huizinga, T. W., and Verweij, C. L. (2002). Relationship of polymor-
phisms of the interleukin-1 gene cluster to occurrence and severity of rheuma-
toid arthritis. *Tissue Antigens*, 59(2) :122–6.
- [Karason et al., 2005] Karason, A., Gudjonsson, J. E., Jonsson, H. H., Hauksson,
V. B., Runarsdottir, E. H., Stefansson, K., Valdimarsson, H., and Gulcher, J. R.
(2005). Genetics of psoriasis in iceland : evidence for linkage of subphenotypes
to distinct loci. *J Invest Dermatol*, 124(6) :1177–85.
- [Karason et al., 2003] Karason, A., Gudjonsson, J. E., Upmanyu, R., Antonsdot-
tir, A. A., Hauksson, V. B., Runarsdottir, E. H., Jonsson, H. H., Gudbjartsson,
D. F., Frigge, M. L., Kong, A., Stefansson, K., Valdimarsson, H., and Gulcher,
J. R. (2003). A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps to chromosome
16q : evidence for imprinting. *Am J Hum Genet*, 72(1) :125–31.
- [Kauppi et al., 2001] Kauppi, P., Lindblad-Toh, K., Sevón, P., Toivonen, H. T.,
Rioux, J. D., Villapakkam, A., Laitinen, L. A., Hudson, T. J., Kere, J., and
Laitinen, T. (2001). A second-generation association study of the 5q31 cytokine
gene cluster and the interleukin-4 receptor in asthma. *Genomics*, 77(1-2) :35–
42.

- [Khoury, 1994] Khoury, M. J. (1994). Case-parental control method in the search for disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet*, 55(2) :414–5.
- [Kirby et al., 2001] Kirby, B., Richards, H. L., Woo, P., Hindle, E., Main, C. J., and Griffiths, C. E. (2001). Physical and psychologic measures are necessary to assess overall psoriasis severity. *J Am Acad Dermatol*, 45(1) :72–6.
- [Knapp, 1999] Knapp, M. (1999). A note on power approximations for the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet*, 64(4) :1177–85.
- [Kornman et al., 1997] Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., di Giovine, F. S., Newman, M. G., Pirk, F. W., Wilson, T. G., J., Higginbottom, F. L., and Duff, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 24(1) :72–7.
- [Krueger and Duvic, 1994] Krueger, G. G. and Duvic, M. (1994). Epidemiology of psoriasis : clinical issues. *J Invest Dermatol*, 102(6) :14S–18S.
- [Kruglyak, 1999] Kruglyak, L. (1999). Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet*, 22(2) :139–44.
- [Kruglyak et al., 1996] Kruglyak, L., Daly, M. J., Reeve-Daly, M. P., and Lander, E. S. (1996). Parametric and nonparametric linkage analysis : a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet*, 58(6) :1347–63.
- [Kruglyak and Nickerson, 2001] Kruglyak, L. and Nickerson, D. A. (2001). Variation is the spice of life. *Nat Genet*, 27(3) :234–6.
- [Kyogoku et al., 2004] Kyogoku, C., Langefeld, C. D., Ortmann, W. A., Lee, A., Selby, S., Carlton, V. E., Chang, M., Ramos, P., Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Novitzke, J., Williams, A. H., Gillett, C., Rodine, P., Graham, R. R., Ardlie, K. G., Gaffney, P. M., Moser, K. L., Petri, M., Begovich, A. B., Gregersen, P. K., and Behrens, T. W. (2004). Genetic association of the r620w polymorphism of protein tyrosine phosphatase ptpn22 with human sle. *Am J Hum Genet*, 75(3) :504–7.
- [Laird et al., 2000] Laird, N. M., Horvath, S., and Xu, X. (2000). Implementing a unified approach to family-based tests of association. *Genet Epidemiol*, 19 Suppl 1 :S36–42.
- [Lamoril et al., 2007] Lamoril, J., Deybach, J., and Bouizegarèneb, P. (2007). Genetic aspects of crohn’s disease : a review. *Immuno-analyse et bio spécialisée*, 22(3) :137–150.
- [Lander and Kruglyak, 1995] Lander, E. and Kruglyak, L. (1995). Genetic dissection of complex traits : guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11(3) :241–7.

- [Lange and Laird, 2002] Lange, C. and Laird, N. M. (2002). Power calculations for a general class of family-based association tests : dichotomous traits. *Am J Hum Genet*, 71(3) :575–84.
- [Larko, 1995] Larko, O. (1995). Problem sites : scalp, palm and sole, and nail. *Dermatol Clin*, 13(4) :771–7.
- [Lascorz et al., 2005] Lascorz, J., Burkhardt, H., Huffmeier, U., Bohm, B., Schurmeyer-Horst, F., Lohmann, J., Stander, M., Wendler, J., Kelsch, R., Baumann, C., Kuster, W., Traupe, H., and Reis, A. (2005). Lack of genetic association of the three more common polymorphisms of card15 with psoriatic arthritis and psoriasis in a german cohort. *Ann Rheum Dis*, 64(6) :951–4.
- [Lathrop et al., 1984] Lathrop, G. M., Lalouel, J. M., Julier, C., and Ott, J. (1984). Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(11) :3443–6.
- [Lavaroni et al., 1994] Lavaroni, G., Kokelj, F., Pauluzzi, P., and Trevisan, G. (1994). The nails in psoriatic arthritis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 186 :113.
- [Lazzeroni and Lange, 1998] Lazzeroni, L. C. and Lange, K. (1998). A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered*, 48(2) :67–81.
- [Lee et al., 1990] Lee, F. I., Bellary, S. V., and Francis, C. (1990). Increased occurrence of psoriasis in patients with crohn’s disease and their relatives. *Am J Gastroenterol*, 85(8) :962–3.
- [Lee et al., 2002] Lee, J. K., Park, C., Kimm, K., and Rutherford, M. S. (2002). Genome-wide multilocus analysis for immune-mediated complex diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 295(4) :771–3.
- [Lee et al., 2000] Lee, Y. A., Ruschendorf, F., Windemuth, C., Schmitt-Egenolf, M., Stadelmann, A., Nurnberg, G., Stander, M., Wienker, T. F., Reis, A., and Traupe, H. (2000). Genomewide scan in german families reveals evidence for a novel psoriasis-susceptibility locus on chromosome 19p13. *Am J Hum Genet*, 67(4) :1020–4.
- [Lee et al., 2007] Lee, Y. H., Rho, Y. H., Choi, S. J., Ji, J. D., Song, G. G., Nath, S. K., and Harley, J. B. (2007). The ptpn22 c1858t functional polymorphism and autoimmune diseases—a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 46(1) :49–56.
- [Lench et al., 2005] Lench, N., Iles, M. M., Mackay, I., Patel, R., Sagoo, G. S., Ward, S. J., Dechairo, B., Olavesen, M., Carey, A., Duff, G. W., Cork, M. J., and Tazi-Ahni, R. (2005). Single-point haplotype scores telomeric to human leukocyte antigen-c give a high susceptibility major histocompatibility

- complex haplotype for psoriasis in a caucasian population. *J Invest Dermatol*, 124(3) :545–52.
- [Lesueur et al., 2007a] Lesueur, F., Lefevre, C., Has, C., Guilloud-Bataille, M., Oudot, T., Mahe, E., Lahfa, M., Mansouri, S., Mosharraf-Olmolk, H., Sobel, E., Heath, S., Lathrop, M., Dizier, M. H., Prud'Homme, J. F., and Fischer, J. (2007a). Confirmation of psoriasis susceptibility loci on chromosome 6p21 and 20p13 in french families. *J Invest Dermatol*, 127(6) :1403–9.
- [Lesueur et al., 2007b] Lesueur, F., Oudot, T., Heath, S., Foglio, M., Lathrop, M., Prud'homme, J. F., and Fischer, J. (2007b). Adam33, a new candidate for psoriasis susceptibility. *PLoS ONE*, 2(9) :e906.
- [Lew et al., 2004] Lew, W., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2004). Psoriasis vulgaris : cutaneous lymphoid tissue supports t-cell activation and "type 1" inflammatory gene expression. *Trends Immunol*, 25(6) :295–305.
- [Li et al., 2008] Li, Y., Liao, W., Chang, M., Schrodi, S. J., Bui, N., Catanese, J. J., Poon, A., Matsunami, N., Callis-Duffin, K. P., Leppert, M. F., Bowcock, A. M., Kwok, P. Y., Krueger, G. G., and Begovich, A. B. (2008). Further genetic evidence for three psoriasis-risk genes : Adam33, cdkal1, and ptpn22. *J Invest Dermatol*.
- [Liu et al., 2008] Liu, Y., Helms, C., Liao, W., Zaba, L. C., Duan, S., Gardner, J., Wise, C., Miner, A., Malloy, M. J., Pullinger, C. R., Kane, J. P., Saccone, S., Worthington, J., Bruce, I., Kwok, P. Y., Menter, A., Krueger, J., Barton, A., Saccone, N. L., and Bowcock, A. M. (2008). A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. *PLoS Genet*, 4(3) :e1000041.
- [Liu et al., 2007] Liu, Y., Krueger, J. G., and Bowcock, A. M. (2007). Psoriasis : genetic associations and immune system changes. *Genes Immun*, 8(1) :1–12.
- [Lord et al., 1991] Lord, P. C., Wilmoth, L. M., Mizel, S. B., and McCall, C. E. (1991). Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest*, 87(4) :1312–21.
- [Los et al., 1999] Los, H., Koppelman, G., and Postma, D. (1999). The importance of genetic influence in asthma. *Eur Resp J*, 14 :1210–1227.
- [Lowes et al., 2007] Lowes, M. A., Bowcock, A. M., and Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130) :866–73.
- [Maeda et al., 2005] Maeda, S., Hsu, L. C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L., and Karin, M. (2005). Nod2 mutation in crohn's disease potentiates nf-kappab activity and il-1beta processing. *Science*, 307(5710) :734–8.

- [Mahe et al., 2002] Mahe, E., Lahfa, M., Mansouri, S., Mosharraf-Olmolk, H., Le Rebours, J., Prud'Homme, J. F., and Fischer, J. (2002). Physicians' response to a letter to confirm diagnosis in a genetic study of psoriasis. *Eur J Dermatol*, 12(1) :66–9.
- [Mallon et al., 2000] Mallon, E., Bunce, M., Savoie, H., Rowe, A., Newson, R., Gotch, F., and Bunker, C. B. (2000). Hla-c and guttate psoriasis. *Br J Dermatol*, 143(6) :1177–82.
- [Mallon et al., 1997] Mallon, E., Bunce, M., Wojnarowska, F., and Welsh, K. (1997). Hla-cw*0602 is a susceptibility factor in type i psoriasis, and evidence ala-73 is increased in male type i psoriatics. *J Invest Dermatol*, 109(2) :183–6.
- [Mallon and Bunker, 2000] Mallon, E. and Bunker, C. B. (2000). Hiv-associated psoriasis. *AIDS Patient Care STDS*, 14(5) :239–46.
- [Mallon et al., 1999] Mallon, E., Newson, R., and Bunker, C. B. (1999). Hla-cw6 and the genetic predisposition to psoriasis : a meta-analysis of published serologic studies. *J Invest Dermatol*, 113(4) :693–5.
- [Marenholz et al., 2006] Marenholz, I., Nickel, R., Ruschendorf, F., Schulz, F., Esparza-Gordillo, J., Kerscher, T., Gruber, C., Lau, S., Worm, M., Keil, T., Kurek, M., Zaluga, E., Wahn, U., and Lee, Y. A. (2006). Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*, 118(4) :866–71.
- [Martinez-Borra et al., 2005] Martinez-Borra, J., Brautbar, C., Gonzalez, S., Enk, C. D., Lopez-Vazquez, A., and Lopez-Larrea, C. (2005). The region of 150 kb telomeric to hla-c is associated with psoriasis in the jewish population. *J Invest Dermatol*, 125(5) :928–32.
- [Matthews et al., 1996] Matthews, D., Fry, L., Powles, A., Weber, J., McCarthy, M., Fisher, E., Davies, K., and Williamson, R. (1996). Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet*, 14(2) :231–3.
- [McKenzie and Sabin, 2003] McKenzie, R. C. and Sabin, E. (2003). Aberrant signalling and transcription factor activation as an explanation for the defective growth control and differentiation of keratinocytes in psoriasis : a hypothesis. *Exp Dermatol*, 12(4) :337–45.
- [McVean et al., 2004] McVean, G. A., Myers, S. R., Hunt, S., Deloukas, P., Bentley, D. R., and Donnelly, P. (2004). The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome. *Science*, 304(5670) :581–4.
- [Mee et al., 2006] Mee, J. B., Cork, M. J., di Giovine, F. S., Duff, G. W., and Groves, R. W. (2006). Interleukin-1 : a key inflammatory mediator in psoriasis ? *Cytokine*, 33(2) :72–8.

- [Monpetit and Chagnon, 2006] Monpetit, A. and Chagnon, F. (2006). La carte d'haplotype du g nome humain. *med sci*, 22(12) :1061–68.
- [Morahan et al., 2001] Morahan, G., Huang, D., Ymer, S. I., Cancilla, M. R., Stephen, K., Dabadghao, P., Werther, G., Tait, B. D., Harrison, L. C., and Colman, P. G. (2001). Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory il12b allele. *Nat Genet*, 27(2) :218–21.
- [Morar et al., 2006] Morar, N., Bowcock, A. M., Harper, J. I., Cookson, W. O., and Moffatt, M. F. (2006). Investigation of the chromosome 17q25 psors2 locus in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 126(3) :603–6.
- [Morton, 1955] Morton, N. E. (1955). Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*, 7(3) :277–318.
- [Mukhopadhyay et al., 2005] Mukhopadhyay, N., Almasy, L., Schroeder, M., Mulvihill, W. P., and Weeks, D. E. (2005). Mega2 : data-handling for facilitating genetic linkage and association analyses. *Bioinformatics*, 21(10) :2556–7.
- [Nair et al., 1995] Nair, R. P., Guo, S. W., Jenisch, S., Henseler, T., Lange, E. M., Terhune, M., Westphal, E., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (1995). Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility : lack of evidence for a distal 17q locus. *Hum Hered*, 45(4) :219–30.
- [Nair et al., 1997] Nair, R. P., Henseler, T., Jenisch, S., Stuart, P., Bichakjian, C. K., Lenk, W., Westphal, E., Guo, S. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (1997). Evidence for two psoriasis susceptibility loci (hla and 17q) and two novel candidate regions (16q and 20p) by genome-wide scan. *Hum Mol Genet*, 6(8) :1349–56.
- [Nair et al., 2008] Nair, R. P., Ruether, A., Stuart, P. E., Jenisch, S., Tejasvi, T., Hiremagalore, R., Schreiber, S., Kabelitz, D., Lim, H. W., Voorhees, J. J., Christophers, E., Elder, J. T., and Weichenthal, M. (2008). Polymorphisms of the il12b and il23r genes are associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128(7) :1653–61.
- [Nair et al., 2000] Nair, R. P., Stuart, P., Henseler, T., Jenisch, S., Chia, N. V., Westphal, E., Schork, N. J., Kim, J., Lim, H. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2000). Localization of psoriasis-susceptibility locus psors1 to a 60-kb interval telomeric to hla-c. *Am J Hum Genet*, 66(6) :1833–44.
- [Nair et al., 2001] Nair, R. P., Stuart, P., Ogura, Y., Inohara, N., Chia, N. V., Young, L., Henseler, T., Jenisch, S., Christophers, E., Voorhees, J. J., Nunez, G., and Elder, J. T. (2001). Lack of association between nod2 3020insc frame-shift mutation and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 117(6) :1671–2.
- [Nair et al., 2006] Nair, R. P., Stuart, P. E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G. R., Lim, H. W., Christophers,

- E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2006). Sequence and haplotype analysis supports hla-c as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am J Hum Genet*, 78(5) :827–51.
- [Naldi et al., 2001] Naldi, L., Peli, L., Parazzini, F., and Carrel, C. F. (2001). Family history of psoriasis, stressful life events, and recent infectious disease are risk factors for a first episode of acute guttate psoriasis : results of a case-control study. *J Am Acad Dermatol*, 44(3) :433–8.
- [Newman et al., 2005a] Newman, B., Gu, X., Wintle, R., Cescon, D., Yazdanpanah, M., Liu, X., Peltekova, V., Van Oene, M., Amos, C. I., and Siminovitch, K. A. (2005a). A risk haplotype in the solute carrier family 22a4/22a5 gene cluster influences phenotypic expression of crohn’s disease. *Gastroenterology*, 128(2) :260–9.
- [Newman et al., 2005b] Newman, B., Wintle, R. F., van Oene, M., Yazdanpanah, M., Owen, J., Johnson, B., Gu, X., Amos, C. I., Keystone, E., Rubin, L. A., and Siminovitch, K. A. (2005b). Slc22a4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and crohn’s disease are not associated with rheumatoid arthritis in a canadian caucasian population. *Arthritis Rheum*, 52(2) :425–9.
- [Newman et al., 2001] Newman, D. L., Abney, M., McPeck, M. S., Ober, C., and Cox, N. J. (2001). The importance of genealogy in determining genetic associations with complex traits. *Am J Hum Genet*, 69(5) :1146–8.
- [Nistor et al., 2005] Nistor, I., Nair, R. P., Stuart, P., Hiremagalore, R., Thompson, R. A., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G. R., Qin, Z. S., Christophers, E., Lim, H. W., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2005). Protein tyrosine phosphatase gene ptpn22 polymorphism in psoriasis : lack of evidence for association. *J Invest Dermatol*, 125(2) :395–6.
- [Nomura et al., 2008] Nomura, T., Akiyama, M., Sandilands, A., Nemoto-Hasebe, I., Sakai, K., Nagasaki, A., Ota, M., Hata, H., Evans, A. T., Palmer, C. N., Shimizu, H., and McLean, W. H. (2008). Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in japan. *J Invest Dermatol*, 128(6) :1436–41.
- [O’Brien et al., 2001] O’Brien, K. P., Holm, S. J., Nilsson, S., Carlen, L., Rosenmuller, T., Enerback, C., Inerot, A., and Stahle-Backdahl, M. (2001). The hcr gene on 6p21 is unlikely to be a psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol*, 116(5) :750–4.
- [Ockenfels, 2003] Ockenfels, H. M. (2003). [trigger factors for psoriasis]. *Hautarzt*, 54(3) :215–23.
- [O’Connell and Weeks, 1998] O’Connell, J. R. and Weeks, D. E. (1998). Ped-check : a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 63(1) :259–66.

- [Ogura et al., 2001] Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in *nod2* associated with susceptibility to crohn's disease. *Nature*, 411(6837) :603–6.
- [Ogura et al., 2003] Ogura, Y., Saab, L., Chen, F. F., Benito, A., Inohara, N., and Nunez, G. (2003). Genetic variation and activity of mouse *nod2*, a susceptibility gene for crohn's disease. *Genomics*, 81(4) :369–77.
- [Oka et al., 1999] Oka, A., Tamiya, G., Tomizawa, M., Ota, M., Katsuyama, Y., Makino, S., Shiina, T., Yoshitome, M., Iizuka, M., Sasao, Y., Iwashita, K., Kawakubo, Y., Sugai, J., Ozawa, A., Ohkido, M., Kimura, M., Bahram, S., and Inoko, H. (1999). Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the *hla-c* gene. *Hum Mol Genet*, 8(12) :2165–70.
- [Orru et al., 2005] Orru, S., Giuressi, E., Carcassi, C., Casula, M., and Contu, L. (2005). Mapping of the major psoriasis-susceptibility locus (*psors1*) in a 70-kb interval around the corneodesmosin gene (*cdsn*). *Am J Hum Genet*, 76(1) :164–71.
- [Ortonne and Ortonne, 1999] Ortonne, N. and Ortonne, J. P. (1999). [psoriasis. pathogenesis]. *Presse Med*, 28(23) :1259–65.
- [Palmer et al., 2006] Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., and McLean, W. H. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38(4) :441–6.
- [Palmer et al., 2007] Palmer, C. N., Ismail, T., Lee, S. P., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Smith, F. J., McLean, W. H., and Mukhopadhyay, S. (2007). Filaggrin null mutations are associated with increased asthma severity in children and young adults. *J Allergy Clin Immunol*, 120(1) :64–8.
- [Panet and Atlan, 1991] Panet, R. and Atlan, H. (1991). Stimulation of bumetanide-sensitive $na^+/k^+/cl^-$ cotransport by different mitogens in synchronized human skin fibroblasts is essential for cell proliferation. *J Cell Biol*, 114(2) :337–42.
- [Passarge, 2000] Passarge, E. (2000). *Atlas de poche de Génétique*, page 56. Médecine-Sciences, Flammarion.

- [Peddle et al., 2005] Peddle, L., Butt, C., Snelgrove, T., and Rahman, P. (2005). Interleukin (il) 1alpha, il1beta, il receptor antagonist, and il10 polymorphisms in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64(7) :1093–4.
- [Peltekova et al., 2004] Peltekova, V. D., Wintle, R. F., Rubin, L. A., Amos, C. I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A. M., St George-Hyslop, P. H., and Siminovitch, K. A. (2004). Functional variants of octn cation transporter genes are associated with crohn disease. *Nat Genet*, 36(5) :471–5.
- [Penrose, 1935] Penrose, L. (1935). The detection of autosomal linkage in data which consists of pairs of brothers and sisters of unspecified parentage. *Ann Eugen*, 6 :133–38.
- [Pietrzak et al., 2008] Pietrzak, A. T., Zalewska, A., Chodorowska, G., Krasowska, D., Michalak-Stoma, A., Nockowski, P., Osemlak, P., Paszkowski, T., and Rolinski, J. M. (2008). Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta*, 394(1-2) :7–21.
- [Pietrzyk et al., 1982] Pietrzyk, J. J., Turowski, G., Kapinska-Mrowka, M., and Rozanski, B. (1982). Family studies in psoriasis. i. complex segregation analysis. *Arch Dermatol Res*, 273(3-4) :287–94.
- [Plant et al., 2004] Plant, D., Lear, J., Marsland, A., Worthington, J., and Griffiths, C. E. (2004). Card15/nod2 single nucleotide polymorphisms do not confer susceptibility to type i psoriasis. *Br J Dermatol*, 151(3) :675–8.
- [Presky et al., 1996] Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K., and Gubler, U. (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24) :14002–7.
- [Prinz, 2003] Prinz, J. C. (2003). The role of t cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 17(3) :257–70.
- [Prokunina et al., 2002] Prokunina, L., Castillejo-Lopez, C., Oberg, F., Gunnarsson, I., Berg, L., Magnusson, V., Brookes, A. J., Tentler, D., Kristjansdottir, H., Grondal, G., Bolstad, A. I., Svenungsson, E., Lundberg, I., Sturfelt, G., Jonssen, A., Truedsson, L., Lima, G., Alcocer-Varela, J., Jonsson, R., Gyllensten, U. B., Harley, J. B., Alarcon-Segovia, D., Steinsson, K., and Alarcon-Riquelme, M. E. (2002). A regulatory polymorphism in pdcd1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet*, 32(4) :666–9.
- [Rabinowitz and Laird, 2000] Rabinowitz, D. and Laird, N. (2000). A unified approach to adjusting association tests for population admixture with arbitrary pedigree structure and arbitrary missing marker information. *Hum Hered*, 50(4) :211–23.

- [Rahman et al., 2003] Rahman, P., Bartlett, S., Siannis, F., Pellett, F. J., Farewell, V. T., Peddle, L., Schentag, C. T., Alderdice, C. A., Hamilton, S., Khraishi, M., Tobin, Y., Hefferton, D., and Gladman, D. D. (2003). Card15 : a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis. *Am J Hum Genet*, 73(3) :677–81.
- [Rahman et al., 2006] Rahman, P., Sun, S., Peddle, L., Snelgrove, T., Melay, W., Greenwood, C., and Gladman, D. (2006). Association between the interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(7) :2321–5.
- [Randolph et al., 2004] Randolph, A. G., Lange, C., Silverman, E. K., Lazarus, R., Silverman, E. S., Raby, B., Brown, A., Ozonoff, A., Richter, B., and Weiss, S. T. (2004). The il12b gene is associated with asthma. *Am J Hum Genet*, 75(4) :709–15.
- [Rauschmayr et al., 1997] Rauschmayr, T., Groves, R. W., and Kupper, T. S. (1997). Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(11) :5814–9.
- [Ravindran et al., 2004] Ravindran, J. S., Owen, P., Lagan, A., Lewis, J., Korendowych, E., Welsh, K., and McHugh, N. (2004). Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 43(1) :22–6.
- [Raychaudhuri and Gross, 2000a] Raychaudhuri, S. P. and Gross, J. (2000a). A comparative study of pediatric onset psoriasis with adult onset psoriasis. *Pediatr Dermatol*, 17(3) :174–8.
- [Raychaudhuri and Gross, 2000b] Raychaudhuri, S. P. and Gross, J. (2000b). Psoriasis risk factors : role of lifestyle practices. *Cutis*, 66(5) :348–52.
- [Reich et al., 2002] Reich, K., Mossner, R., Konig, I. R., Westphal, G., Ziegler, A., and Neumann, C. (2002). Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol*, 118(1) :155–63.
- [Reiley et al., 2004] Reiley, W., Zhang, M., and Sun, S. C. (2004). Negative regulation of jnk signaling by the tumor suppressor cyld. *J Biol Chem*, 279(53) :55161–7.
- [Reiley et al., 2007] Reiley, W. W., Jin, W., Lee, A. J., Wright, A., Wu, X., Te-walt, E. F., Leonard, T. O., Norbury, C. C., Fitzpatrick, L., Zhang, M., and Sun, S. C. (2007). Deubiquitinating enzyme cyld negatively regulates the ubiquitin-dependent kinase tak1 and prevents abnormal t cell responses. *J Exp Med*, 204(6) :1475–85.

- [Reiley et al., 2006] Reiley, W. W., Zhang, M., Jin, W., Losiewicz, M., Donohue, K. B., Norbury, C. C., and Sun, S. C. (2006). Regulation of t cell development by the deubiquitinating enzyme cyld. *Nat Immunol*, 7(4) :411–7.
- [Revillard, 2001] Revillard, J. (2001). *Immunologie*, chapter 26, page 386. De Boeck.
- [Rioux et al., 2001] Rioux, J. D., Daly, M. J., Silverberg, M. S., Lindblad, K., Steinhart, H., Cohen, Z., Delmonte, T., Kocher, K., Miller, K., Guschwan, S., Kulbokas, E. J., O’Leary, S., Winchester, E., Dewar, K., Green, T., Stone, V., Chow, C., Cohen, A., Langelier, D., Lapointe, G., Gaudet, D., Faith, J., Branco, N., Bull, S. B., McLeod, R. S., Griffiths, A. M., Bitton, A., Greenberg, G. R., Lander, E. S., Siminovitch, K. A., and Hudson, T. J. (2001). Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to crohn disease. *Nat Genet*, 29(2) :223–8.
- [Risch, 1990] Risch, N. (1990). Linkage strategies for genetically complex traits. ii. the power of affected relative pairs. *Am J Hum Genet*, 46(2) :229–41.
- [Risch and Merikangas, 1996] Risch, N. and Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 273(5281) :1516–7.
- [Risch, 2000] Risch, N. J. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, 405(6788) :847–56.
- [Romphruk et al., 2003] Romphruk, A. V., Oka, A., Romphruk, A., Tomizawa, M., Choonhakarn, C., Naruse, T. K., Puapairoj, C., Tamiya, G., Leelayuwat, C., and Inoko, H. (2003). Corneodesmosin gene : no evidence for psors 1 gene in north-eastern thai psoriasis patients. *Tissue Antigens*, 62(3) :217–24.
- [Rozen and Skaletsky, 2000] Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*, 132 :365–86.
- [Ruether et al., 2006] Ruether, A., Stoll, M., Schwarz, T., Schreiber, S., and Folster-Holst, R. (2006). Filaggrin loss-of-function variant contributes to atopic dermatitis risk in the population of northern germany. *Br J Dermatol*, 155(5) :1093–4.
- [Russell et al., 1995] Russell, L. J., DiGiovanna, J. J., Rogers, G. R., Steinert, P. M., Hashem, N., Compton, J. G., and Bale, S. J. (1995). Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nat Genet*, 9(3) :279–83.
- [Sagoo et al., 2004] Sagoo, G. S., Tazi-Ahnini, R., Barker, J. W., Elder, J. T., Nair, R. P., Samuelsson, L., Traupe, H., Trembath, R. C., Robinson, D. A.,

- and Iles, M. M. (2004). Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in caucasian and chinese hans population. *J Invest Dermatol*, 122(6) :1401–5.
- [Samuelsson et al., 1999] Samuelsson, L., Enlund, F., Torinsson, A., Yhr, M., Inerot, A., Enerback, C., Wahlstrom, J., Swanbeck, G., and Martinsson, T. (1999). A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet*, 105(6) :523–9.
- [Sandilands et al., 2006] Sandilands, A., O'Regan, G. M., Liao, H., Zhao, Y., Terron-Kwiatkowski, A., Watson, R. M., Cassidy, A. J., Goudie, D. R., Smith, F. J., McLean, W. H., and Irvine, A. D. (2006). Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 126(8) :1770–5.
- [Sano et al., 2005] Sano, S., Chan, K. S., Carbajal, S., Clifford, J., Peavey, M., Kiguchi, K., Itami, S., Nickoloff, B. J., and DiGiovanni, J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 11(1) :43–9.
- [Sano et al., 2008] Sano, S., Chan, K. S., and DiGiovanni, J. (2008). Impact of stat3 activation upon skin biology : a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci*, 50(1) :1–14.
- [Saunders et al., 1993] Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper-MacLachlan, D. R., Alberts, M. J., and et al. (1993). Association of apolipoprotein e allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8) :1467–72.
- [Schmitt-Egenolf et al., 2001] Schmitt-Egenolf, M., Windemuth, C., Hennies, H. C., Albis-Camps, M., von Engelhardt, B., Wienker, T., Reis, A., Traupe, H., and Blasczyk, R. (2001). Comparative association analysis reveals that corneodesmosin is more closely associated with psoriasis than hla-cw*0602-b*5701 in german families. *Tissue Antigens*, 57(5) :440–6.
- [Schrijver et al., 1999] Schrijver, H. M., Crusius, J. B., Uitdehaag, B. M., Garcia Gonzalez, M. A., Kostense, P. J., Polman, C. H., and Pena, A. S. (1999). Association of interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in ms. *Neurology*, 52(3) :595–9.
- [Seboun, 1996] Seboun, E. (1996). Etude des facteurs génétiques d'une maladie à hérédité complexe : la sclérose en plaques. *Ann Instit Pasteur*, 7(1) :37–41.
- [Shaker et al., 2006] Shaker, O. G., Moustafa, W., Essmat, S., Abdel-Halim, M., and El-Komy, M. (2006). The role of interleukin-12 in the pathogenesis of psoriasis. *Clin Biochem*, 39(2) :119–25.

- [Shaulian and Karin, 2002] Shaulian, E. and Karin, M. (2002). Ap-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, 4(5) :E131–6.
- [Shepherd et al., 2004] Shepherd, J., Little, M. C., and Nicklin, M. J. (2004). Psoriasis-like cutaneous inflammation in mice lacking interleukin-1 receptor antagonist. *J Invest Dermatol*, 122(3) :665–9.
- [Simon et al., 1997] Simon, M., Montezin, M., Guerrin, M., Durieux, J. J., and Serre, G. (1997). Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J Biol Chem*, 272(50) :31770–6.
- [Siroux et al., 2008] Siroux, V., Bouzigon, E., Dizier, M. H., Pin, I., Demenais, F., and Kauffmann, F. (2008). Replication of association between adam33 polymorphisms and psoriasis. *PLoS ONE*, 3(6) :e2448.
- [Skov and Baadsgaard, 2000] Skov, L. and Baadsgaard, O. (2000). Bacterial superantigens and inflammatory skin diseases. *Clin Exp Dermatol*, 25(1) :57–61.
- [Smith et al., 2006] Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O’Regan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, P., and McLean, W. H. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*, 38(3) :337–42.
- [Smith et al., 2008] Smith, R. L., Warren, R. B., Eyre, S., Ke, X., Young, H. S., Allen, M., Strachan, D., McArdle, W., Gittins, M. P., Barker, J. N., Griffiths, C. E., and Worthington, J. (2008). Polymorphisms in the ptpn22 region are associated with psoriasis of early onset. *Br J Dermatol*, 158(5) :962–8.
- [Smyth et al., 2004] Smyth, D., Cooper, J. D., Collins, J. E., Heward, J. M., Franklyn, J. A., Howson, J. M., Vella, A., Nutland, S., Rance, H. E., Maier, L., Barratt, B. J., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Savage, D. A., Dunger, D. B., Widmer, B., Strachan, D. P., Ring, S. M., Walker, N., Clayton, D. G., Twells, R. C., Gough, S. C., and Todd, J. A. (2004). Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (lyp/ptpn22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, 53(11) :3020–3.
- [Sobel and Lange, 1996] Sobel, E. and Lange, K. (1996). Descent graphs in pedigree analysis : applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet*, 58(6) :1323–37.
- [Speckman et al., 2003] Speckman, R. A., Wright Daw, J. A., Helms, C., Duan, S., Cao, L., Taillon-Miller, P., Kwok, P. Y., Menter, A., and Bowcock, A. M. (2003). Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region

- of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility. *Hum Genet*, 112(1) :34–41.
- [Spielman et al., 1993] Spielman, R. S., McGinnis, R. E., and Ewens, W. J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium : the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (iddm). *Am J Hum Genet*, 52(3) :506–16.
- [Stegmeier et al., 2007] Stegmeier, F., Sowa, M. E., Nalepa, G., Gygi, S. P., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2007). The tumor suppressor *cyld* regulates entry into mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(21) :8869–74.
- [Stemmler et al., 2007] Stemmler, S., Parwez, Q., Petrasch-Parwez, E., Epplen, J. T., and Hoffjan, S. (2007). Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127(3) :722–4.
- [Stevenson and Zaki, 2002] Stevenson, O. and Zaki, I. (2002). Introduction to psoriasis. *Hospital Pharmacist*, 9 :187–90.
- [Stram, 2004] Stram, D. O. (2004). Tag snp selection for association studies. *Genet Epidemiol*, 27(4) :365–74.
- [Stuart et al., 2005] Stuart, P., Nair, R. P., Abecasis, G. R., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N. V., Qin, Z. S., Thompson, R. A., Jenisch, S., Weichenthal, M., Janiga, J., Lim, H. W., Christophers, E., Voorhees, J. J., and Elder, J. T. (2005). Analysis of *runx1* binding site and raptor polymorphisms in psoriasis : No evidence for association despite adequate power and evidence for linkage. *J Med Genet*.
- [Sugimura et al., 2003] Sugimura, K., Taylor, K. D., Lin, Y. C., Hang, T., Wang, D., Tang, Y. M., Fischel-Ghodsian, N., Targan, S. R., Rotter, J. I., and Yang, H. (2003). A novel *nod2/card15* haplotype conferring risk for crohn disease in ashkenazi jews. *Am J Hum Genet*, 72(3) :509–18.
- [Sugiyama et al., 2005] Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S. R., McCormick, T. S., and Cooper, K. D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue *cd4+cd25high* regulatory t cells in psoriasis : mechanism underlying unrestrained pathogenic effector t cell proliferation. *J Immunol*, 174(1) :164–73.
- [Sun et al., 2007] Sun, L. D., Li, W., Yang, S., Fan, X., Yan, K. L., Liang, Y. H., Gao, M., Cui, Y., Xiao, F. L., Du, W. H., Zhang, K. Y., Huang, W., Liu, J. J., and Zhang, X. J. (2007). Evidence for a novel psoriasis susceptibility locus at 9q33-9q34 in chinese hans. *J Invest Dermatol*, 127(5) :1140–4.
- [Sun et al., 2008] Sun, L. D., Yang, S., Liu, J. J., Ren, Y. Q., Fan, X., Xu, S. X., Zhou, L., Yang, C. J., Xiao, F. L., Gao, M., Cui, Y., Du, W. H., Huang, W., and Zhang, X. J. (2008). Follow-up analysis of 180 chinese han families :

- identification of a novel locus for psoriasis at 2p22.3-11.2. *Br J Dermatol*, 158(3) :512–7.
- [Suomela et al., 2007] Suomela, S., Kainu, K., Onkamo, P., Tiala, I., Himberg, J., Koskinen, L., Snellman, E., Karvonen, S. L., Karvonen, J., Uurasmaa, T., Reunala, T., Kivikas, K., Jansen, C. T., Holopainen, P., Elomaa, O., Kere, J., and Saarialho-Kere, U. (2007). Clinical associations of the risk alleles of hla-cw6 and cchcr1*wwcc in psoriasis. *Acta Derm Venereol*, 87(2) :127–34.
- [Swynghedauw, 2001] Swynghedauw, B. (2001). *Biologie et Génétique moléculaires : aide-mémoire*, chapter 2-3. Dunod.
- [Szczerkowska-Dobosz et al., 2004] Szczerkowska-Dobosz, A., Rebal, K., Szczerkowska, Z., and Witkowska-Tobola, A. (2004). Correlation of hla-cw*06 allele frequency with some clinical features of psoriasis vulgaris in the population of northern poland. *J Appl Genet*, 45(4) :473–6.
- [Takahashi et al., 2003] Takahashi, M., Matsuda, F., Margetic, N., and Lathrop, M. (2003). Automated identification of single nucleotide polymorphisms from sequencing data. *J Bioinform Comput Biol*, 1(2) :253–65.
- [Takahashi et al., 2005] Takahashi, N., Akahoshi, M., Matsuda, A., Ebe, K., Inomata, N., Obara, K., Hirota, T., Nakashima, K., Shimizu, M., Tamari, M., Doi, S., Miyatake, A., Enomoto, T., Nakashima, H., Ikezawa, Z., and Shirakawa, T. (2005). Association of the il12rb1 promoter polymorphisms with increased risk of atopic dermatitis and other allergic phenotypes. *Hum Mol Genet*, 14(21) :3149–59.
- [Takahashi et al., 2004] Takahashi, T., Tanaka, H., Iguchi, N., Kitamura, K., Chen, Y., Maekawa, M., Nishimura, H., Ohta, H., Miyagawa, Y., Matsumiya, K., Okuyama, A., and Nishimune, Y. (2004). Rosbin : a novel homeobox-like protein gene expressed exclusively in round spermatids. *Biol Reprod*, 70(5) :1485–92.
- [Tarlow et al., 1997] Tarlow, J. K., Cork, M. J., Clay, F. E., Schmitt-Egenolf, M., Crane, A. M., Stierle, C., Boehncke, W. H., Eiermann, T. H., Blakemore, A. I., Bleehen, S. S., Sterry, W., and Duff, G. V. (1997). Association between interleukin-1 receptor antagonist (il-1ra) gene polymorphism and early and late-onset psoriasis. *Br J Dermatol*, 136(1) :147–8.
- [Tazi Ahnini et al., 1999] Tazi Ahnini, R., Camp, N. J., Cork, M. J., Mee, J. B., Keohane, S. G., Duff, G. W., and di Giovine, F. S. (1999). Novel genetic association between the corneodesmosin (mhc s) gene and susceptibility to psoriasis. *Hum Mol Genet*, 8(6) :1135–40.
- [Tazi-Ahnini et al., 1999] Tazi-Ahnini, R., di Giovine, F. S., Cox, A., Keohane, S. G., and Cork, M. J. (1999). Corneodesmosin (mhc s) gene in guttate psoriasis. *Lancet*, 354(9178) :597.

- [Thivolet and Nicolas, 1997a] Thivolet, J. and Nicolas, J. (1997a). *Psoriasis de la clinique à la thérapeutique*, chapter 41-51, pages 175–218. John Libbey Eurotext.
- [Thivolet and Nicolas, 1997b] Thivolet, J. and Nicolas, J. (1997b). *Psoriasis de la clinique à la thérapeutique*, chapter 5-21, pages 35–101. John Libbey Eurotext.
- [Tiilikainen et al., 1980] Tiilikainen, A., Lassus, A., Karvonen, J., Vartiainen, P., and Julin, M. (1980). Psoriasis and hla-cw6. *Br J Dermatol*, 102(2) :179–84.
- [Tokuhira et al., 2003] Tokuhira, S., Yamada, R., Chang, X., Suzuki, A., Kochi, Y., Sawada, T., Suzuki, M., Nagasaki, M., Ohtsuki, M., Ono, M., Furukawa, H., Nagashima, M., Yoshino, S., Mabuchi, A., Sekine, A., Saito, S., Takahashi, A., Tsunoda, T., Nakamura, Y., and Yamamoto, K. (2003). An intronic snp in a runx1 binding site of slc22a4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 35(4) :341–8.
- [Tomfohrde et al., 1994] Tomfohrde, J., Silverman, A., Barnes, R., Fernandez-Vina, M. A., Young, M., Lory, D., Morris, L., Wuepper, K. D., Stastny, P., Menter, A., and et al. (1994). Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science*, 264(5162) :1141–5.
- [Torti and Feldman, 2007] Torti, D. C. and Feldman, S. R. (2007). Interleukin-12, interleukin-23, and psoriasis : current prospects. *J Am Acad Dermatol*, 57(6) :1059–68.
- [Trembath et al., 1997] Trembath, R. C., Clough, R. L., Rosbotham, J. L., Jones, A. B., Camp, R. D., Frodsham, A., Browne, J., Barber, R., Terwilliger, J., Lathrop, G. M., and Barker, J. N. (1997). Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet*, 6(5) :813–20.
- [Trompouki et al., 2003] Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tsihritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003). Cyld is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates nf-kappab activation by tnfr family members. *Nature*, 424(6950) :793–6.
- [Tsunemi et al., 2002] Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Fujita, H., Asano, N., Kishimoto, M., Tanida, Y., Kakinuma, T., Mitsui, H., Tada, Y., Wakugawa, M., Torii, H., Komine, M., Asahina, A., and Tamaki, K. (2002). Interleukin-12 p40 gene (il12b) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci*, 30(2) :161–6.
- [Tu et al., 2000] Tu, I. P., Balise, R. R., and Whittemore, A. S. (2000). Detection of disease genes by use of family data. ii. application to nuclear families. *Am J Hum Genet*, 66(4) :1341–50.

- [Valdimarsson et al., 1997] Valdimarsson, H., Sigmundsdottir, H., and Jonsdottir, I. (1997). Is psoriasis induced by streptococcal superantigens and maintained by m-protein-specific t cells that cross-react with keratin? *Clin Exp Immunol*, 107 Suppl 1 :21–4.
- [Van Eerdewegh et al., 2002] Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K., Walsh, A., Liu, Z., Hayward, B., Folz, C., Manning, S. P., Bawa, A., Saracino, L., Thackston, M., Benchekroun, Y., Capparell, N., Wang, M., Adair, R., Feng, Y., Dubois, J., FitzGerald, M. G., Huang, H., Gibson, R., Allen, K. M., Pedan, A., Danzig, M. R., Umland, S. P., Egan, R. W., Cuss, F. M., Rorke, S., Clough, J. B., Holloway, J. W., Holgate, S. T., and Keith, T. P. (2002). Association of the adam33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 418(6896) :426–30.
- [Veal et al., 2002] Veal, C. D., Capon, F., Allen, M. H., Heath, E. K., Evans, J. C., Jones, A., Patel, S., Burden, D., Tillman, D., Barker, J. N., and Trembath, R. C. (2002). Family-based analysis using a dense single-nucleotide polymorphism-based map defines genetic variation at psors1, the major psoriasis-susceptibility locus. *Am J Hum Genet*, 71(3) :554–64.
- [Veal et al., 2001] Veal, C. D., Clough, R. L., Barber, R. C., Mason, S., Tillman, D., Ferry, B., Jones, A. B., Ameen, M., Balendran, N., Powis, S. H., Burden, A. D., Barker, J. N., and Trembath, R. C. (2001). Identification of a novel psoriasis susceptibility locus at 1p and evidence of epistasis between psors1 and candidate loci. *J Med Genet*, 38(1) :7–13.
- [Velaga et al., 2004] Velaga, M. R., Wilson, V., Jennings, C. E., Owen, C. J., Herington, S., Donaldson, P. T., Ball, S. G., James, R. A., Quinton, R., Perros, P., and Pearce, S. H. (2004). The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (lyp) gene is a major determinant of graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(11) :5862–5.
- [Vereecken et al., 2007] Vereecken, P., Provost, P., Willaert, F., Heenen, M., and Bentin, J. (2007). [the treatment of psoriasis : basic principles and new options]. *Rev Med Brux*, 28(4) :336–44.
- [Walsh et al., 2003] Walsh, E. C., Mather, K. A., Schaffner, S. F., Farwell, L., Daly, M. J., Patterson, N., Cullen, M., Carrington, M., Bugawan, T. L., Erlich, H., Campbell, J., Barrett, J., Miller, K., Thomson, G., Lander, E. S., and Rioux, J. D. (2003). An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet*, 73(3) :580–90.
- [Watanabe et al., 2004] Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P. J., and Strober, W. (2004). Nod2 is a negative regulator of toll-like receptor 2-mediated t helper type 1 responses. *Nat Immunol*, 5(8) :800–8.

- [Watford et al., 2003] Watford, W. T., Moriguchi, M., Morinobu, A., and O'Shea, J. J. (2003). The biology of il-12 : coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5) :361–8.
- [Weeks and Lange, 1988] Weeks, D. E. and Lange, K. (1988). The affected-pedigree-member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 42(2) :315–26.
- [Weeks et al., 1990] Weeks, D. E., Lehner, T., Squires-Wheeler, E., Kaufmann, C., and Ott, J. (1990). Measuring the inflation of the lod score due to its maximization over model parameter values in human linkage analysis. *Genet Epidemiol*, 7(4) :237–43.
- [Weichenthal et al., 2007] Weichenthal, M., Ruether, A., Schreiber, S., Nair, R., Voorhees, J. J., Schwarz, T., Kabelitz, D., Christophers, E., Elder, J. T., and Jenisch, S. (2007). Filaggrin r501x and 2282del4 mutations are not associated with chronic plaque-type psoriasis in a german cohort. *J Invest Dermatol*, 127(6) :1535–7.
- [Weidinger et al., 2006] Weidinger, S., Illig, T., Baurecht, H., Irvine, A. D., Rodriguez, E., Diaz-Lacava, A., Klopp, N., Wagenpfeil, S., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Palmer, C. N., Jenneck, C., Maintz, L., Hagemann, T., Behrendt, H., Ring, J., Nothen, M. M., McLean, W. H., and Novak, N. (2006). Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1) :214–9.
- [Weidinger et al., 2005] Weidinger, S., Klopp, N., Rummeler, L., Wagenpfeil, S., Baurecht, H. J., Gauger, A., Darsow, U., Jakob, T., Novak, N., Schafer, T., Heinrich, J., Behrendt, H., Wichmann, H. E., Ring, J., and Illig, T. (2005). Association of card15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of caucasian adults. *Clin Exp Allergy*, 35(7) :866–72.
- [Wigginton and Abecasis, 2005] Wigginton, J. E. and Abecasis, G. R. (2005). Pedstats : descriptive statistics, graphics and quality assessment for gene mapping data. *Bioinformatics*, 21(16) :3445–7.
- [Wolf et al., 2008] Wolf, N., Quaranta, M., Prescott, N. J., Allen, M., Smith, R., Burden, A. D., Worthington, J., Griffiths, C. E., Mathew, C. G., Barker, J. N., Capon, F., and Trembath, R. C. (2008). Psoriasis is associated with pleiotropic susceptibility loci identified in type ii diabetes and crohn disease. *J Med Genet*, 45(2) :114–6.
- [Wooster et al., 1995] Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene brca2. *Nature*, 378(6559) :789–92.

- [Wrone-Smith and Nickoloff, 1996] Wrone-Smith, T. and Nickoloff, B. J. (1996). Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest*, 98(8) :1878–87.
- [Wu et al., 1997] Wu, C., Ferrante, J., Gately, M. K., and Magram, J. (1997). Characterization of il-12 receptor beta1 chain (il-12rbeta1)-deficient mice : Il-12rbeta1 is an essential component of the functional mouse il-12 receptor. *J Immunol*, 159(4) :1658–65.
- [Wu et al., 2000] Wu, C., Wang, X., Gadina, M., O’Shea, J. J., Presky, D. H., and Magram, J. (2000). Il-12 receptor beta 2 (il-12r beta 2)-deficient mice are defective in il-12-mediated signaling despite the presence of high affinity il-12 binding sites. *J Immunol*, 165(11) :6221–8.
- [Wu and Gu, 2007] Wu, Z. and Gu, J. R. (2007). [a meta-analysis on interleukin-1 gene cluster polymorphism and genetic susceptibility for ankylosing spondylitis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87(7) :433–7.
- [Xu and Shete, 2007] Xu, H. and Shete, S. (2007). Mixed-effects logistic approach for association following linkage scan for complex disorders. *Ann Hum Genet*, 71(Pt 2) :230–7.
- [Yamada and Ymamamoto, 2005] Yamada, R. and Ymamamoto, K. (2005). Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutat Res*, 573(1-2) :136–51.
- [Yan et al., 2007] Yan, K. L., Huang, W., Zhang, X. J., Yang, S., Chen, Y. M., Xiao, F. L., Fan, X., Gao, M., Cui, Y., Zhang, G. L., Sun, L. D., Wang, P. G., Chen, J. J., Li, W., Chen, Z. H., Wang, Z. M., Wang, D. Z., Zhang, K. Y., and Liu, J. J. (2007). Follow-up analysis of psors9 in 151 chinese families confirmed the linkage to 4q31-32 and refined the evidence to the families of early-onset psoriasis. *J Invest Dermatol*, 127(2) :312–8.
- [Yang et al., 2008] Yang, C. F., Hwu, W. L., Yang, L. C., Chung, W. H., Chien, Y. H., Hung, C. F., Chen, H. C., Tsai, P. J., Fann, C. S., Liao, F., and Chen, Y. T. (2008). A promoter sequence variant of znf750 is linked with familial psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128(7) :1662–8.
- [Yoshinaka et al., 2002] Yoshinaka, T., Nishii, K., Yamada, K., Sawada, H., Nishiwaki, E., Smith, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., and Higashiyama, S. (2002). Identification and characterization of novel mouse and human adam33s with potential metalloprotease activity. *Gene*, 282(1-2) :227–36.
- [Young et al., 2003] Young, C., Allen, M. H., Cuthbert, A., Ameen, M., Veal, C., Leman, J., Burden, A. D., Kirby, B., Griffiths, C. E., Trembath, R. C., Mathew, C. G., and Barker, J. N. (2003). A crohn’s disease-associated insertion polymorphism (3020insc) in the nod2 gene is not associated with psoriasis

- vulgaris, palmo-plantar pustular psoriasis or guttate psoriasis. *Exp Dermatol*, 12(4) :506–9.
- [Zenz et al., 2005] Zenz, R., Eferl, R., Kenner, L., Florin, L., Hummerich, L., Mehic, D., Scheuch, H., Angel, P., Tschachler, E., and Wagner, E. F. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of jun proteins. *Nature*, 437(7057) :369–75.
- [Zenz and Wagner, 2006] Zenz, R. and Wagner, E. F. (2006). Jun signalling in the epidermis : From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(7) :1043–9.
- [Zhang et al., 2002] Zhang, X. J., He, P. P., Wang, Z. X., Zhang, J., Li, Y. B., Wang, H. Y., Wei, S. C., Chen, S. Y., Xu, S. J., Jin, L., Yang, S., and Huang, W. (2002). Evidence for a major psoriasis susceptibility locus at 6p21(psors1) and a novel candidate region at 4q31 by genome-wide scan in chinese hans. *J Invest Dermatol*, 119(6) :1361–6.
- [Zhao et al., 2007] Zhao, Y., Terron-Kwiatkowski, A., Liao, H., Lee, S. P., Allen, M. H., Hull, P. R., Campbell, L. E., Trembath, R. C., Capon, F., Griffiths, C. E., Burden, D., McManus, R., Hughes, R., Kirby, B., Rogers, S. F., Fitzgerald, O., Kane, D., Barker, J. N., Palmer, C. N., Irvine, A. D., and McLean, W. H. (2007). Filaggrin null alleles are not associated with psoriasis. *J Invest Dermatol*, 127(8) :1878–82.
- [Zheng et al., 2003] Zheng, J., Jin, S., and Shi, R. (2003). Confirmation of psors psoriasis susceptibility loci in a chinese population. *Arch Dermatol Res*, 295(1) :14–8.
- [Zhou et al., 2003] Zhou, X., Krueger, J. G., Kao, M. C., Lee, E., Du, F., Menter, A., Wong, W. H., and Bowcock, A. M. (2003). Novel mechanisms of t-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics*, 13(1) :69–78.
- [Zhou and Chaplin, 1993] Zhou, Y. and Chaplin, D. D. (1993). Identification in the hla class i region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20) :9470–4.

Table des figures

1.1	Action conjointe de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux dans le déterminisme de quelques maladies	6
1.2	Maladie mendélienne et agrégation familiale dues à des facteurs de risque	8
1.3	Non-concordance entre phénotype et génotype dans le cas d'un facteur de risque génétique	10
1.4	Concordance et discordance du phénotype chez des jumeaux monozygotes (MZ) et dizygotes (DZ)	12
1.5	Différents états IBD possibles pour une paire de germains atteints	24
1.6	Relation entre allèles IBD et allèles IBS dans un système de 3 allèles	26
1.7	Comparaison entre les analyses de liaison et d'association pour détecter des effets génétiques	32
1.8	Aspects cliniques du psoriasis	37
1.9	Différentes couches de l'épiderme	40
1.10	Réseaux potentiels de cytokines dans les lésions psoriasiques	45
1.11	Equilibre des cytokines Th1/ Th2 et leurs rôles dans l'immunité	47
1.12	Lien entre les déséquilibres des cytokines et les maladies	47
1.13	Représentation schématique des chevauchements de loci de prédisposition avec les gènes correspondants mis en cause dans plusieurs maladies inflammatoires	64
1.14	Cartographie de la région <i>PSORS1</i> montrant la position des gènes connus ainsi que les régions candidates minimales pour contenir le gène causal identifiés lors des différentes études	66
1.15	Trois voies de signalisation des modèles murins de psoriasis : STAT3, AP-1 et NF- κ B	77
2.1	Principe de la PCR	89
2.2	Représentation de différents profils génétiques de différents individus analysés par le programme Genetic Profile	89
2.3	Approche "TagSNPs" se fait en trois étapes	94

2.4	Schématisation du principe du séquençage	96
2.5	Exemple d'une séquence visualisée par Genalys	100
2.6	Représentation des étapes de polymérisation dans la technique TAQ-MAN	102
2.7	Représentation graphique des résultats du génotypage d'un SNP bi-allélique obtenu par Taqman	104
2.8	Résumé des différentes étapes de la méthode SNPlex	110
3.1	Résumé des résultats les plus significatifs obtenus lors des analyses non paramétriques des données des criblages 1 et/ou 2	133
3.2	Représentation schématique des fonctions connues et putatives de PTPN22 dans la voie de signalisation du récepteur de surface des lymphocytes T (TCR)	162
3.3	Structure DL du gène <i>PTPN22</i>	166
3.4	Représentation de la structure du gène et de la protéine CARD15 et localisation des principales mutations associées à la maladie de Crohn	170
3.5	Fonction proposée de CARD15 dans la régulation de l'inflammation par l'intermédiaire de l'activation de la voie NF- κ B en réponse à différents composants bactériens	170
3.6	Structure DL du gène <i>CARD15</i>	172
3.7	Structure DL du gène <i>CYLD</i>	178
3.8	Structure DL du gène <i>SLC22A5</i>	190
3.9	Structure DL du gène <i>IL1R1</i>	196
3.10	Structure DL du gène <i>IL1A</i>	196
3.11	Structure DL du gène <i>IL1RN</i>	196
3.12	Représentation schématique de la structure des cytokines IL-12 et IL-23 et de leurs récepteurs	200
3.13	Structure DL du gène <i>SLC12A8</i>	205
3.14	Structure DL du gène <i>FLG</i>	211
3.15	Structure DL du gène <i>TGM3</i>	214
3.16	Structure DL du gène <i>TGM5</i>	214
3.17	Structure DL du gène <i>TGM6</i>	214
3.18	Représentation schématique de la voie de signalisation Tyrosine Kinase (TKs) couplé à STAT3	218
3.19	Structure DL du gène <i>STAT3</i>	220
3.20	Structure DL du gène <i>JUN</i>	226
4.1	Structure DL du gène <i>CYLD</i>	249
4.2	Structure DL du gène <i>SLC12A8</i>	250
4.3	Structure DL du gène <i>FLG</i>	251

Liste des tableaux

1.1	Exemples de quelques maladies multifactorielles où le facteur de risque génétique a été confirmé	10
1.2	Fréquence de quelques maladies inflammatoires et auto-immunes dans la population générale et chez les germains de premier degré du probant ainsi que les valeurs du risque relatif (λ s)	12
1.3	Fréquence des SNPs présents dans la population humaine	20
1.4	Nombre de SNPs présents à l'intérieur ou proches des régions codantes	20
1.5	Rôle des cellules T effectrices dans les réponses de type cellulaire et de type humoral contre les pathogènes	46
1.6	Hiérarchie des choix thérapeutiques du psoriasis vulgaire	49
1.7	Motivations pour initier un traitement systémique du psoriasis	52
1.8	Exemples de thérapies systémiques du psoriasis	54
1.9	Taux de concordance de différentes maladies multifactorielles chez les jumeaux monozygotes et dizygotes	58
1.10	Liste des loci de prédisposition au psoriasis et caractéristiques des populations utilisées pour les études	61
1.11	Gènes et variants associés avec le psoriasis retrouvés dans au moins une étude	72
1.12	Modèles murins et leur ressemblance au psoriasis humain	76
2.1	Structure et caractéristiques généalogiques et cliniques des 126 familles du Lot I et du Lot II	82
2.2	Microsatellites supplémentaires génotypés dans les 14 premières familles du Lot I ou dans la totalité des 46 familles du même lot	84
2.3	Mélange réactionnel pour une amplification individuelle du marqueur par PCR sur une plaque de 96 puits	88
2.4	Différentes étapes du cycle de la PCR le plus souvent utilisé	88
2.5	Liste des amorces choisis pour chaque exon du HLA-C	96
2.6	Conditions choisies pour l'amplification des exons 2 et 3 du gène HLA-C	98

2.7	Mélange réactionnel pour une amplification individuelle des exons 2 et 3 par PCR sur une plaque de 96 puits	98
2.8	Différentes étapes du cycle de la PCR, variant selon la température d'hybridation des amorces pour chaque exon	98
3.1	Résumé des résultats les plus significatifs ($Z > 2$) de l'analyse de liaison paramétrique réalisé sur la totalité des marqueurs (Criblage 1+2) sur les 46 familles françaises par MLINK	130
3.2	Résultats de l'analyse de 4 Tag SNPs de l'allèle HLA-Cw6 (le locus PSORS1) par les méthodes FBAT et LNMs	140
3.3	Caractéristiques des TagSNPs marquant spécifiquement l'allèle HLA-Cw6	142
3.4	Résultats des différentes combinaisons des Tag SNPs de l'allèle HLA-Cw6 par analyse FBAT	142
3.5	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>PTPN22</i> sur 45 familles (Lot I) par FBAT	166
3.6	Analyse d'association des haplotypes de <i>PTPN22</i> sur le Lot I par FBAT	167
3.7	Analyse d'association des TagSNPs de <i>PTPN22</i> sur le Lot I avec la méthode "LNMs"	167
3.8	Analyse d'association des TagSNPs de <i>PTPN22</i> , suggestifs dans le Lot I, faite sur un deuxième lot de 83 familles (Lot II) et sur l'ensemble des familles (Lot I et Lot II)	167
3.9	Analyse d'association des TagSNPs de <i>PTPN22</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	167
3.10	Identification et test d'association des TagSNPs de <i>CARD15</i> sur le Lot I par FBAT	172
3.11	Analyse d'association des haplotypes de <i>CARD15</i> sur le Lot I par FBAT	174
3.12	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CARD15</i> dans le Lot I avec la méthode "LNMs"	175
3.13	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CARD15</i> , suggestifs dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	175
3.14	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CARD15</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	175
3.15	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>CYLD</i> sur le Lot I par FBAT	178
3.16	Analyse d'association des haplotypes de <i>CYLD</i> sur le Lot I par FBAT	180
3.17	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CYLD</i> dans le Lot I avec la méthode "LNMs"	180
3.18	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CYLD</i> , suggestifs dans le Lot I, faite sur un deuxième lot de 83 familles (Lot II) et sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	180

3.19	Analyse d'association des TagSNPs de <i>CYLD</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	180
3.20	Identification et test d'association des TagSNPs de <i>SLC9A3R1/NAT9</i> sur le Lot I par FBAT	184
3.21	Analyse d'association des haplotypes de <i>SLC9A3R1/NAT9</i> sur le Lot I par FBAT	184
3.22	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC9A3R1/NAT9</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	184
3.23	Identification et test d'association des TagSNPs de <i>RAPTOR</i> sur le Lot I par FBAT	186
3.24	Analyse d'association des haplotypes de <i>RAPTOR</i> sur le Lot I par FBAT	186
3.25	Analyse d'association des TagSNPs de <i>RAPTOR</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	186
3.26	Identification et test d'association des TagSNPs de <i>SLC22A4</i> et <i>SCL22A5</i> sur le Lot I par FBAT	190
3.27	Analyse d'association des haplotypes de <i>SLC22A4</i> et de <i>SLC22A5</i> sur le Lot I par FBAT	191
3.28	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC22A5</i> dans le Lot I avec la méthode "LNMs"	191
3.29	Analyse d'association du seul TagSNP de <i>SLC22A5</i> , suggestif dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	191
3.30	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC22A4</i> et de <i>SLC22A5</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	191
3.31	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>IL1R1</i> , <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> et <i>IL1RN</i> sur le Lot I par FBAT	197
3.32	Analyse d'association des haplotypes de <i>IL1R1</i> , <i>IL1A</i> , <i>IL1B</i> et <i>IL1RN</i> sur le Lot I par FBAT	198
3.33	Analyse d'association des TagSNPs dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	198
3.34	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>IL12RB1</i> sur le Lot I par FBAT	202
3.35	Analyse d'association des haplotypes de <i>IL12RB1</i> sur le Lot I par FBAT	202
3.36	Analyse d'association des TagSNPs de <i>IL12RB1</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	202
3.37	Identification et analyse d'association des TagSNPs dans <i>SLC12A8</i> sur le Lot I par FBAT	205
3.38	Analyse d'association des haplotypes de <i>SLC12A8</i> sur le lot I par FBAT	206

3.39	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC12A8</i> dans le lot I avec la méthode "LNMs"	206
3.40	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC12A8</i> , suggestifs dans le lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	206
3.41	Analyse d'association des TagSNPs de <i>SLC12A8</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	207
3.42	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>FLG</i> sur le Lot I par FBAT	211
3.43	Analyse d'association des TagSNPs de <i>FLG</i> dans le Lot I avec la méthode "LNMs"	211
3.44	Analyse d'association des haplotypes de <i>FLG</i> sur le Lot I par FBAT	212
3.45	Analyse d'association des TagSNPs de <i>FLG</i> , suggestifs dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	212
3.46	Analyse d'association des TagSNPs de <i>FLG</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	212
3.47	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>TGM1</i> , <i>TGM3</i> , <i>TGM5</i> et <i>TGM6</i> sur le Lot I par FBAT	216
3.48	Analyse d'association des haplotypes de <i>TGM1</i> , <i>TGM3</i> , <i>TGM5</i> et <i>TGM6</i> sur le Lot I par FBAT	217
3.49	Analyse d'association des TagSNPs de <i>TGM1</i> , <i>TGM3</i> , <i>TGM5</i> et <i>TGM6</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	217
3.50	Identification et analyse d'association des TagSNPs de <i>STAT3</i> sur le Lot I par FBAT	220
3.51	Analyse d'association des TagSNPs de <i>STAT3</i> dans le Lot I avec la méthode "LNMs"	222
3.52	Analyse d'association du TagSNP de <i>STAT3</i> , suggestif dans le Lot I, faite sur le Lot II et ainsi que sur l'ensemble des lots (Lot I et Lot II)	222
3.53	Analyse d'association des haplotypes de <i>STAT3</i> sur le Lot I par FBAT	222
3.54	Analyse d'association des TagSNPs de <i>STAT3</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	222
3.55	Identification et test d'association des TagSNPs de <i>JUN</i> , <i>JUNB</i> sur le Lot I par FBAT	226
3.56	Analyse d'association des haplotypes de <i>JUN</i> sur le Lot I par FBAT	226
3.57	Analyse d'association des TagSNPs de <i>JUN</i> dans les sous groupes porteurs ou non de l'allèle à risque HLA- <i>Cw6</i> dans le Lot I	228

Abréviations

AD	Dermatite Atopique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADAM33	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase domain 33</i>
ARN	Acide Ribonucléique
AS	Spondylarthrite Ankylosante
ASO	<i>Allele-Specific Oligonucleotide</i>
ASP	<i>Affected Sibling Pair</i> , paires de germains atteints
AP-1	<i>Activating Protein 1</i>
APM	<i>Affected Pedigree Member</i>
CARD15	<i>CAspase Recruitment Domain family member 15</i>
CD	maladie de Crohn
CDSN	Cornéodesmosine
CeD	maladie Coeliaque
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
cM	centiMorgan
CNG	Centre National de Génotypage
CYLD	<i>CYLinDromatosis tumor suppressor</i>
ddNTP	Didésoxynucléotide
DEFB	DEFensines, Béta
DID	Diabète InsulinoDépendant
DL	Déséquilibre de Liaison
DZ	jumeaux DiZygotes
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FBAT	<i>Family Based Association Test</i>
FLG	FiLaGrine
GD	maladie de Graves-basedow
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HBAT	<i>Haplotype Based Association Test</i>

HCR	<i>α-Helical Coiled-coil Rod homologue</i>
HRR	<i>Haplotype Relative Risk</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IBD	<i>Identity By Descent</i> , identité par descendance
IBS	<i>Identity By State</i> , identité par état
ICAM-1	Molécule d'Adhésion InterCellulaire de type 1
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL1A	InterLeukine 1, Alpha
IL1B	InterLeukine 1, Béta
IL-1R1	Récepteur de l'InterLeukine 1, type 1
IL1RN/ IL1RA	Antagoniste du récepteur de l'InterLeukine 1
IL12RB1	Récepteur de l'InterLeukine 12, Béta 1
kb	Kilobase
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LB	Lymphocyte B
LNМ	<i>Logistic-Normal Models</i>
LT	Lymphocyte T
LOD	<i>Logarithm of ODDs</i> , logarithme des probabilités
LSO	<i>Locus-Specific Oligonucleotide</i>
LYP	<i>LYmphoid-specific Phosphatase</i>
Maf	<i>MusculoAponeurotic Fibrosarcome protein</i>
MHC/CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
MS	Sclérose en plaques
MLB	<i>Maximum Likelihood Binomial</i>
MLS	<i>Maximum Likelihood Score</i>
MZ	jumeaux MonoZygotes
NAT 9	<i>AcetylTransferase family member</i>
NPL	<i>Non Parametric Linkage</i>
OLA	Oligonucleotide Ligation
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
OR (95% CI)	odds ratio (intervalle de confiance à 95%)
OTF3	<i>octamer-binding transcription factor 3</i>
pb	paire de base
PBC	Cirrhose Biliaire Primitive
PCR	Polymérisation en chaîne
POU5F1	<i>POU-type homeodomain-containing DNA-binding protein</i>
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PsA	Arthrite Psoriasique
PSORS	locus de prédisposition au psoriasis
PsV	Psoriasis Vulgaris

PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor, type 22</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPTOR	<i>Regulatory Associated Protein of mTOR</i>
SIGLEC1	<i>Sialic acid binding Ig-like LECTin 1, sialoadhesin</i>
SLC9A3R1	<i>SoLute Carrier family 9 isoform 3 Regulator 1</i>
SLC12A8	<i>SoLute Carrier family 12 member 8</i>
SLC22A4	<i>SoLute Carrier family 22 member 4</i>
SLC22A5	<i>SoLute Carrier family 22 member 5</i>
SLE	<i>Lupus Erythémateux Systémique</i>
SNP	<i>Single Nucléotide Polymorphism</i>
SSP-PCR	<i>Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TCF19	<i>TransCription Factor 19</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TGM	<i>TransGlutaMinase</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
UC	<i>Colite Ulcération</i>
UNG	<i>Uracyl-N-Glycosylase</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
UTR	<i>Région non-Traduite</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
T1D	<i>Diabète de Type 1</i>
TDT	<i>Test de Déséquilibre de Transmission</i>

Bases de données et logiciels

Bases de données publiques

Applied Biosystems website

<http://www.appliedbiosystems.com>

dbSNP website

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

Ensembl

<http://www.ensembl.org/>

HapMap website

<http://www.hapmap.org/>

IMGT/HLA Database

<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>

NCBI website

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

OMIM database

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>

Perlegen website

<http://genome.perlegen.com/>

UCSC Genome Bioinformatics Site

<http://genome.ucsc.edu/>

Logiciels utilisés pour les analyses génétiques

FBAT

<http://www.biostat.harvard.edu/fbat/default.html>

Primer 3

http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

R software

<http://www.r-project.org/>

Rockefeller software list

<http://linkage.rockefeller.edu/soft>

RÉSUMÉ

Le psoriasis est une maladie complexe inflammatoire et chronique de la peau, due à une forte composante génétique et des facteurs environnementaux. Seule l'implication d'un locus majeur de prédisposition au psoriasis au niveau du chromosome 6p21, nommé *PSORS1*, a été démontrée dans diverses populations lors d'études de liaison et d'association. Ce locus ne serait responsable que de 30 à 50% de la part génétique. L'objectif de ma thèse était donc d'identifier les autres facteurs génétiques, en particulier dans un échantillon d'une population d'origine française. Pour identifier les loci, une étude de liaison a été réalisée, découvrant des régions potentielles en 12q, 14q, 16p, 20p, en plus de celle en 6p. Deux loci en 6p et 20p ont surtout été étudiés, amenant à la caractérisation de deux gènes, *HLA-C* et *ADAM33*. En parallèle, une stratégie de "gènes candidats" a été appliquée, conduisant à suspecter un rôle probable pour les gènes *FLG*, *TGM5*, *CARD15* et *CYLD* et à confirmer celui de *SLC12A8* dans l'étiologie du psoriasis.

MOT-CLEFS

psoriasis, polymorphismes, liaison, association, déséquilibre de liaison

TITLE

Recherche de gènes de prédisposition à une maladie à hérédité complexe: le psoriasis

ABSTRACT

The psoriasis is a complex chronic inflammatory skin disease due to a strong genetic component as well as environmental factors. The only major locus for psoriasis susceptibility implicated to date, named *PSORS1* on chromosome 6p21, has been demonstrated in various populations in linkage and association studies. It could nevertheless be responsible for up to 50% of the genetic contribution to the disease. The aim of my thesis was thus to identify the other genetic factors, in particular in the French population. To identify the loci, a linkage study was carried out, showing possible regions on 12q, 14q, 16p, 20p, in addition to that on 6p. Two loci on 6p and 20p were studied in more detail, revealing the contribution of the two genes, *HLA-C* and *ADAM33*. In parallel, a "candidate gene" strategy was undertaken, exposing a probable role of *FLG*, *TGM5*, *CARD15* and *CYLD* genes and a confirmed role of *SLC12A8* gene in the etiology of psoriasis.

KEYWORDS

psoriasis, polymorphisms, linkage, association, linkage disequilibrium

ISBN : 0000000000