



HAL
open science

Interactions gène-environnement pour la modélisation des phénotypes d'addictions complexes

Mohamed El Hadi Zerdazi

► **To cite this version:**

Mohamed El Hadi Zerdazi. Interactions gène-environnement pour la modélisation des phénotypes d'addictions complexes. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB048 . tel-04215593

HAL Id: tel-04215593

<https://theses.hal.science/tel-04215593>

Submitted on 22 Sep 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES

MEMBRE DE

U^SPC
Université Sorbonne
Paris Cité

Université Paris Descartes

Ecole doctorale 563 Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries « MTCI »

INSERM UMR-S 1144 – Variabilité de réponse aux psychotropes

Interactions Gènes - Environnement pour la Modélisation des Phénotypes d'Addictions Complexes

Par Mr El-Hadi ZERDAZI

Thèse de doctorat de Pharmacogénomique

Dirigée par Mr le Pr Frank BELLIVIER

Présentée et soutenue publiquement le 16 octobre 2018 à Paris

Devant un jury composé de :

- **Mr le Pr Yann LE STRAT** – PU-PH – Université Paris DIDEROT – *Président du Jury*
- **Mme le Dr Florence VORSPAN** – MCU-PH – Université Paris DESCARTES – *Membre du Jury*
- **Mr le Pr Alain DERVAUX** – PU-PH – Université d'Amiens – *Rapporteur*
- **Mr le Pr Antoine PELISSOLO** – PU-PH – Université Paris-Est Créteil - *Rapporteur*

A mon feu père,

Résumé (français)

Dans le domaine de la psychopharmacologie des addictions on peut explorer des phénotypes complexes, à l'interaction de facteurs individuels et environnementaux. Ces phénotypes peuvent être la vulnérabilité aux troubles addictifs, les complications survenant lors de la prise de substances, ou la réponse pharmacologique aux traitements dans cette indication. Dans ce travail nous sommes intéressés à la modélisation de certains de ces phénotypes complexes.

Pour ce travail, nous avons, à partir de populations cliniques, construit des modèles statistiques d'association entre des variables cliniques et génétiques, principalement des SNPs issus de puces à ADN. De plus, des modèles d'interaction avec l'environnement ont été testés.

Nous avons exploré dans notre première publication la piste d'une vulnérabilité immunologique qui pourrait expliquer l'incidence du tabagisme chez des patients bipolaires. Nous avons retrouvé une association entre un SNP (rs10759932) du gène TLR4, gène codant pour un récepteur clé de l'immunité innée, et le tabagisme vie entière chez ces patients. Cette association serait restreinte uniquement aux patients bipolaires, ce qui laisserait suggérer une vulnérabilité particulière de cette population à développer une dépendance à la nicotine après exposition au tabac.

Dans une seconde étape, nous avons mis au point un script sur R (logiciel d'analyse statistique) nous permettant d'extraire l'ensemble des SNPs d'un ou plusieurs gènes des fichiers spécifiques aux puces de génotypage de notre seconde cohorte de patients

Notre deuxième publication explore l'interaction entre la posologie quotidienne de méthadone, traitement de substitution de la dépendance aux opiacés, et des SNPs de gènes codant pour des protéines impliquées dans la contraction myocardique, pour expliquer l'allongement de l'intervalle QT corrigé chez des patients substitués par Méthadone. Nos principaux résultats étaient : l'association du gène KCNE1, codant pour un canal potassique cardiaque, avec la longueur de l'intervalle QT corrigé. De plus, nous retrouvions une interaction d'un SNP de ce gène (rs11911509) avec la posologie de méthadone pour expliquer une partie de la variance phénotypique.

La troisième partie s'intéresse à l'étude d'un phénotype compliquant la prise de cocaïne que sont les troubles psychotiques transitoires induits. Chez des sujets consommateurs vie entière de cocaïne, nous avons testé l'association de plusieurs SNPs de gènes de la voie dopaminergique, voie impliquée dans l'effet renforçant de la cocaïne et dans la survenue de symptômes psychotiques. Bien que dans nos résultats, les facteurs cliniques expliquaient de façon prépondérante la survenue de ces symptômes, les facteurs génétiques amélioraient significativement la variance du modèle explicatif. D'autre part, nous n'avons pas retrouvé d'interaction entre gènes et facteurs cliniques, ce qui laisse suggérer un effet additif de ces facteurs.

Enfin, j'ai réalisé un travail de contrôle qualité sur des données de séquençage exonique de 6 gènes d'une voie de signalisation identifiée dans des modèles animaux comme étant associée à l'acquisition de la dépendance à la cocaïne. La découverte de la mauvaise qualité du séquençage ne nous a pas permis de réaliser l'étude d'association cas-témoins initialement prévue.

Ce travail de thèse montre que les interactions entre des facteurs de risque génétiques et environnementaux peuvent expliquer plusieurs phénotypes de vulnérabilité ou de sévérité dans les addictions. Ces interactions pourraient rendre compte de la variabilité des phénomènes observés en clinique et nous permettent de nous acheminer vers une prise en charge plus personnalisée des patients présentant des troubles addictifs.

Title

Gene x Environment Interactions for the Modeling of Complex Addiction Phenotypes

Abstract

Psychopharmacology in the field of substance use disorder can explore complex phenotypes, resulting from the interaction of individual and environmental risk factors. Among these phenotypes, the susceptibility to develop the disorder, specific medical or psychiatric conditions associated with drug use, or pharmacological response to treatments are of clinical interest. In this work, we worked on three complex phenotypes associated with substance use disorders.

We have built association models using clinical and genetic variables, mainly single variant polymorphisms (SNP) derived from DNA chips, and tested interactions with environmental factors in different samples of patients in clinical care.

The first publication explored the hypothesis of an immunological vulnerability to the high incidence of smoking in a population of patients affected by bipolar disorder. We found an association between a SNP (rs10759932) of the TLR4 gene, coding for a major innate immune receptor, and lifetime smoking. This association may be restricted to bipolar patients, which suggests a specific vulnerability of this population to nicotine dependence after smoking initiation.

In a subsequent step, we have developed a new R script (statistical analysis software) to extract all the variants located in one or several genes from the specific DNA chip that we used further on.

Our second publication explores the interaction between the daily dosage of methadone, an opioid maintenance treatment, and several genetic polymorphisms of genes encoding for proteins involved in the cardiac contraction to explain the lengthening of corrected QT interval in a population of treated patients. We found a significant association between the KCNE1 gene, coding for a potassium channel, with the duration of the corrected QT interval, and an interaction between a variant of this gene (rs11911509) with the methadone dosage to explain a part of the phenotypic variance.

We also worked on transient cocaine-induced psychotic symptoms. Among a population of lifetime cocaine users, we tested the association of several SNPs from the dopamine pathway genes with this complication of cocaine use. Although clinical factors predominantly explained the occurrence of these symptoms, we found that genetic factors significantly improved the variance of our explanatory model. Besides, we did not find any interaction between genes and clinical factors, which suggests an addictive effect of clinical and genetic factors.

Finally, I performed a quality control of exon sequencing data from 6 genes of a cell signalling pathway identified in animal models as being associated with cocaine dependence acquisition. We found that sequencing data were of poor quality, which did not allow us to perform the planned case-control association study.

This thesis shows that genetic and environmental interactions can explain several phenotypes of vulnerability or severity in substance use disorders. These interactions could account for the variability observed in clinical practice and allow us to move towards more personalized management of patients with addictive disorders.

Mots clés

Gène, environnement, interaction, addictions, TL4, nicotine, trouble bipolaire, Méthadone, QT, voie dopaminergique, symptômes psychotiques, génotypage, séquençage, cocaïne.

Keywords

Gene, environment, interaction, addictions, TL4, nicotine, bipolar disorder, Methadone, QT, dopaminergic pathway, psychotic symptoms, genotyping, sequencing, cocaine.

☞ Remerciements ☜

A Monsieur le Professeur Frank BELLIVIER

Professeur, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, de m'avoir toujours soutenu dans mon travail, et de m'avoir prodigué vos précieux conseils.

Merci encore d'avoir été disponible.

A Madame le Docteur Florence VORSPAN

Florence, je ne sais pas si ces mots pourront exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers ta présence et ton soutien, que ce soit durant ma thèse ou même avant. Sans toi je n'aurai jamais mis un pied dans la recherche avec autant de rigueur et d'efficacité. Tu as toujours été disponible et motivante.

Merci encore pour tes précieux conseils.

A Monsieur le Professeur Antoine PELISSOLO

Professeur, je vous remercie d'avoir accepté sans hésitation de juger mon travail et de l'intérêt que vous portez à mon parcours.

Soyez assuré de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Professeur Alain DERVAUX

Professeur, je vous suis reconnaissant du temps que vous avez consacré à évaluer mon travail de thèse et d'en avoir été le rapporteur.

Veillez croire en mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur Yann LE STRAT

Professeur, vous m'avez accepté de faire partie de mon jury de thèse et j'en suis honoré.

Soyez assuré de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Jean-Louis LAPLANCHE

Professeur, vous m'avez accepté dans votre unité INSERM et je vous en suis extrêmement reconnaissant.

Merci encore pour votre gentillesse et bienveillance.

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans le soutien indéfectible de mes proches et de mes collègues :

A ma mère, ton amour et tes sacrifices m'ont permis de me construire et de tracer mon avenir.

A ma femme Imène, merci pour ta patience tout au long de ma thèse. Tu es celle avec qui je partage une vie pleine d'affection et de joie.

A ma sœur Lamia, à mon frère Malik, à Souad et à mes petits neveux Ghozlane & Wassim.

A mes collègues de l'unité INSERM.

Au Dr TRABUT, pour ses encouragements et son soutien, et à tous mes amis et collègues du service d'addictologie d'Emile ROUX et d'Albert CHENVIER.

A mes collègues et amis du pôle de psychiatrie du GH MONDOR.

A ma famille, mes amis et mes proches en Algérie et en France.

Aux patients, sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Liste des principales abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANOVA	ANalysis Of VAriance
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1
Cellules Tregs	Lymphocytes T Régulateurs
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CSAPA	Centre de Soins, d'Accompagnement et de Prévention en Addictologie
CYP	Cytochrome P450
DAT	Dopamine Active Transporter
DBH	Dopamine β Hydroxylase
ddl	Degrés De Liberté
DRD1	Dopamine Receptor D1
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders
ECG	Electrocardiogramme
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2
ESM	Erreur Standard de la Moyenne
FAM	Fréquence de l'Allèle Mineur
FST	Indice de fixation
GRCh37	Genome Reference Consortium Human build 37
GRIN1 - GRIN2B	Glutamate [NMDA] Receptor subunit zeta-1 et 2B
GWAS	Genome Wide Association Study (Etude d'association pangénomique)
hERG	human Ether-à-go-go-Related Gene
HUGO	HUman Genome Organisation
IC95%	Intervalle de Confiance à 95%
KCNH2	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
KCNQ1	Potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1
NGS	Next Generation Sequencing (Séquençage nouvelle génération)
NMD	Nonsense-mediated Decay (Dégradation des ARNm non-sens)
NMDA	Récepteur N-methyl-D-aspartate
NOS1AP	Nitric Oxide Synthase 1 Adaptor Protein
MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MDS	Multi Dimensional Scaling
OFDT	Observatoire Français des Drogues et Toxicomanies
PHRC	Programme Hospitalier de Recherche Clinique
SAPS-CIP	Scale for Assessment of Positive Symptoms for Cocaine Induced Psychosis
SCN5A	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5
SLC6A3	Solute Carrier 6A3
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme d'un nucléotide simple)
SPIC	Symptômes Psychotiques Induits par la Cocaïne
TdP	Torsades de Pointes
TLR	Toll Like Receptor
TSO	Traitement de Substitution Orale
UCSC	University of California, Santa Cruz genome browser

UTR	Untranslated Transcribed Region
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIF	Variance Inflation Factor (Facteur d'inflation de la variance)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Tables des Matières

I.	INTRODUCTION	14
A.	Les addictions : un phénotype complexe	14
B.	Facteurs de vulnérabilité génétique aux addictions.....	14
C.	Facteurs de risque environnementaux des addictions.....	17
D.	Intérêt des modélisations gènes x environnement.....	17
II.	RECEPTEUR TLR4 ET TABAGISME DES PATIENTS BIPOLAIRES.....	20
A.	Tabagisme et trouble bipolaire de l’humeur.....	20
B.	Hypothèse inflammatoire dans les phénotypes de sévérité du trouble de l’humeur	21
C.	Hypothèse inflammatoire dans les addictions des patients bipolaires.....	22
D.	Etude de la cohorte bipolaire « CEB »	22
1.	Méthode de l’étude	22
2.	Résultats.....	24
3.	Discussion.....	27
E.	ARTICLE N°1 :	31
III.	SIGNADDICT : EXPLORATION DE SEQUENCAGE DE GENES DE GENES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LA DEPENDANCE A LA COCAINE	38
A.	Addictions à la cocaïne : Importance des voies de transduction dans un modèle animal.....	38
B.	Comparaison de la cohorte « COCAINE » à une série de sujets contrôles	40
1.	Méthode de l’étude	40
2.	Résultats.....	41
3.	Discussion.....	41
IV.	MISE AU POINT DU LOGICIEL SNPretrieve	42
A.	Mise à disposition de la cohorte « <i>Methadose & Psychocoke</i> » génotypée sur puce Illumina « PsychArray ».....	42
B.	Présentation de la puce Illumina « PsychArray »	42
1.	Problématique.....	42
2.	Intérêt du script SNPretrieve	43
3.	Fonctionnement du script.....	44
4.	Discussion.....	45
V.	RISQUE D’ALLONGEMENT DE L’INTERVALLE QT A L’ECG LORS DU TRAITEMENT PAR METHADONE DES PATIENTS DEPENDANTS DE L’HEROINE	47
A.	La Méthadone : traitement de référence de la dépendance aux opiacés	47
B.	Pharmacogénétique des effets secondaires de la méthadone et rôle de l’environnement	47
1.	Rôle de l’environnement :	48
2.	Les facteurs génétiques	49
C.	Etude de l’allongement de l’espace QT dans la cohorte Méthadose.....	49
1.	Résumé de la méthodologie de l’étude	50
2.	Synthèse des résultats	54
3.	Discussion.....	58
D.	ARTICLE N°2 :	61

VI.	SYMPTÔMES PSYCHOTIQUES TRANSITOIRES LORS DE L'USAGE DE COCAÏNE.....	81
A.	Les symptômes psychotiques sous cocaïne : un effet secondaire grave mais variable.....	81
1.	Les facteurs de risque cliniques	82
2.	Les études d'association génétiques.....	83
B.	Etude d'association des gènes candidats dopaminergiques avec les symptômes psychotiques transitoires induits par la cocaïne.....	84
1.	Méthodologie de l'étude	84
2.	Résultats.....	87
3.	Discussion.....	94
VII.	DISCUSSION GENERALE.....	99
A.	Technologies : développement logiciel, études d'association génétique, traitement des données de séquençage, variants fréquents/rares, modélisation	99
B.	Intérêt de la modélisation gènes x environnement dans les phénotypes d'addictions complexes : maladies polygéniques, multifactorielles, variants à taille d'effet faible, fort impact environnemental, et avancées physiopathologiques.	100
VIII.	CONCLUSION	102
IX.	Bibliographie.....	103
X.	Annexes.....	117
A.	Annexe 1 : Matériel supplémentaire article « Récepteur TLR4 et Tabagisme des patients bipolaires ».....	117
B.	Annexe 2 : Matériel supplémentaire de l'article « Risque d'allongement de l'intervalle QT à l'ECG lors du traitement par Méthadone des patients dépendants de l'héroïne ».	119
C.	Annexe 3 : Echelle SAPS-CIP	125
D.	Annexe 4 : Script SNPretrieve.....	126

Table des illustrations et tableaux

Figure I-1 : Estimation de l'héritabilité des troubles psychiatriques et addictifs. Adaptée de Freitag, 2007 (Freitag, 2007) ; Bienvenu & al., 2011 (Bienvenu et al., 2011) et Goldman & al., 2005 (Goldman et al., 2005).....	16
Tableau II-1 : caractéristiques démographiques et cliniques l'ensemble des patients bipolaires inclus	24
Tableau II-2 : Fréquences des fumeurs vie et des patients n'ayant jamais fumé par génotype et par allèle, ainsi que la probabilité d'association (valeur de p) avec le tabagisme vie entière chez les patients bipolaires.....	25
Figure II-2 : Fréquences des allèles du SNP rs10759932 du gène TLR4 chez les fumeurs vie entière et chez les patients n'ayant jamais fumé dans une population de patients bipolaires (***) : p < 0.001).....	26
Figure IV-1 : Exemple d'une sortie du script SNPretrieve avec le gène <i>DRD1</i>	46
Figure V-1 : Sélection des sujets pour l'analyse	53
Tableau V-1 : Caractéristiques socio démographiques et cliniques des sujets analysés et leur association avec la longueur de l'intervalle QT corrigé.....	54
Figure V-2 : Longueur de l'intervalle QTc selon les génotypes du SNP rs11911509 du gène <i>KCNE1</i> ...	55
Figure V-3 : Corrélations de l'intervalle QTc avec la posologie quotidienne de Méthadone selon les génotypes du SNP rs11911509.....	56
Tableau V-2 : Variants associés avec la longueur de l'intervalle QTc avec une valeur nominale de p < 5%	57
Tableau VI-1 : Caractéristiques socio démographiques et cliniques des sujets analysés et leur association avec le score total de l'échelle SAPS-CIP	88
Figure VI-1 : SNPs par gène sélectionnés pour l'analyse.....	89
Figure VI-2 : score de l'échelle SAPS-CIP les génotypes du SNP rs740603 (gène <i>COMT</i>)	90
Tableau VI-2 : Variants associés au score SAPS-CIP avec une valeur nominale de p < 5%	91
Figure VI-3 : Déséquilibre de liaison entre les SNPs du gène <i>COMT</i> (exprimé en r^2) et construction de blocs haplotypiques selon la méthode de Gabriel & al.	92
Tableau VI-3 : fréquences, moyennes et associations avec le score SAPS-CIP des haplotypes du deuxième bloc haplotypique du gène <i>COMT</i>	93
S.Tableau X-1 : Distributions génotypique et allélique des patients bipolaires fumeurs et non fumeurs avec la valeur p du test exact d' Hardy Weinberg (HWE) chez ceux qui n'ont jamais fume après correction de Bonferroni pour tests multiples.....	117
S.Figure X-1 : Fréquences génotypiques du SNP rs10759932 du gene TLR4 chez les patients bipolaires fumeurs et jamais fumeurs (*** : p (avec correction de Bonferroni) < 0.001).	118
S.Tableau X-2 : Résumé de l'analyse Gene-Based.....	119
S.Figure X-2 : Analyse en composante principale de la fusion de la cohorte d'étude avec les populations de la base 1000Genome. La ligne pointillée verticale représente la limite entre les sujets caucasiens et africains dans notre cohorte.....	120
S.Figure X-3 : Etapes des contrôles qualité et sélection des SNPs étudiés	121

S.Figure X-4 : Graphique Locus zoom des SNPs du gène <i>KCNE1</i>	122
S.Figure X-5 : Longueur de l'intervalle QT corrigé (Bazett) selon les génotypes du SNPs rs11911509 chez l'ensemble des patients (n=154)	123
S.Figure X-6 : Longueur de l'intervalle QT corrigé (Bazett) selon les génotypes du SNPs rs11911509 chez les patients avec une posologie quotidienne de Méthadone supérieure à 200 mg/j (n=152)	124

I. INTRODUCTION

Les troubles addictifs constituent un ensemble phénotypique qui par définition nécessite l'interaction d'un individu avec une substance d'abus présente dans son environnement. L'installation et l'évolution de ces troubles impliquent un ensemble de facteurs de vulnérabilité génétiques et environnementaux. Ces facteurs interviennent dans les premiers contacts avec les substances d'abus, dans l'évolution d'un usage simple vers une addiction, et dans l'apparition de complications liées à l'usage.

A. Les addictions : un phénotype complexe

Il est communément admis que les troubles addictifs constituent un ensemble phénotypique complexe et hétérogène (Wong and Schumann, 2008). En effet, pour une même substance d'abus on peut observer des présentations cliniques très variables en ce qui concerne leur installation, leur sévérité, leur trajectoire d'évolution ou les comorbidités présentes. Plusieurs approches ont été proposées pour réduire cette hétérogénéité phénotypique, et l'une d'elle est l'approche par « symptôme candidat ». Un symptôme candidat est un trait clinique, biochimique, électrophysiologique ou autre, associé à la maladie, supposé avoir une transmission génétique plus simple que la maladie, et permettant ainsi de constituer des groupes de patients plus homogènes (Bellivier et al., 1998). Dans le cas du cannabis par exemple, une telle approche a permis de trouver des résultats plus intéressants en étudiant l'âge de première utilisation (symptôme candidat) que l'usage lui-même (Minică et al., 2018; Stringer et al., 2016). Pour cette raison, j'ai choisi d'utiliser cette approche dans la suite de ce travail.

B. Facteurs de vulnérabilité génétique aux addictions

Les études d'épidémiologies génétiques ont clairement mis en évidence qu'une partie de la variabilité au développement d'un trouble addictif est d'ordre génétique.

Les études familiales sont les premières à avoir suggéré un potentiel caractère héréditaire des troubles addictifs. En effet, ces études retrouvaient un risque plus élevé d'addictions chez les enfants de sujets addicts (Bierut et al., 1998; Kendler et al., 1997; Merikangas et al.,

1998; Midanik, 1983; Nurnberger et al., 2004). Bien que ces études retrouvaient un caractère « familial », elles ne permettaient pas de distinguer la part des facteurs génétiques de la part de l'environnement partagé dans la vulnérabilité aux addictions.

Les études d'adoption ont permis de palier en partie aux limites des études familiales en isolant le rôle de l'environnement partagé. Ces études retrouvaient également un risque plus élevés de conduites addictives chez les enfants adoptés dont les parents biologiques présentaient des troubles addictifs comparés aux enfants adoptés avec parents biologiques sans addictions (Cadoret et al., 1986; Cloninger et al., 1985; Goodwin et al., 1973). Néanmoins certains auteurs ont suggéré que l'adoption en soi pouvait être un facteur confondant en augmentant le risque de troubles addictifs (Miller et al., 2000).

L'estimation de l'héritabilité des troubles addictifs par les études de jumeaux a permis de confirmer l'existence d'une vulnérabilité génétique. L'héritabilité, exprimée en pourcentage généralement, est définie comme la proportion de la variance phénotypique expliquée par les facteurs génétiques (Visscher et al., 2008). Ainsi, dans les troubles addictifs l'héritabilité varie selon les substances entre 40% et 70% et est globalement dans la moyenne des autres troubles psychiatriques (Bienvenu et al., 2011; Freitag, 2007; Goldman et al., 2005) (cf. figure I-1).

Figure pour laquelle les droits d'auteurs n'ont pas été obtenus

Figure I-1 : Estimation de l'héritabilité des troubles psychiatriques et addictifs. Adaptée de Freitag, 2007 (Freitag, 2007) ; Bienvenu & al., 2011 (Bienvenu et al., 2011) et Goldman & al., 2005 (Goldman et al., 2005)

Plusieurs gènes candidats ont été étudiés dans les troubles addictifs permettant d'affiner encore plus les facteurs de vulnérabilité génétiques aux addictions. Les hypothèses sous-tendant l'étude de ces gènes sont issues de données pharmacologiques, neurobiologiques, de modèles animaux ou d'autres approches génétiques telles que les études de liaison ou les études pan-génomiques (GWAS). Les GWAS sans hypothèse *a priori* ont permis par exemple d'apporter des résultats assez robustes et d'identifier de potentiels gènes candidats associés aux troubles addictifs. Dans le tabagisme, ces études retrouvaient une association avec les gènes codants pour les sous-unités des récepteurs cholinergiques (Liu et al., 2010; Thorgeirsson et al., 2008); dans la dépendance à l'alcool avec les gènes codants pour l'alcool déshydrogénase (Frank et al., 2012; Gelernter et al., 2014a; Treutlein et al., 2009); et dans la dépendance à la cocaïne avec le gène *FAM53B* (Gelernter et al., 2014b) dont le rôle est peu connu.

Bien que plusieurs gènes candidats ont été associés aux troubles addictifs, ces phénotypes obéissent plutôt à un modèle de maladies polygéniques, où plusieurs variants à faible taille d'effets seraient impliqués dans la vulnérabilité (Agrawal et al., 2012). Ainsi, de nouvelles approches intégrant le score polygénique viennent confirmer ce modèle et retrouvent des résultats intéressants (Salvatore et al., 2014; Savage et al., 2018). Ces approches ont permis par ailleurs de mieux appréhender la vulnérabilité génétique qui partage les addictions

entre elles (Vink et al., 2014) ou avec d'autres troubles psychiatriques (Carey et al., 2016; Gurriarán et al., 2018).

C. Facteurs de risque environnementaux des addictions

Bien plus que dans les autres troubles psychiatriques, l'environnement joue un rôle décisif dans les troubles addictifs. L'un des facteurs environnementaux les plus régulièrement rapporté dans les études sont les évènements de vie négatifs. Ces derniers regroupent un ensemble d'expériences adverses diverses dans leur nature telle que les violences physiques et sexuelles, les difficultés de couple, le stress professionnel, les traumatismes ou encore les vécus liés à la guerre (pour revue [Caprioli et al., 2007](#)). Ces derniers sont non seulement associés à l'installation des addiction, mais également aux rechutes et la survenue de complications (Scherbaum and Specka, 2008). Les traumatismes précoces dans l'enfance (Teixeira et al., 2017) et l'influence des pairs (Borsari and Carey, 2006; Kobus, 2003) sont aussi des facteurs très régulièrement retrouvé dans les études.

D'autres facteur environnementaux ont été évoqués, et la revue des facteurs environnementaux associés aux addictions soulève un problème d'exhaustivité et de leur modélisation (Caprioli et al., 2007). En effet, classiquement la vulnérabilité aux addictions est modélisée comme une interaction de trois types de facteurs : individuels, liés au produits, et environnementaux (Karila and Reynaud, 2008). Dans cette modélisation, l'environnement est souvent défini sous un angle sociologique (Westermeyer, 1999) ; néanmoins, cette modélisation pose problème, car elle fait l'impasse sur les facteurs environnementaux précoces, tel que les facteurs intra utérins, pourtant associés au risque d'addiction (Scheinost et al., 2017). Ainsi dans les études génétiques, les facteurs environnementaux sont définis au sens large comme étant l'ensemble des facteurs non génétiques (Ramus, 2013), définition dérivée de celle du concept d'héritabilité (Visscher et al., 2008). Dans la suite de ce travail, c'est cette définition large de l'environnement que nous utiliserons.

D. Intérêt des modélisations gènes x environnement

Un des problèmes soulevés par les analyses d'association génétiques est que la part de variance phénotypique expliquée par les variants communs identifiés dans les GWAS (également appelée héritabilité liée aux SNPs) est largement inférieure à l'héritabilité

estimée dans les études de jumeaux. Par exemple, dans la dépendance alcoolique l'héritabilité estimée par les SNPs est de 23 % alors que dans les études de jumeaux elle est plutôt autour de 50 % (Hart and Kranzler, 2015). L'héritabilité estimée par les SNPs correspond à l'addition des effets propres des SNPs associés avec le trouble ; de ce fait l'écart retrouvé entre les deux estimations de l'héritabilité, ou héritabilité manquante, pourrait être expliquée par les effets d'interactions gène x gène ou gène x environnement qui ne sont pas estimés dans les GWAS.

Au-delà de la recherche de l'héritabilité manquante, l'étude de l'interaction gène x environnement a permis de mieux appréhender l'effet des facteurs génétiques en fonction de l'environnement avec des résultats intéressants (Milaniak et al., 2015). Dans l'initiation du tabagisme par exemple le poids des facteurs génétiques est moindre lorsque le prix du tabac augmente (Boardman, 2009). Un autre exemple est celui de la survenue de symptômes psychotiques induits par le cannabis qui seraient variables selon un génotype de la COMT (Caspi et al., 2005).

Un autre intérêt de l'étude de cette interaction, est qu'elle permet non seulement de mettre en évidence des facteurs de vulnérabilité, mais également des facteurs de protections qu'ils soient génétiques ou environnementaux (pour revue [Milaniak et al., 2015](#))

Plusieurs types d'études d'interaction gène x environnement existent selon que l'on évalue l'interaction de l'environnement avec l'ensemble des facteurs génétiques (études de jumeaux), avec un gène candidat, ou avec un variant spécifique (Vink, 2016). Dans ce travail nous sommes intéressés à plusieurs méthodes d'analyses d'association de gènes candidats avec l'environnement dans des contextes cliniques spécifiques. J'ai ainsi successivement réalisé :

- une étude d'association entre les SNPs exoniques du gène *TLR4* et le tabagisme dans une cohorte de patients bipolaires,
- une étude sur des données de séquençage de patients cocaïnomanes et de témoins,
- le développement d'un logiciel de sélection et d'annotation de SNPs candidats à partir d'une puce à ADN de la société Illumina,

- une étude d'association entre les SNPs de gènes candidats pour identifier des facteurs de risque d'allongement de l'espace QT lors du traitement par méthadone, ***en interaction avec la dose reçue,***
- une étude d'association de SNPs de gènes de la voie dopaminergique avec l'intensité des symptômes psychotiques induits par la cocaïne, ***en interaction avec une mesure de la dose de cocaïne consommée***

Je discuterai ensuite ces résultats et leurs méthodologies respectives pour proposer des études ultérieures d'interaction gène x environnement dans les phénotypes d'addictions complexes.

II. RECEPTEUR TLR4 ET TABAGISME DES PATIENTS BIPOLAIRES

L'usage de tabac est un problème majeur de santé publique dans le monde entier. La prévalence mondiale du tabagisme a été estimée en 2010 à 22,1 % de la population adulte. En dépit d'une politique mondiale de réduction du tabagisme, l'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'en 2025 cette prévalence restera autour de 18,9 % (World Health Organization, 2015). En 2004, 12 % des décès chez les plus de 30 ans, soit 5 millions d'individus dans le monde, sont directement attribués à l'usage de tabac (Mathers and World Health Organization, 2012). Ce pourcentage est proche de celui retrouvé en France dans les dernières enquêtes épidémiologiques datant de 2013, où 13,2 % des décès chez les adultes de plus de 35 ans sont attribués au tabagisme (Bonaldi et al., 2016).

Selon l'OFDT et le Baromètre santé 2014, en France, 13,3 million d'individus sont des fumeurs quotidiens et très probablement dépendants, soit 29 % des sujets adultes (Beck et al., 2015). En effet, la nicotine est connue pour avoir un fort pouvoir addictogène et on estime que plus des deux tiers des usagers deviennent dépendants au cours de leur vie (Lopez-Quintero et al., 2011). L'installation de cette dépendance et sa maintenance sont sous l'influence de plusieurs facteurs de risque biologiques, psychologiques et sociaux. De plus, il existe dans ce trouble une forte composante héréditaire impliquant l'addition de nombreux facteurs de risque génétiques de faibles taille d'effets (Belsky et al., 2013; Ducci and Goldman, 2012). Ainsi selon les études, l'héritabilité de la transition d'un usage simple vers une dépendance nicotinique est estimée entre 56 et 70 % (Li et al., 2003; Sullivan and Kendler, 1999)

A. Tabagisme et trouble bipolaire de l'humeur

Le trouble bipolaire est une pathologie invalidante associée à une mortalité élevée (Hayes et al., 2015) et à une prévalence accrue des comorbidités médicales par rapport à la population générale (Hendrie et al., 2013; Lala and Sajatovic, 2012).

Plusieurs données épidémiologiques retrouvent un risque élevé de dépendance à la nicotine chez les patients atteints de trouble bipolaire (Carney and Jones, 2006; Grant et al., 2005; Wilens et al., 2008). En Effet, on estime que la prévalence du tabagisme dans cette

population est 2 à 3 fois supérieure que celle observée dans la population générale, et peut atteindre 70 % des sujets bipolaires (Heffner et al., 2011; Lasser et al., 2000a; McEachin et al., 2010). Néanmoins, le sens de la relation entre le tabagisme et le trouble bipolaire demeure incertain, et certaines données suggèrent une vulnérabilité génétique partagée (Heffner et al., 2011; McEachin et al., 2010).

B. Hypothèse inflammatoire dans les phénotypes de sévérité du trouble de l'humeur

Le lien entre trouble bipolaire et dysrégulation neuro-inflammatoire a été souvent évoqué (Leboyer et al., 2012). Plusieurs études retrouvent une augmentation des marqueurs périphériques de l'inflammation lors des épisodes de rechutes thymiques (Kim et al., 2007; Y.-K. Kim et al., 2004; Myint et al., 2005; Ortiz-Domínguez et al., 2007) et une baisse de ces marqueurs lors de la rémission de ces épisodes (Breunis et al., 2003; S. J. Kim et al., 2004). De plus, plusieurs molécules thymorégulatrices auraient également un effet anti inflammatoire (Goldstein et al., 2009). Par ailleurs, plusieurs anomalies impliquant des molécules de l'immunité innée ont été retrouvées chez les patients bipolaires (Hamdani et al., 2012). En effet, notre équipe a récemment retrouvé une association entre des polymorphismes (SNP) du gène codant pour le récepteur Toll-Like 4 (TLR4), impliqué dans l'immunité innée, et un début précoce du trouble bipolaire ainsi que dans le développement de certaines maladies auto-immunes (Oliveira et al., 2014).

Le TLR4 est un récepteur de reconnaissance de forme appartenant à une famille de 13 membres qui peuvent être à expression extra ou intracellulaire (TLR1 à TLR13). Les récepteurs de la famille TLR interviennent dans la première ligne de défense immunitaire en détectant un large éventail de motifs moléculaires associés à des pathogènes (bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires) ou de motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires causés par l'inflammation (les DAMPs pour *Damage-associated molecular pattern*). Ces récepteurs sont exprimés en périphérie par plusieurs cellules immunitaires et non immunitaires (Akira et al., 2006), et dans le système nerveux central par les cellules microgliales, astrocytaires et les oligodendrocytes (Okun et al., 2009).

Le récepteur TLR4 est également impliqué dans l'immunité adaptative (Akira et al., 2006), et plusieurs SNPs du gène codant pour ce récepteur ont été associées à des pathologies liées

au vieillissement (Balistreri et al., 2009) ou à des pathologies neuro dégénératives (Glass et al., 2010).

C. Hypothèse inflammatoire dans les addictions des patients bipolaires

Il est actuellement bien établi que des processus neuro-inflammatoires interviennent dans le développement des troubles addictifs (Crews et al., 2011). En effet, le système immunitaire inné du cerveau a été impliquée dans plusieurs phénotypes associés aux addictions tel que : la survenue du syndrome de sevrage, le développement d'une tolérance, les phénomènes de récompense et l'installation de la dépendance (Bland et al., 2009; Johnston et al., 2004; Ledebor et al., 2007). L'implication de l'immunité innée centrale dans la survenue de ces phénotypes passerait par le recrutement de cellules gliales via l'activation du récepteur TLR4 (Coller and Hutchinson, 2012). Elle a été étudiée avec plusieurs substances d'abus dont les opioïdes, les amphétamines, la cocaïne ou l'alcool (Coller and Hutchinson, 2012), mais jamais avec le tabac alors que la nicotine est connue pour augmenter l'expression cellulaire du récepteur TLR4 (Wang et al., 2016), et amplifier la cascade inflammatoire déclenchée via l'activation des récepteurs TLR4 par les lipopolysaccharides (Hu et al., 2012; Xu et al., 2014).

D. Etude de la cohorte bipolaire « CEB »

Les facteurs de vulnérabilité génétique au tabagisme sont nombreux et pourraient s'exprimer de façons différentes selon les populations cliniques. Dans notre travail sur les interactions entre facteurs génétiques et non génétiques, nous avons justement exploré la piste d'une vulnérabilité au tabagisme spécifique aux patients bipolaires et impliquant le système neuro-inflammatoire. Nous nous sommes ainsi focalisés, dans une étude d'association, sur l'analyse de SNPs du gène *TLR4* fonctionnellement pertinents et du phénotype tabagisme vie entière.

1. Méthode de l'étude

Cinq cent soixante-douze patients, répondant aux critères DSM-IV-TR (American psychiatric association., 2004) de trouble bipolaire type I, type II ou non spécifié, ont été admis et recrutés dans trois services hospitalo-universitaires de psychiatrie en France (Paris Créteil, Bordeaux et Nancy). Tous les patients ont été inclus dans le cadre d'un PHRC national sur les «Facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux aux troubles bipolaires»

(RBM0436 et C0829) démarré en 2004. A leur inclusion dans l'étude, les sujets étaient euthymiques et ont été interrogés sur leurs statuts tabagiques actuel et passé. Ont été également recueillies leurs données socio démographiques (statut marital et profession) et les antécédents d'abus/dépendance à alcool, au cannabis et aux autres substances d'abus. L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang périphérique et génotypé par sonde TaqMan® pour les SNPs d'intérêt.

Six SNPs du gène *TLR4* ont été étudiés : deux dans la région promotrice rs1927914 (+4434) A>G et rs10759932 (+7263) C>T; deux dans le 3^{ème} exon rs4986790 (+6143, Asp299Gly) A>G et rs4986791 (+8851, Thre399Ile) C>T ; et deux dans la région 3'-UTR rs11536889 (+5724) C>G et rs11536891 (+8469) C>T. Ces SNPs ont été choisis car ils sont : soit fonctionnellement pertinents de par leur localisation (région promotrice), soit non synonymes (3^{ème} exon), soit précédemment associés avec d'autres pathologies (région 3'-UTR). De plus tous les SNPs ont une fréquence de leur allèle mineur supérieure à 1% dans les populations européennes de la base 1000 Genomes.

Pour la comparaison des variables démographiques et cliniques nous avons utilisé un test du Khi-2 ou un test de Mann-Whitney selon le type de variables comparées. Nous n'avons retenu pour l'analyse que les SNPs qui ne déviaient pas de l'équilibre de Hardy-Weinberg au seuil de 5 % (test exact). Pour l'analyse d'association génétique, nous avons utilisé un test du Khi-2 avec correction de continuité de Yates. L'effet dose de l'allèle d'intérêt a été testé par un test de tendance de Cochran-Armitage et par une régression logistique en utilisant un codage additif de l'allèle. Nous avons appliqué la correction de Bonferroni en cas de tests de multiples.

Enfin, la variable *statut tabagique* a été codée comme variable ordinale dans l'ordre jamais, passé et actuel pour refléter la sévérité de la dépendance nicotinique (American psychiatric association., 2004; Fagerström et al., 1996; Hughes et al., 2006). Cette variable a été incluse dans un modèle de régression ordinale en prenant comme variable dépendante le nombre d'allèles mineurs des SNPs significatifs.

Nous avons utilisé le logiciel IBM®SPSS™ v21 pour Mac™ (SPSS, Inc., Chicago, IL), Plink v1.07 pour les analyses d'associations génétiques (Purcell et al., 2007), et le package *Genetics*

(Warnes et al., 2013) du logiciel R Statistic version 3.1.1. (R Core Team, 2015) pour tester l'écart de l'équilibre d'Hardy-Weinberg.

2. Résultats

L'ensemble des données était disponible chez 514 sujets.

a) Caractéristiques socio démographiques et cliniques

Dans notre population, la prévalence du tabagisme vie entière est de 63,4% (n=326), dont 229 (44,6%) sont des fumeurs actuels et 97 (18,9%) d'anciens fumeurs. Le nombre moyen de paquets-années, disponible chez 303 fumeurs, est de 16 ($\pm 0,9$). La comparaison entre les fumeurs vie entière et ceux qui n'ont jamais fumé retrouve chez les fumeurs : plus d'hommes (Sex-ratio fumeurs vie entière vs jamais fumé: 0,9 vs 0,4 ; $\chi^2 = 14,4$; $df = 1$; $p < 0,001$), plus de mésusage d'alcool (Fumeurs vie entière vs jamais fumé (N = 503): 28,3% vs 9,7% ; $\chi^2 = 22,8$; $df = 1$; $p < 0,001$), et plus de mésusage de cannabis (Fumeurs vie entière vs jamais fumé (N = 504): 19,8% vs 1,1% ; $\chi^2 = 35$; $df = 1$; $p < 0,001$). Les autres caractéristiques cliniques et démographiques sont présentées dans le tableau 1.

Tableau II-1 : caractéristiques démographiques et cliniques l'ensemble des patients bipolaires inclus

	Fumeurs vie entière n = 326	Jamais fumé n = 188	Ensemble des sujets N=514	p
Sexe (hommes)	47,9 % (156)	30,3 % (57)	41,4 % (213)	< 0,001
Moyenne d'âge années (\pm ESM)	42,1 ($\pm 0,6$)	44,5 (± 1)	43 ($\pm 0,6$)	0,05
Statut marital				
Seul	32,8 % (107)	29,8 % (56)	31,7 % (163)	0,16
Mariés/Concubinage	45,7 % (149)	54,3 % (102)	48,8 % (251)	
Séparés/Divorcés/Veufs	20,3 % (66)	15,4 % (29)	18,5 % (95)	
Non spécifiés	1,2 % (4)	0,5 % (1)	1 % (5)	
Profession				
En activité/Bénévolat	58 % (189)	55,3 % (104)	57 % (293)	0,9
Chômage/retraités	28,2 % (92)	28,7 % (54)	28,4 % (146)	
Etudiants	7,1 % (23)	7,4 % (14)	7,2 % (37)	
Handicapés	5,5 % (18)	6,9 % (13)	6 % (31)	
Non spécifiés	1,2 % (4)	1,6 % (3)	1,4 % (7)	
Mésusage d'alcool *	28,3 % (90/318)	9,7 % (18/185)	21,5 % (108/503)	< 0,001
Mésusage de cannabis **	19,8 % (63/318)	1,1 % (2/186)	12,9 % (65/504)	< 0,001
Mésusage d'autres substances ***	4,4 % (14/316)	2,7 % (5/185)	3,8 % (19/501)	0,3

ESM : erreur standard de la moyenne

* données disponibles chez 503 sujets

** données disponibles chez 504 sujets

*** données disponibles chez 501 sujets

b) Analyses génétiques

Hormis le SNP rs11536891, tous les SNPs du gène *TLR4* étaient à l'équilibre de Hardy-Weinberg chez les non-fumeurs vie entière (jamais fumés) considérés comme groupe témoin (S.Tableau X-1 en annexe). Ainsi, le SNP rs11536891 a été exclu des analyses ultérieures. Les distributions génétiques et alléliques sont exposées dans le tableau 2.

Tableau II-2 : Fréquences des fumeurs vie et des patients n'ayant jamais fumé par génotype et par allèle, ainsi que la probabilité d'association (valeur de p) avec le tabagisme vie entière chez les patients bipolaires.

	Fumeurs vie entière (n=326) Effectif (pourcentage)	Jamais fumé (n=188) Effectif (pourcentage)	p
rs1927914			
AA	167 (65,7%)	87 (34,3%)	0,322
AG/GG	159 (61,2%)	101 (38,8%)	
A	464 (65,4 %)	245 (34,6%)	0,053
rs10759932			
TT	264 (65,8%)	137 (34,2%)	0,043*
CT/CC	62 (54,9%)	51 (45,1%)	
T	586 (65 %)	316 (35%)	0,008*
rs4986790			
AA	290 (63,7%)	165 (36,3%)	0,791
AG/GG	36 (61,0%)	23 (39,0%)	
A	616 (63,6%)	353 (36,4%)	0,798
rs4986791			
CC	289 (63,7%)	165 (36,3%)	0,874
CT/TT	37 (61,7%)	23 (38,3%)	
C	615 (63,5 %)	353 (36,5%)	0,878
rs11536889			
GG	221 (60,7%)	143 (39,3%)	0,059
CG/CC	105 (70%)	45 (30%)	
G	538 (62,1 %)	329 (37,9%)	0,042*

* $p < 0.05$

Après correction pour tests multiples, seul le SNP rs10759932 reste associé au tabagisme vie entière dans notre population de patients bipolaires. En effet, les porteurs de l'allèle T de ce SNP avaient un risque de tabagisme vie entière supérieure à celui observé chez les porteurs de l'allèle C (T vs C ; $X^2 = 7,02$; $df = 1$; $p = 0,008$; $p_{\text{corrigée}} = 0,04$; OR = 1,69 [1,16-2,45]) (Tableau 2 et Figure 1). De plus, le risque de tabagisme vie entière augmentait avec le

nombre d'allèles T portés (test de tendance de Cochran-Armitage : $p_{\text{corrigée}} = 0,04$; modèle additif de régression logistique : $p_{\text{corrigée}} = 0,048$).

L'analyse des distributions génotypiques met en évidence un risque de tabagisme vie entière significativement plus important chez les sujets porteurs du génotype homozygote TT par rapport aux autres génotypes réunis ($X^2 = 4,11$; $df = 1$; $OR = 1.59 [1.04 - 2.42]$; $p = 0,043$) (Tableau 2 et). Cependant, cette association n'est plus significative après correction pour tests multiples ($p_{\text{corrigée}} = 0,213$). La distribution de tous les génotypes est présentée dans le (S.Tableau X-1 en annexe).

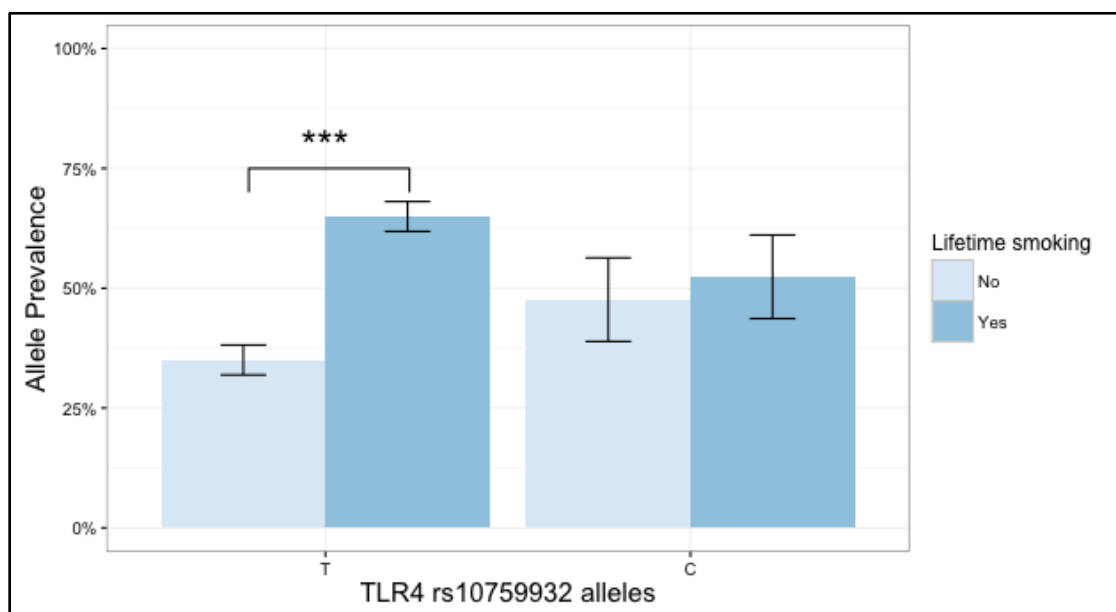


Figure II-1 : Fréquences des allèles du SNP rs10759932 du gène TLR4 chez les fumeurs vie entière et chez les patients n'ayant jamais fumé dans une population de patients bipolaires (***) : $p < 0.001$)

c) Association génétique du SNP rs10759932 ajustée sur les variables cliniques

Afin de contrôler l'effet de possibles facteurs de confusion cliniques, nous avons construit un modèle multivarié d'association pour expliquer l'effet du SNP rs10759932, seul SNP significatif à l'issue de l'analyse précédente, sur le phénotype tabagisme vie entière. Dans ce modèle de régression logistique, nous avons inclus comme facteurs d'ajustement les variables cliniques significativement associées avec le tabagisme vie entière, à savoir : le sexe, le mésusage d'alcool et le mésusage de cannabis. Chez 501 patients pour qui l'ensemble des variables étudiées était disponible, nous mettons en évidence également une

association significative de l'allèle T du SNP rs10759932 avec le tabagisme vie entière ($\beta = 0,43$; $df = 1$; $OR = 1,54 [1,04 - 2,30]$; $p = 0,03$).

d) Association génétique après stratification sur le statut tabagique

Pour rappel nous avons défini le statut tabagique selon un ordre reflétant la gravité du tabagisme (jamais fumé, tabagisme passé, et tabagisme actuel) ; et nous avons testé l'association entre le SNP rs10759932 et le statut tabagique en prenant en compte cet ordre. Le SNP rs10759932 était également significativement associé au statut tabagique (Wald = 5,13 ; $df = 1$; $p = 0,024$). L'Odds Ratio de l'allèle T versus C pour les fumeurs actuel versus ceux qui n'ont jamais fumé est de 1,50 (IC95% = [1,06-2,12]).

3. Discussion

Dans notre population de patients bipolaires, la prévalence du tabagisme vie entière de 63,4% est en adéquation avec celles retrouvées dans d'autres cohorte de patients bipolaires estimées entre 30 et 70% (Kilbourne et al., 2009; Lasser et al., 2000b; McClave et al., 2010; Vanable et al., 2003). De plus, de précédentes études avaient également retrouvées, à l'instar de nos résultats, une plus grande fréquence de mésusages d'alcool et de cannabis chez les patients bipolaires tabagiques vie entières par rapport à ceux qui n'ont jamais fumé (Weinstock et al., 2016; Heffner et al., 2008). La prévalence de ces mésusages dans notre étude est similaire à celle observée récemment dans une plus large cohorte française de patients bipolaires (Icick et al., 2017).

Notre principal résultat est la mise en évidence d'une association du SNP rs10759932 du gène *TLR4* avec le tabagisme vie entière dans cohorte une de patients bipolaire et ce quel que soit le type d'analyse génétique utilisée (comparaison de distributions alléliques ou génotypiques). De plus, cette association est également retrouvée même après ajustement sur les facteurs cliniques pouvant être source de confusion. Ainsi d'après nos résultats, l'allèle majeur T est associé au risque de tabagisme vie entière, et réciproquement l'allèle mineur C aurait un effet protecteur vis à vis de ce phénotype chez les patients bipolaires.

Nous avons stratifié notre échantillon selon le statut tabagique (jamais, passé ou actuel), en adoptant cet ordre en particulier car la sévérité de la dépendance à la nicotine est plus élevée chez les fumeurs actuels par rapport aux anciens fumeurs (Fagerström et al., 1996).

Le fait que nous retrouvons également une association de l'allèle T du SNP rs10759932 avec la sévérité du statut tabagique suggère que non seulement ce SNP est associé à la présence mais aussi à la sévérité de la dépendance à la nicotine dans notre population de patients bipolaires.

Une précédente étude d'association pan génomique (GWAS) menée par le *Tobacco and Genetics Consortium* sur 74 053 sujets n'a pas retrouvé d'association significative entre les allèles du SNP rs10759932 du gène *TLR4* et le tabagisme vie entière ($p = 0,45$) (Tobacco and Genetics Consortium, 2010). De plus, comparé aux données de cette GWAS, la fréquence de l'allèle protecteur C dans le groupe des fumeurs vie entière de notre cohorte est significativement plus faible que celle retrouvée chez les fumeurs vie entière de la cohorte de ce consortium (respectivement 0,101 vs 0,180, $\chi^2 = 27,1$; $df = 1$; $p = 2 \times 10^{-7}$) ; ainsi, ces deux résultats combinés pourraient suggérer que cette association entre le SNP rs10759932 et le tabagisme vie entière serait spécifique du trouble bipolaire.

Le rôle du SNP rs10759932 du gène *TLR4* est peu connu. Certaines études suggèrent que l'allèle C mineur est associé à un état pro-inflammatoire (Pennington et al., 2009; Simhan et al., 2008), cependant nous n'avons pas trouvé de données concernant l'association de ce polymorphisme avec une augmentation des marqueurs de l'inflammation. Une étude avait retrouvé chez les porteurs de l'allèle C une diminution de l'expression du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead Box Protein P3), marqueur clé des lymphocytes T régulateurs (cellules Treg). Ces cellules Treg connues pour leur action immunosuppressive de la réponse induite par les lymphocytes T spécifiques de l'antigène, et jouent donc un rôle clé dans la tolérance immunologique (Liu et al., 2011, p. 2). Par ailleurs, les récepteurs TLR4 contrôlent la réponse inflammatoire en activant et en renforçant la fonction immunosuppressive des cellules Treg (Jin et al., 2012) aussi bien en périphérie que dans le cerveau des souris via les cellules astrocytaires (Xie et al., 2015). Donc, cet allèle C pourrait induire indirectement des réponses inflammatoires et immunitaires excessives via une déficience de l'action régulatrice des cellules Treg. Cela pourrait expliquer l'association observée entre l'allèle C et l'effet protecteur vis à vis de plusieurs maladies chez l'Homme impliquant des pathogènes infectieux. En effet, les individus porteur de l'allèle C (TC et / ou CC) sont moins enclins à développer des lésions gastriques précancéreuses ou cancéreuses lors des infections par *Helicobacter pylori* (Castaño-Rodríguez et al., 2014; Fan et al., 2014; Huang et al., 2010). Une

autre étude retrouve un effet protecteur de l'allèle C vis à vis des rejets de transplantation rénale liés aux infections (Hwang et al., 2009).

Au total, les porteurs de l'allèle C du SNP rs10759932 pourraient présenter un état pro-inflammatoire lié à une déficience de la suppression/régulation de la réponse immunitaire. Par ailleurs, dans des modèles murins, l'exposition au tabac est associée au niveau cérébral à une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires (Khanna et al., 2013) impliquant probablement une voie TLR4-dépendante (Doz et al., 2008) particulièrement lors d'une exposition aiguë (Maes et al., 2008). Par conséquent, on peut supposer que dans le cas spécifique des patients atteints de trouble bipolaire, chez qui pré-existe un état inflammatoire chronique probablement liée à de nombreux autres facteurs, la survenue d'une réponse inflammatoire excessive chez les porteurs de l'allèle C induite par le tabac pourrait être mal tolérée. Dans ce cas, il serait intéressant d'étudier, dans de futures études, l'inflammation périphérique chez les patients bipolaires fumeurs et non-fumeurs porteurs des génotypes CC et TT.

Dans notre cohorte, le SNP rs11536891 déviait de l'équilibre d'Hardy-Weinberg, et n'a pas été inclus dans les analyses. La déviation de l'équilibre d'équilibre peut être liée soit à des erreurs de génotypage, soit à la présence de forces génétiques évolutives (sélection, mutation, migration, ou dérive génétique). Chen & al. suggèrent qu'une perte d'hétérozygotie en cas d'écart de l'équilibre d'Hardy-Weinberg oriente vers la présence de forces évolutive, tandis qu'un gain d'hétérozygotie oriente plutôt vers une erreur de génotypage (Chen et al., 2017). Dans notre cohorte chez les témoins (non-fumeurs) nous avons observé une perte d'hétérozygotie, ce qui suggérerait que ce locus dans cette population soit soumis à une ou plusieurs forces génétiques évolutives. Hormis le fait que ce SNP ait été associé dans plusieurs études au cancer colorectal et au cancer de la prostate en population générale (Kutikhin, 2011), aucune donnée à notre connaissance ne permet de préjuger à quelle force évolutive serait soumis ce locus.

Notre étude présente aussi quelques limites. Nous ne disposions pas d'un groupe témoin de patients afin de tester la spécificité de cette association. A défaut, nous nous sommes appuyés sur les résultats d'une GWAS menée sur des populations non bipolaires. Deuxièmement, nous n'avons pas pu tester cette association génétique avec le phénotype

de dépendance nicotinique pour lequel les patients n'ont pas été caractérisés. Néanmoins, nous avons pu évaluer la sévérité du tabagisme vie entière par la capacité des individus à arrêter de fumer. Le nombre de paquets-années ou le score au test de Fagerström pour la dépendance à la nicotine (Heatherton et al., 1991) auraient été des variables plus pertinentes mais qui n'étaient pas disponibles chez tous les sujets.

En conclusion, nos résultats ouvrent la voie à de nouvelles hypothèses et interrogent sur l'implication des processus inflammatoires dans l'initiation du tabagisme, voir même dans l'évolution vers la dépendance chez des populations spécifiques avec un état inflammatoire chronique tel que les patients bipolaires. Des études ultérieures seront utiles pour apporter plus d'éclairages sur le lien entre réponses inflammatoires, tabagisme et évolution vers une dépendance à la nicotine dans cette population. Dans le cadre de ma thèse, ce travail montre que l'expression d'une vulnérabilité génétique est influencée par un environnement clinique ou physiopathologique préexistant qui mérite d'être exploré de façon plus approfondie.

E. ARTICLE N°1 :

**TLR4 gene polymorphism associated with lifetime cigarette smoking
in bipolar disorder.**

Zerdazi EH, Oliveira J, Vorspan F, Bennabi M, Jamain S, Etain B, Leboyer M, Tamouza R,
Bellivier F.

J Neuroimmunol. 2017 Apr 15;305:96-101.
doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.01.021



TLR4 gene polymorphism associated with lifetime cigarette smoking in bipolar disorder



El-Hadi Zerdazi^{a,b,*}, José Oliveira^{c,d,1}, Florence Vorspan^{a,e,f}, Meriem Bennabi^{c,d}, Stéphane Jamain^{d,g,h}, Bruno Etain^{b,d,g,h}, Marion Leboyer^{b,d,g,h}, Ryad Tamouza^{c,d,i,2}, Frank Bellivier^{a,d,e,f,2}

^a INSERM UMR-S1144 – VariaPsy, Hôpital Fernand Widal, Paris 75010, France

^b AP-HP, DHU Pe-PSY, Pôle de Psychiatrie et d'Addictologie des Hôpitaux Universitaires, Henri Mondor, Créteil F94000, France

^c INSERM, U1160, Hôpital Saint Louis, Paris F75010, France

^d Fondation FondaMental, Fondation de Coopération Scientifique, Créteil, France

^e Université Paris Diderot, Sorbonne Paris cité, Paris, France

^f APHP, Département de Psychiatrie et de Médecine Addictologique, Hôpital Fernand Widal, Paris 75010, France

^g Inserm U955, Psychiatrie Translationnelle, Créteil, France

^h Université Paris Est Créteil, Faculté de Médecine, Créteil, France

ⁱ Laboratoire Jean Dausset, LabEx Transplantex, Hôpital Saint Louis, Paris F75010, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 October 2016

Received in revised form 30 January 2017

Accepted 31 January 2017

Keywords:

TLR4

Innate immunity

Addiction

Tobacco smoking

Bipolar disorder

rs10759932

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is associated with an increased risk of tobacco dependence, the leading addictive substance worldwide. Toll-like receptor 4, a sensor of pathogens and of products of cellular stress and damage, is a major innate immune molecule and logical candidate gene for tobacco dependence in BD because (i) the involvement of *TLR4* molecules in several substance use disorders has been suggested, (ii) and the association between the *TLR4* gene and BD. We analysed herein the potential association between six *TLR4* polymorphisms and lifetime tobacco smoking in 514 BD patients. Significant association between tobacco smoking and rs10759932 was found (genotype, *Cochrane Armitage trend test*, $p = 0.008$, $p_{corrected} = 0.040$ and alleles, $p = 0.008$; $p_{corrected} = 0.040$), where the C minor allele is associated with a protective effect, even after adjusting for confounding factors (OR = 1.54 [1.04–2.30], $p = 0.03$). Our results suggest that *TLR4* gene polymorphism may act as an intermediate factor for the association between tobacco smoking addiction and BD.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nicotine dependence is a major health problem worldwide (Mathers and World Health Organization, 2012). Its installation and maintenance are under the influence of several biological, psychological and social risk factors. Nicotine dependence has a strong heritable component dependent of many additive genetic risk factors with small effect sizes (Ducci and Goldman, 2012) (Belsky et al., 2013; Lubke et al., 2012). Thirty to seventy percent of patients diagnosed with bipolar disorder (BD) smoke (Lasser et al., 2000; Heffner et al., 2011). Although this rate is two to three times higher than the rate observed in the general population, the relationship between smoking and BD remains unclear, and bipolar patients may share specific smoking-associated genetic risk factors (Heffner et al., 2011).

BD is a disabling illness with a high mortality (Hayes et al., 2015) and increased prevalence of medical comorbidities (Lala and Sajatovic, 2012; Hendrie et al., 2013) when compared to the general population. Furthermore, BD is associated with a dysregulated neuro-inflammatory background (Leboyer et al., 2012), which may also involve innate immunity. We recently analysed the genetic diversity of Toll-like receptor 4 (*TLR4*), a major innate immune molecule, and showed associations between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the gene and an earlier onset of BD as well as the development of autoimmune conditions (Oliveira et al., 2014).

Neuro-inflammatory processes are now well admitted to be involved in the pathogenesis of addictions (Crews et al., 2011). Several studies have shown the implication of the brain innate immune system in withdrawal syndrome (Johnston et al., 2004; Ledebor et al., 2007), tolerance, reward and installation of dependence (Bland et al., 2009), which involves the *TLR4* pathway through glial recruitment processes (Coller and Hutchinson, 2012). Studies were focused on several substances of abuse including opioids, amphetamine, cocaine or alcohol, but not yet on tobacco (Coller and Hutchinson, 2012), while nicotine

* Corresponding author at: Service d'addictologie, Pavillon Fouquet, Hôpital Emile Roux, BP 60 010, 1, avenue de Verdun, 94 451 Limeil-Brévannes Cedex, France.

E-mail address: el-hadi.zerdazi@inserm.fr (E.-H. Zerdazi).

¹ E.-H. ZERDAZI & J. OLIVEIRA are co first authors.

² R. TAMOUZA & F. BELLIVIER are co last authors.

**Pages 33 à 37 enlevées car
droits d'auteurs non
obtenus**

III. SIGNADDICT : EXPLORATION DE SEQUENCAGE DE GENES DE GENES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL DANS LA DEPENDANCE A LA COCAINE

De point de vue neurobiologique, le point commun entre les différentes substances addictives est leur capacité à activer le circuit cérébral du plaisir. Le rôle essentiel de ce circuit est de renforcer certains comportements bénéfiques en présence de stimulations « plaisantes ». Ce circuit consiste en des projections de neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale vers le noyau accumbens (Olds and Milner, 1954). Ainsi, les substances addictives, entraînent une décharge dopaminergique de ce circuit en court-circuitant les voies habituelles de stimulations sensorielles (Chiara and Imperato, 1988). Cela est d'autant plus vrai pour la cocaïne dont le mécanisme d'action est le blocage du transporteur DAT (Dopamine Active Transporter) (Harris and Baldessarini, 1973), principal mécanisme de recapture pré-synaptique de la dopamine, avec comme conséquence une hyperdopaminergie synaptique lors des administrations aiguës (Pettit and Justice, 1989).

A. Addictions à la cocaïne : Importance des voies de transduction dans un modèle animal

Le point de convergence de ce circuit est le noyau accumbens, qui constitue la partie ventrale du striatum. Ce dernier joue un rôle important en tant que structure intégrant les stimuli plaisants avec le contexte environnemental de leur survenue (Haber, 2016). Au niveau des neurones épineux moyens, principale population cellulaire du noyau accumbens (Yelnik et al., 1987), les afférences dopaminergiques striatales sont ainsi activées en présence stimuli renforçants (Schultz and Romo, 1987), tandis que l'information environnementale contextuelle quant à elle est transmise par les afférences glutamatergiques (Britt et al., 2012). Ainsi, l'hypothèse purement « dopaminergique » des troubles addictifs laisserait place à une hypothèse d'un dérèglement dual de ces deux transmissions : dopaminergique et glutamatergique, hypothèse que plusieurs études tendent à confirmer (Kalivas, 2009; Scofield et al., 2016).

Au niveau des neurones épineux moyens du noyau accumbens, l'intégration de ces deux afférences dopaminergique et glutamatergique lors des administrations répétées de cocaïne fait appel à la voie de signalisation ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2) qui jouerait un rôle central dans les modifications à long terme de la plasticité cellulaire associées aux addictions, notamment dans le cas de la cocaïne (Pascoli et al., 2014). Dans les modèles animaux, le blocage pharmacologique de cette voie empêche l'installation de modifications comportementales liées aux addictions, telles que la préférence de place conditionnée induite par la cocaïne (Valjent et al., 2000), ou le développement d'une sensibilisation comportementale aux stimulants (Valjent et al., 2006b). Cette voie paraît aussi impliquée dans la réactivation et la consolidation des souvenirs mnésiques associés à la cocaïne (Miller and Marshall, 2005; Valjent et al., 2006a).

Dans le noyau accumbens, les neurones épineux moyens se divisent en deux sous populations selon les récepteurs dopaminergiques exprimés D1 ou D2 (Gerfen et al., 1990). L'activation de la voie ERK 1/2 par la cocaïne serait restreinte uniquement aux cellules exprimant le récepteur D1 (Bertran-Gonzalez et al., 2008; Valjent et al., 2000). De plus l'activation de cette voie de signalisation par la cocaïne requiert l'activation conjointe et l'interaction des récepteurs D1 et glutamatergique NMDA (récepteur *N*-methyl-D-aspartate) (Pascoli et al., 2011), alors que l'activation de l'un des deux types de récepteurs seul n'induit pas d'activation de la voie ERK 1/2 (Cahill et al., 2014).

L'interaction entre les récepteurs D1 et NMDA est à la fois directe et indirecte. L'interaction directe implique la formation d'un complexe physique du récepteur D1 et de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA (Cahill et al., 2014). L'interaction indirecte implique quant à elle la protéine FYN, une tyrosine-kinase : le récepteur D1 active FYN qui a son tour facilite un influx calcique via la sous unité GluN2B de récepteur NMDA. Cette influx déclenche par la suite la voie ERK1/2 (Pascoli et al., 2011).

L'une des finalités de la voie ERK1/2, est l'activation du facteur de transcription ELK1. Dans des modèles de souris, le blocage spécifique de ce facteur de transcription lors d'expositions répétées à la cocaïne altère l'installation d'une préférence de place conditionnée et retarde la sensibilisation locomotrice (Besnard et al., 2011). Ainsi il est possible que ELK1 soit impliqué dans les effets renforçateurs de la cocaïne (Pascoli et al., 2014).

B. Comparaison de la cohorte « COCAINE » à une série de sujets contrôles

Au vu de ces données, l'équipe des Drs Cabboche et Vanhoot de l'unité INSERM/UMR-S1130 avait émis l'hypothèse qu'un blocage ou une altération de cette voie de signalisation ERK1/2 pourrait prévenir l'installation d'une dépendance à la cocaïne lors d'expositions répétées et ouvrir ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques, dans un domaine où les options pharmacologiques efficaces font défaut (Pascoli et al., 2014).

Dans une optique transrationnelle des modèles animaux vers l'Homme, notre équipe s'est associée avec cette unité (Pascoli et al., 2014). L'objectif étant d'étudier cette hypothèse dans une population de patients dépendants à la cocaïne et de sujets contrôles, à travers une étude d'association génétique. Nous avons ainsi recherché, dans les gènes codants pour les protéines clés de cette voie une surreprésentation de mutations fonctionnelles dans l'un des deux groupes de sujets (dépendants et témoins).

1. Méthode de l'étude

Cent cinquante patients dépendants à la cocaïne et cent sujets témoins ont été inclus dans l'études. Les critères retenus pour la définition de la dépendance à la cocaïne sont ceux du DSM IV-TR (American psychiatric association., 2004). Les sujets dépendants étaient issues de deux cohortes d'étude : la cohorte *Methadose* (50 patients) et la Cohorte *Psychocoke* (100 patients). La première cohorte avait recruté des patients sous substitution par Méthadone à l'équilibre, et la deuxième cohorte avait recruté des patients usagers vie entière de cocaïne. Les détails de chacune des cohortes sont décrits dans les parties « Méthodes » des chapitres V et VI (respectivement) de cette thèse.

Les protéines clés de la voie de signalisation ERK1/2 sont au nombre de six: Le récepteur dopaminergique D1, les deux sous unités GluN1 et GluN2B du récepteur glutamatergique NMDA, la kinase ERK2 aussi connue sous le nom de MAPK1 (Mitogen-activated protein kinase 1), la kinase FYN, et le facteur de transcription ELK1. Les régions exoniques des gènes codants pour ces protéines (respectivement : *DRD1*, *GRIN1*, *GRIN2B*, *MAPK1*, *FYN* et *ELK1*) ont été séquencées à haut débit avec la technologie Ion Torrent. Ce séquençage a été externalisé et réalisé par une plateforme d'analyse génétique extérieure à notre équipe.

Les contrôles qualité ont été réalisés par un pipeline validé sur le serveur d'analyse NGS (Next Generation Sequencing) Galaxy.

2. Résultats

Sur les 150 patients dépendants à la cocaïne et les 100 sujets témoins, respectivement 128 patients et 94 sujets ont pu être séquencés. Malheureusement, la découverte de la mauvaise qualité du séquençage ne nous a pas permis d'exploiter ces données et de réaliser l'étude d'association cas-témoins initialement prévue. En effet, nous avons retrouvé une discordance entre les séquences et leurs annotations ; les mutations décrites ne correspondaient aux séquences retrouvées.

3. Discussion

Même si ce projet n'a pas pu être mené à terme, le travail de contrôle de qualité que j'ai eu à faire sur ces données NGS m'a permis d'acquérir plusieurs compétences dans ce domaine prometteur. Ainsi, j'ai suivi plusieurs formations en rapport avec les analyses NGS et j'ai été amené à côtoyer des bio-informaticiens et des généticiens experts de ces analyses.

IV. MISE AU POINT DU LOGICIEL SNPretrieve

A. Mise à disposition de la cohorte « *Methadose & Psychocoke* » génotypée sur puce Illumina « *PsychArray* »

Notre équipe a recruté depuis 2008 deux cohortes de patients : La cohorte *Methadose* (cf. partie méthode du chapitre V) et la cohorte *Psychocoke* (cf. partie méthode du chapitre VI). Nous avons recueilli pour l'ensemble des patients inclus dans les deux études un ensemble de phénotypes en rapport avec les hypothèses posées pour chacune des études. De plus, nous avons également procédé à des prélèvements sanguins périphériques sur tubes EDTA dans l'optique de procéder à des analyses génétiques après extraction de l'ADN. Ainsi plus de 400 patients, issus de la fusion des deux cohortes ont été génotypés en deux phases sur la puce *BeadChip Illumina Infinium PsychArray 24 v1.1* contenant 571 054 SNPs (Polymorphismes nucléotidiques) en utilisant la version *GRCh37* du génome humain.

B. Présentation de la puce Illumina « *PsychArray* »

Cette puce a été spécialement développée par la société Illumina® en collaboration avec le Consortium *Psychiatric Genomics* ("What is the PGC?," n.d.) pour l'étude des variants génétiques associés avec des pathologies psychiatriques communes. Cette puce comprend 265 000 Tag SNP (SNPs marqueurs en déséquilibre de liaison avec plusieurs autres SNPs proches dont ils captent l'information génétique), 245 000 SNPs des régions exoniques des gènes, et 50 000 SNPs candidats précédemment associés avec des troubles psychiatriques divers. D'autres SNPs peuvent être ajoutés sur demande ("*Infinium PsychArray-24 Kit | Psychiatric predisposition microarray*," n.d.).

1. Problématique

Habituellement, l'extraction d'une liste de SNPs couverts par un ou plusieurs gènes d'intérêt et présent sur notre puce nécessite plusieurs étapes et peut se faire selon deux méthodes.

La première méthode consiste dans un premier temps à récupérer auprès d'une base de données en ligne (*Ensembl* ou *UCSC*) les coordonnées génomiques canoniques des gènes d'intérêt selon la version de génome utilisée (dans notre cas la *GRCh 37*). Ensuite, l'étude

d'association est réalisée en limitant l'analyse à ces régions génomiques. Dans le cas où l'analyse porte sur plusieurs gènes, cette méthode a deux inconvénients majeurs : (1) on dispose de peu de visibilité sur la couverture des gènes, c'est à dire le nombre de SNPs par gène, (2) et l'annotation des SNPs (ajout d'informations contextuelles pour un SNP) se fait *a posteriori*, ce qui fait que cette annotation est souvent influencée par les résultats de l'analyse.

La deuxième méthode, consiste quant à elle à extraire directement des bases de données en lignes (*Ensembl* ou *UCSC*) les SNPs couverts par les gènes d'intérêt, puis à limiter l'analyse d'association à ces SNPs. Dans ce cas l'annotation se fait *a priori* mais un inconvénient notable est que la puce PsychArray comprend des SNPs non répertoriés dans les bases de données en ligne, et qui échappent ainsi à l'analyse s'ils ne sont pas spécifiquement extraits.

Ces deux méthodes sont rendues encore plus fastidieuses par le fait que la société Illumina® utilise une nomenclature propre des SNPs qui n'est pas forcément celle de la base dbSNP du NCBI, qui est la nomenclature communément utilisée (**rsxxxx**). Par exemple le SNP « *rs121909122* » est noté « *chr18_52921925* » sur la puce PsychArray. Pour répondre à ces difficultés, j'ai développé un logiciel permettant d'automatiser la recherche et l'annotation des SNPs de cette puce.

2. Intérêt du script SNPRetrieve

Le script SNPRetrieve pour le logiciel d'analyse statistique R (R Core Team, 2015) permet de palier aux difficultés précédemment citées, et d'extraire les SNPs présents sur la puce rapidement sans passer par les bases de données génomiques en ligne. Cette extraction est réalisée en indiquant directement dans le script le ou les noms du ou des gènes d'intérêt. La nomenclature d'entrée des noms des gènes est celle du HUGO Gene Nomenclature Committee ("HGNC database of human gene names | HUGO Gene Nomenclature Committee," n.d.), choisie car c'est la plus utilisée et la plus intuitive (exemple : le récepteur dopaminergique D1 est noté *DRD1*)

Ce script permet d'avoir en sortie (figure IV-1) :

1. Une liste de SNPs couverts par les gènes d'intérêt et présents sur la puce, y compris les SNPs non répertoriés dans les bases de données en lignes, et ceci avec la

nomenclature Illumina. Cette sortie peut être ainsi directement utilisée dans les logiciels d'analyses d'association sans adaptation (figure IV-1, partie *rs.name*)

2. L'annotation des SNPs avec comme informations : le gène, le nom selon la nomenclature dbSNP (si existant), les allèles, s'il est situé dans un exon ou non, les conséquences fonctionnelles, le transcrit auquel il appartient, et la position génomique sur le chromosome (figure IV-1, partie *Annotation*).
3. L'annotation du ou des gènes d'intérêt: le chromosome, les coordonnées génomiques, et le brin d'ADN sur lequel il est présent (sens ou antisens) (figure IV-1, partie *Genes.Origin*)
4. Le nombre de SNPs par gène et le ratio de couverture. Ce ratio correspond au nombre de SNPs divisés par la longueur du gène (en paires de bases), le tout multiplié par 1000 ($\frac{\text{Nombre de SNPs}}{\text{Longueur du gène}} \times 1000$). Ce ratio permet une comparaison de la couverture des gènes en la pondérant par leurs longueurs respectives. (figure IV-1, partie *Coverage*)
5. Enfin une sortie permettant de réaliser directement des associations Gene Based dans les logiciels d'analyses d'association (figure IV-1, partie *Gene.set*)

Dans certains cas l'étude des régions en amont ou en aval des gènes (régions étendues) peut revêtir un intérêt ; une option de ce script permet de rajouter les SNPs se trouvant dans ces régions étendues en précisant la longueur ces régions (en paire de base).

3. Fonctionnement du script

Le principe de fonctionnement du script est assez simple et repose sur deux étapes simultanées : (1) D'abord, par croisement de quatre bases de données embarquées dans le script : les coordonnées génomiques de l'ensemble des gènes du génomes humain (version GRCh 37), la base d'annotations des SNPs fournie par la société Illumina®, la correspondance des nom des SNPs entre la nomenclature Illumina® et dbSNP, et enfin les coordonnées génomiques des SNPs présents sur notre puce ; (2) ensuite, par filtrage des SNPs en fonction des noms des gènes d'intérêt.

4. Discussion

L'écriture de ce script était une étape préalable importante pour l'exploitation rapide de notre base de données génétique. J'ai pu utiliser ce logiciel pour les analyses ultérieures présentées dans cette thèse. Pour son développement j'ai dû me familiariser avec les différentes bases de données et avec les subtilités des différentes nomenclatures utilisées en génétiques. De plus, j'ai dû apprendre à utiliser d'autres packages du logiciel R, auxquels ce script fait appel.

Nous utilisons ce script dans notre unité depuis plus de deux ans, et nous constatons qu'il est fiable et rapide. Ce script sera proposé pour une diffusion plus large sur le dépôt de packages R, ceci afin de le rendre disponible pour l'ensemble de la communauté des utilisateurs de ce logiciel dans le monde (cf. script en annexe).

```

$Genes.Origin
GRanges object with 1 range and 1 metadata column:
  seqnames      ranges strand |      Genes
    <Rle>        <IRanges> <Rle> | <character>
 [1]           5 [174867042, 174871211] - |      DRD1
-----
seqinfo: 25 sequences from an unspecified genome; no seqlengths

$Genes.Extend
GRanges object with 1 range and 1 metadata column:
  seqnames      ranges strand |      Genes
    <Rle>        <IRanges> <Rle> | <character>
 [1]           5 [174867042, 174871211] - |      DRD1
-----
seqinfo: 25 sequences from an unspecified genome; no seqlengths

$SNP
GRanges object with 5 ranges and 2 metadata columns:
  seqnames      ranges strand |      SNP      Genes
    <Rle>        <IRanges> <Rle> | <character> <character>
 [1]           5 [174868775, 174868776] - |  exm504474  DRD1
 [2]           5 [174869045, 174869046] - |  exm504483  DRD1
 [3]           5 [174869278, 174869279] - |  exm2257120 DRD1
 [4]           5 [174869327, 174869328] - |  exm504494  DRD1
 [5]           5 [174870072, 174870073] - |  exm504514  DRD1
-----
seqinfo: 26 sequences from an unspecified genome; no seqlengths

$list.rs
 [1] "exm504474" "exm504483" "exm2257120" "exm504494" "exm504514"

$Annotation
      Name Genes      RsID Alleles InExon      Mutation Transcript      BP
1 exm2257120 DRD1 rs201944827 [T/C] EXON Synonymous_S275S NM_000794 174869278
2 exm504474  DRD1 rs62636575 [T/C] EXON Missense_Q443R NM_000794 174868775
3 exm504483  DRD1 rs144813919 [A/G] EXON Missense_A353V NM_000794 174869045
4 exm504494  DRD1 rs74414188 [T/G] EXON Missense_S259Y NM_000794 174869327
5 exm504514  DRD1 rs146816422 [T/C] EXON Missense_G11R NM_000794 174870072

$Annotation.unique
      Name Genes      RsID Alleles InExon      Mutation Transcript      BP
1 exm2257120 DRD1 rs201944827 [T/C] EXON Synonymous_S275S NM_000794 174869278
2 exm504474  DRD1 rs62636575 [T/C] EXON Missense_Q443R NM_000794 174868775
3 exm504483  DRD1 rs144813919 [A/G] EXON Missense_A353V NM_000794 174869045
4 exm504494  DRD1 rs74414188 [T/G] EXON Missense_S259Y NM_000794 174869327
5 exm504514  DRD1 rs146816422 [T/C] EXON Missense_G11R NM_000794 174870072

$rs.name
      Name      RsID Gene
1 exm2257120 rs201944827 DRD1
2 exm504474  rs62636575 DRD1
3 exm504483  rs144813919 DRD1
4 exm504494  rs74414188 DRD1
5 exm504514  rs146816422 DRD1

$Gene.set
DRD1 "DRD1 exm504474 exm504483 exm2257120 exm504494 exm504514 END"

$Coverage
      Gene NbsNP      start      end Longueur Ratio.Covrage

```

Figure IV-1 : Exemple d'une sortie du script SNPretrieve avec le gène DRD1

V. RISQUE D'ALLONGEMENT DE L'INTERVALLE QT A L'ECG LORS DU TRAITEMENT PAR METHADONE DES PATIENTS DEPENDANTS DE L'HEROINE

A. La Méthadone : traitement de référence de la dépendance aux opiacés

Suite aux travaux de Dole et Nyswander (Dole & Nyswander, 1965), la méthadone a été la première médication prescrite comme traitement de substitution orale (TSO) au long court de la dépendance aux opiacés. Et aujourd'hui encore, plus de 50 ans plus tard, elle reste le TSO le plus largement prescrit dans le monde (World Health Organization, 2008).

En France elle est le deuxième traitement de la dépendance aux opiacés prescrit après la Buprénorphine chez l'ensemble des patients substitués. Dans les CSAPA, où se concentrent probablement les populations ayant les troubles addictifs les plus sévères, la méthadone reste le traitement le plus prescrit (Brisacier, 2017).

La méthadone est encore considérée comme le traitement le plus efficace dans cette indication (Amato et al., 2005; World Health Organization, 2008) permettant une meilleure adhésion aux soins que d'autres TSO (Mattick, Breen, Kimber, & Davoli, 2014). De plus, les patients sous substitution orale par méthadone : (1) ont une moindre probabilité de rechutes, (2) présentent une mortalité diminuée par overdoses d'héroïne, (3) moins de séroconversions VIH et VHC, (4) une meilleure insertion sociale, (5) et une moindre criminalité par rapport aux patients sans substitution (Alford, Compton, & Samet, 2006; O'Connor & Fiellin, 2000; Metzger et al., 1993; Dole & Joseph, 1978).

B. Pharmacogénétique des effets secondaires de la méthadone et rôle de l'environnement

Bien que son efficacité ne soit plus à démontrer, la méthadone comme tout traitement, présente des effets secondaires dont l'un des plus graves est l'allongement de l'espace QT à l'ECG. L'incidence de cet effet secondaire peut atteindre 37% des cas (Alinejad, Kazemi, Zamani, Hoffman, & Mehrpour, 2015; Chou, Weimer, & Dana, 2014), et expose à la survenue de torsades de pointes (TdP) (Romero et al., 2016; Alinejad et al., 2015; Krantz, Martin,

Stimmel, Mehta, & Haigney, 2009). Chez les patient sous méthadone, la mortalité associée à l'allongement du QT et aux TdP varie de 8% à 11% (Kao et al., 2013; Pearson & Woosley, 2005).

Plusieurs facteurs de risque ont été associés à l'allongement du QT sous méthadone, certains sont d'ordre génétique et d'autres d'ordre environnemental (ou non génétique).

1. Rôle de l'environnement :

Plusieurs facteurs environnementaux ont été associés avec l'allongement du QT sous méthadone, ces derniers incluent : la dose prescrite, et des facteurs d'allongement de l'espace QT non spécifiques au traitement par méthadone, dont les interactions médicamenteuses et la prise d'autres produits illicites.

L'association entre la dose prescrite de méthadone et l'allongement de l'intervalle QT est sujette à controverse. En effet certaine études suggèrent que cet effet secondaire est dose-dépendant (Mayet, Gossop, Lintzeris, Markides, & Strang, 2011; Fanoë, Hvidt, Ege, & Jensen, 2007; Ehret et al., 2006; Krantz, Kutinsky, Robertson, & Mehler, 2003), tandis que d'autres ne retrouvent aucune association (Roy et al., 2012; Peles, Bodner, Kreek, Rados, & Adelson, 2007). Par ailleurs, il ne semble pas exister de dose « seuil » pour la survenue de cet effet indésirable, car il peut produire à des posologies très variables allant de 29 à 1680 mg/jour (Pearson & Woosley, 2005), surtout que la méthadone est connue pour avoir un intervalle thérapeutique large (Chin B. Eap, Buclin, & Baumann, 2002).

La prise concomitante d'autres substances est clairement associée à l'allongement du QT chez les sujets sous traitement par méthadone, que ces substances soient des médicaments prescrits et connus pour allonger également le QT (Ehret et al., 2006; Krantz et al., 2003) ; ou que ce soit des substances d'abus telles que la cocaïne et les amphétamines (Fareed et al., 2013; Mayet et al., 2011). Il est intéressant de noter que la survenue iatrogénique de cet effet secondaire paraît d'autant plus favorisée par des situations médicales connues pour allonger le QT telles que les troubles ioniques ou les comorbidités cardiaques (Ehret et al., 2006; Pearson & Woosley, 2005).

2. Les facteurs génétiques

Il existe des allongements congénitaux de l'espace QT qui sont associés à des TdP et à des décès. Ces maladies familiales sont regroupées sous le nom de "channelopathies" car ce sont des maladies héréditaires liées à des mutations sur des gènes codant pour des canaux ioniques cardiaques impliqués dans la physiologie de la contraction des cardiomyocytes. La plupart des études pharmacogénétiques des effets secondaires de la méthadone concernaient surtout les variants impliqués dans sa pharmacocinétique ; de ce fait, les gènes codants pour certains iso enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP) ont été le plus largement étudiés. En effet, la méthadone est principalement métabolisée par les CYP 3A4 et 2B6, et dans une moindre mesure par 2C19 et 2D6 (Chang Yan, Fang Wenfang B., Lin Shen-Nan, & Moody David E., 2010) ; et certains polymorphismes génétiques de ces cytochromes ont été associés avec des variations la biodisponibilité de la méthadone (pour revue voir (Ahmad, Valentovic, & Rankin, 2018). En ce qui concerne l'allongement du QT à l'ECG, des polymorphismes des gènes codants pour les CYP 2B6 et 2C19 ont été associés à cet effet secondaires, dont la survenue serait médiée par des variations des taux sériques de méthadone (Carlquist et al., 2015; Eap et al., 2007; Wang et al., 2013).

Peu d'études se sont intéressées aux gènes impliqués dans la pharmacodynamie de la méthadone et le risque d'allongement du QT. Un travail menée précédemment par notre équipe avait justement abordé cet aspect pharmacodynamique et mettait en évidence une association d'un SNP du gène *KCNH2* (potassium voltage-gated channel subfamily H member 2) avec l'allongement du QT chez des patients substitués par méthadone (Hajj et al., 2014). Ce gène code pour le canal potassique hERG responsable du courant ionique entrant rapide à l'origine de la repolarisation des cardiomyocytes,

C. Etude de l'allongement de l'espace QT dans la cohorte Méthadose

Ainsi dans le cadre de notre travail sur les interactions gène x environnement, l'étude de l'allongement du QT chez les patients sous traitement de substitution par méthadone nous a intéressé à double titre. Premièrement, la survenue de cet effet secondaire paraît plus être liée à l'intrication de plusieurs facteurs entre eux, qu'à l'effet d'un seul facteur isolé (Ehret et al., 2006; Pearson & Woosley, 2005) ; et plusieurs auteurs suggèrent que l'allongement du QT induit est un phénotype qui implique justement une interaction gène x environnement

(Newton-Cheh et Shah, 2007, Paulussen et Aerssens, 2005, Roden, 2004). Deuxièmement, l'étude des facteurs allongeant le QT sous méthadone revêt un intérêt clinique pratique en raison de l'incidence de cet effet secondaire possiblement léthal.

Notre travail s'inscrit dans la continuité des travaux de notre équipe (Hajj et al., 2014), en incluant plus de sujets (154 sujets versus 82 dans Hajj & al.) pour avoir une meilleure puissance statistique, et en nous intéressant à un plus large éventail de gènes. Nous nous sommes ainsi intéressés aux gènes précédemment associés à l'allongement du QT induit par d'autres traitements (que la méthadone) et impliqués dans la pharmacodynamie de cet effet secondaire. Après une revue de la littérature nous avons pu ainsi identifier trois autres gènes candidats *KCNQ1* (Yang et al., 2002), *NOS1AP* (Aberg et al., 2012) et *SCN5A* (Yang et al., 2002) ; en plus des deux gènes *KCNH2* et *KCNE1* déjà étudiés par notre équipe (Hajj et al., 2014). A noter que ces derniers (*KCNH2* et *KCNE1*) avaient aussi été associés à l'allongement du QT induit d'autres traitements (Yang et al., 2002; Käb et al., 2012).

1. Résumé de la méthodologie de l'étude

Notre étude fait partie d'un projet plus global, le projet « *Methadose* » (DRC-APHP : OST07013, Investigatrice Principale : DR F. VORSPAN), dont l'objectif principal est de décrire les interactions gènes x environnement dans la posologie prescrite à l'équilibre de méthadone. Notre objectif d'étude de ces interactions dans l'allongement du QT n'était qu'un objectif ancillaire.

Deux cent seize sujets âgés de plus de 18 ans suivis en ambulatoire pour une dépendance vie entière aux opiacés selon les critères DSM IV TR, sous traitement de substitution par méthadone, en rémission totale depuis plus de 3 mois, et à l'état d'équilibre ont été recrutés en consultation. Un patient est considéré en rémission s'il ne remplit plus les critères de dépendance aux opiacés. Quant à l'état d'équilibre, il a été défini comme étant en programme de substitution par de la méthadone avec une posologie stable et un suivi régulier pendant au moins trois mois. N'étaient pas inclus les sujets qui dans les 3 derniers mois avaient continué à utiliser la voie intraveineuse ou qui avaient eu des accidents d'overdoses.

Les autres traitements prescrits (hormis la méthadone) ont été également notés ; ainsi nous avons calculé pour chaque patient un « score d'allongement du QT par les autres traitements » en fonction de leur risque d'induire un allongement du QT selon une base de données en ligne validée (CredibleMeds.org). Le mode calcul de ce score est détaillé dans la partie méthode de notre article.

Chacun des patients recrutés a eu un ECG au repos avant sa prise habituelle de méthadone. La lecture des ECGs a été faite en aveugle par deux cardiologues. Les patients : ayant un ECG de mauvaise qualité, une comorbidité pouvant allonger le QT, ou pour lesquels le calcul de l'intervalle QT était impossible, n'ont pas été retenus pour l'analyse. L'intervalle QT corrigé (QTc) a été calculé en utilisant la formule de Bazett.

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons de sang périphérique géotypé sur le BeadChip Illumina Infinium PsychArray 24 v1.1 contenant 571 054 SNPs. Nous avons ainsi utilisé le script SNPRetrieve, que j'ai mis au point, pour récupérer les SNPs couverts par les cinq gènes étudiés (*KCNE1*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *NOS1AP* et *SCN5A*). Nous n'avions finalement retenu que les SNPs qui passaient l'ensemble des filtres de nos contrôles qualité. Nous avons également appliqué à nos sujets un ensemble de filtres de contrôle de qualité sur la base de leur données génétiques afin de retirer les individus avec un géotypage douteux (Anderson et al., 2010).

Pour l'étude de l'association génétique, nous avons opté pour une double approche ; en effet, en plus de l'analyse SNP-based, qui se focalise seulement sur l'association des variants, nous avons aussi adopté une approche Gene-Based sur le ou les gènes contenant au moins un SNP significatif à l'étape précédente.

L'approche Gene-based consiste à compiler l'information statistique de l'ensemble des SNPs d'un gène par des tests de permutation. Au préalable, ne sont sélectionnés que les SNPs significatifs selon un seuil prédéterminés et qui ne sont pas en déséquilibre de liaison entre eux. Cette méthode a l'avantage de produire moins de faux positifs (Neale & Sham, 2004), et d'obtenir des résultats d'association plus robustes.

Afin de palier les problèmes de stratifications ethnique des population qui peuvent induire des faux positifs et des faux négatifs dans les études d'associations, nous avons procédé de deux façons :

1. D'abord par la méthode EIGENSTRAT (Price et al., 2006) en incluant dans tous nos modèles d'association génétique les composantes principales calculées en tant que covariables. Ces composantes principales ont été calculées en utilisant l'ensemble des données de génotypiques ayant passé les étapes de contrôle qualité et disponibles dans la puce PsychArray. Cette méthode permet de déterminer l'appartenance ethnique de nos sujets en les fusionnant avec les populations de la base publique 1000 Genomes. C'est ainsi que nous avons pu déterminer que, parmi nos 154 sujets, 143 (92,9%) convergeaient génétiquement vers les populations européennes caucasiennes tandis que le reste tendait vers les populations africaines.
2. Ensuite par le calcul de l'indice de fixation (F_{ST}) pour l'ensemble de nos variants (Weir & Cockerham, 1984). Cet indice nous renseignait sur l'impact de la divergence de nos groupes ethniques sur les variants analysées.

Les associations génétiques ont été testées avec un modèle de régression linéaire en prenant la longueur QTc comme variable dépendante. Nous avons également utilisé une régression linéaire pour tester l'interaction entre le SNP le plus significatif et la posologie quotidienne de méthadone. Nous avons aussi inclus dans ce modèle d'interaction les variables cliniques associées à la longueur de l'intervalle QTc avec une valeur de p inférieure à 10%.

Pour le calcul de la taille d'effet de l'association génétique, nous avons utilisé la mesure f^2 de Cohen (noté ci dessous *Cohen's f^2*) (Cohen, 1988). Cette mesure permet d'évaluer la taille d'effet d'une seule variable dans un modèle de régression multivarié.

Nous avons appliqué pour l'ensemble de nos analyses une correction pour les tests multiples (Bonferroni).

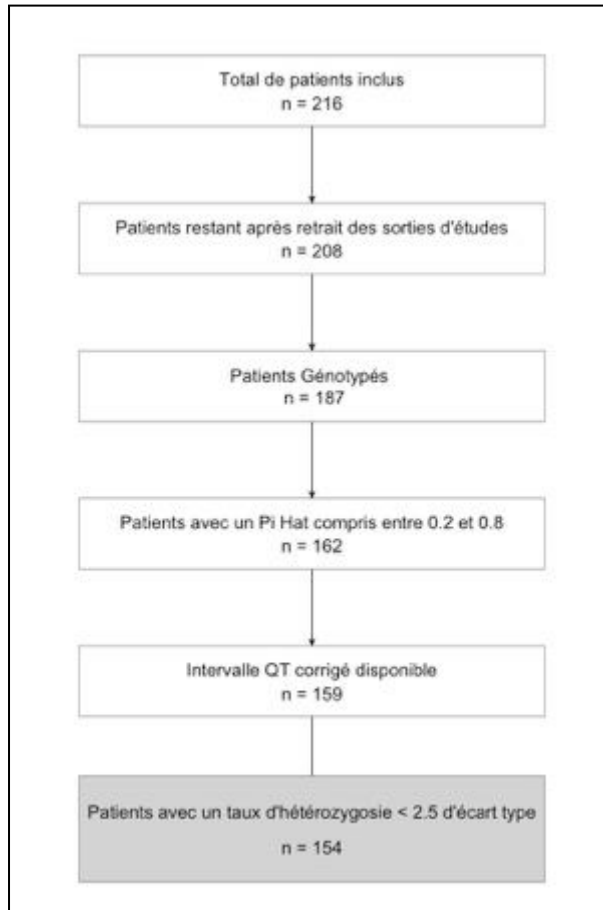


Figure V-1 : Sélection des sujets pour l'analyse

2. Synthèse des résultats

Cent cinquante-quatre sujets ont été retenus pour l'analyse (Figure V-1) dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau V-1. L'intervalle QTc moyen était de $415,2 \pm 2,5$ ms [350 ms - 575 ms], et 38 (24,7%) patients avait un intervalle QTc au moins limite (Tableau I). La posologie quotidienne de méthadone variait de 7 à 320 mg/j (moyenne (+/- ESM): $63,8$ mg/j $\pm 3,3$ mg/j, médiane: 60 mg/jour).

Dans notre cohorte l'intervalle QTc et la posologie quotidienne de méthadone étaient significativement corrélés ($r_{\text{Pearson}} = 0,26$; $p = 10^{-3}$) ; ainsi selon notre modélisation, le QTc s'allongeait 1,8 ms (IC_{95%} [0,7 ms - 3 ms]) pour chaque incrément de 10 mg de posologie quotidienne de méthadone. Cette corrélation restait significative même en retirant les deux individus ayant des posologies de méthadone supérieures à 200 mg/j ($r_{\text{Pearson}} = 0,18$; $p = 0,02$).

Tableau V-1 : Caractéristiques socio démographiques et cliniques des sujets analysés et leur association avec la longueur de l'intervalle QT corrigé.

	Cohorte étudiée N = 154	Association avec l'intervalle QTc <i>p-value</i>
Sexe (hommes)	118 (76.6 %)	0.03
Moyenne d'âge en années (\pm ESM)	40.9 (\pm 0.7)	0.62
Posologie de Méthadone mg/j (\pm ESM)	63.8 (\pm 3.3)	0.02
Autres traitements prescrits %(n)		
Antidépresseurs	33 (21.4 %)	0.45
Antipsychotiques	34 (22.1 %)	0.06
Benzodiazépines	53 (34.4 %)	0.64
Thymorégulateurs	6 (3.9 %)	0.53
Autres traitements allongeant le QTc [#]	15 (9.7 %)	0.87
Score d'allongement du QTc par les autres traitements (\pm ESM)	0.9 (\pm 0.1)	0.29
Usage actuel d'alcool %(n/N*)	90/145 (62.1 %)	0.39
Usage actuel de cocaïne %(n/N*)	12/91 (13.2 %)	0.12
Sérologie VIH positive %(n/N*)	9/94 (9.6 %)	0.32
Sérologie VHC positive %(n/N*)	48/91 (52.7 %)	1

ESM : erreur standard de la moyenne

: traitements allongeant le QTc autres que les antidépresseur, les antipsychotiques et la méthadone

* : Données non disponibles chez l'ensemble des sujets

N : nombre de sujets avec données disponibles

Nous avons analysé 126 SNPs de cinq gènes sélectionnés. Seul le SNP rs11911509 du gène *KCNE1* était significativement associé à l'intervalle QTc après correction pour tests multiples de Bonferroni ($p = 3,84 \times 10^{-4}$, $p_{\text{corrigée}} = 0,049$, taille d'effet *Cohen* $f^2 = 0,131$) (Tableau V-2). Selon notre modèle ajusté l'intervalle QTc augmentait de 13,2 ms ($\pm 3,6$ ms) pour chaque allèle mineur supplémentaire (A vs C) de ce SNP.

Lors de l'analyse génotypique nous avons également trouvé une différence significative de la longueur de l'intervalle QTc selon les génotypes du SNP rs11911509 (ANOVA, $F = 6,46$, $ddl = 2$, $p = 2,1 \times 10^{-3}$). La comparaison par paires des génotypes retrouvait un intervalle QTc significativement plus long chez les porteurs du génotype AA par rapport aux porteurs du génotype CC (AA versus CC: 430,4 ms ($\pm 7,2$ ms) versus 405 ms ($\pm 4,3$ ms), $W = 952$, $p = 0,001$, $p_{\text{corrigée}} = 0,003$) ; quant aux autres comparaisons, elle n'étaient pas significatives (Figure V-2).

Nos résultats sont confortés par l'analyse Gene-based qui retrouve également une association significative du gène *KCNE1* avec la longueur de l'intervalle QTc (nombre de SNP utilisés = 5, $p_{\text{empirique}} = 0,02$).

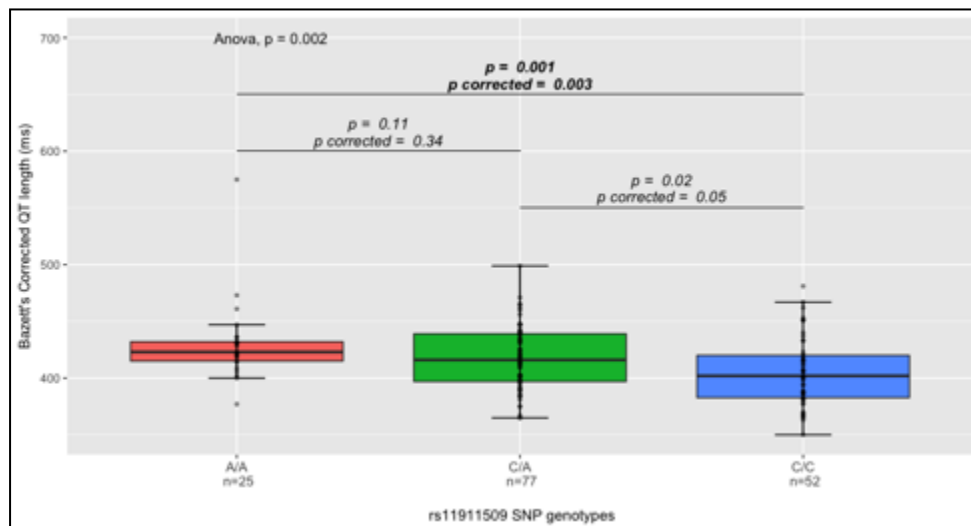


Figure V-1 : Longueur de l'intervalle QTc selon les génotypes du SNP rs11911509 du gène *KCNE1*

Pour tester l'interaction entre le SNP rs 11911509 et la posologie de méthadone pour la prédiction de la longueur du QTc, nous avons construit un modèle en incluant comme covariables le sexe et la coprescription d'antipsychotiques, seules à avoir une probabilité $p < 10\%$. Nous avons ainsi trouvé une interaction significative entre la posologie de méthadone et le nombre d'allèle mineur (A) du SNP rs11911509 ($\beta = 0,18 \pm 0,07$; $p = 0,01$) pour prédire la longueur de l'intervalle QTc. Notre modèle expliquait 15% de la variance de l'intervalle QTc (Figure V-3).

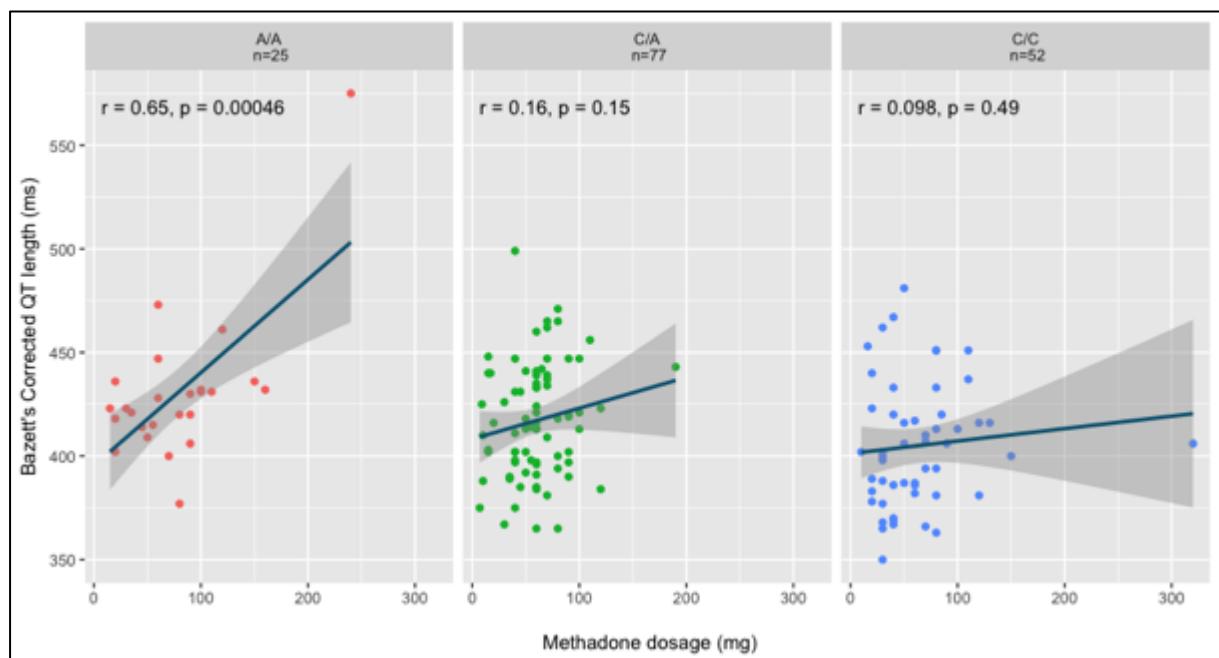


Figure V-3 : Corrélations de l'intervalle QTc avec la posologie quotidienne de Méthadone selon les génotypes du SNP rs11911509

Tableau V-2 : Variants associés avec la longueur de l'intervalle QTc avec une valeur nominale de $p < 5\%$

SNP	Locus	Chr.	Position dans le gène	Position (version Gh37)	Allèle [mineur/majeur]	FAM	n	BETA (ms)	SE (ms)	p	p corrigée
rs11911509	KCNE1	21	Variant intronique	35841740	[A/C]	0.41	154	13.17	3.6	3.83×10^{-4}	0.049
rs727957	KCNE1	21	Variant intronique Variant en aval du gène	35880072	[A/C]	0.17	154	13.67	5	7.13×10^{-3}	0.91
rs3807375	KCNH2	7	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	150667210	[A/G]	0.49	154	10	3.7	7.72×10^{-3}	0.98
rs6599228	SCN5A	3	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	38662961	[G/A]	0.44	153	-10.48	3.9	7.86×10^{-3}	1
rs1337062	NOS1AP	1	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	162063023	[G/A]	0.33	154	10.72	4	8.17×10^{-3}	1
rs4657154	NOS1AP	1	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	162108119	[A/G]	0.28	154	10.4	4.2	1.41×10^{-2}	1
rs234868	KCNQ1	11	Variant intronique Variant en aval du gène Variant d'un transcrit non codant	2859055	[G/A]	0.40	154	9.744	4	1.51×10^{-2}	1
rs10157390	NOS1AP	1	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	162247296	[C/A]	0.43	154	8.572	3.7	2.25×10^{-2}	1
rs2070359	KCNE1	21	Variant intronique Variant en aval du gène	35826776	[A/G]	0.2	154	-10.47	4.7	2.68×10^{-2}	1
rs347300	NOS1AP	1	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	162299823	[G/A]	0.33	154	8.272	3.8	3.19×10^{-2}	1
rs3807370	KCNH2	7	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	150673314	[A/G]	0.37	154	-8.394	3.9	3.23×10^{-2}	1
rs2106467	KCNQ1	11	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	2635797	[A/C]	0.42	154	7.88	3.8	3.81×10^{-2}	1
rs7528328	NOS1AP	1	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	162247779	[G/A]	0.17	154	10.03	5	4.71×10^{-2}	1

FAM : Fréquence de l'allèle mineur

NMD : *Nonsense-mediated decay* pour dégradation des ARNm non-sens

3. Discussion

Notre travail a permis de mettre en évidence deux principaux résultats : (1) l'association du gène *KCNE1* avec la longueur de l'intervalle QTc chez les utilisateurs français de méthadone, à l'aide de deux approches complémentaires (SNP-based (rs11911509) et « Gene-based »), et (2) l'interaction entre le SNP rs11911509 et la dose de méthadone pour expliquer une variance non négligeable (15 %) de la longueur de l'intervalle QTc.

L'association du SNP rs11911509 avec la longueur de l'intervalle QTc est particulièrement intéressante, car si elle venait à être répliquée, elle suggérerait peut être une hypothèse plus élaborée expliquant l'allongement du QT induit par la méthadone. En effet, le mécanisme communément admis de la survenue de cet effet secondaire est le blocage par la méthadone du canal potassique hERG (human Ether-A-go-go-Related Gene, *KCNH2*) responsable du courant de repolarisation cardiaque à activation rapide IKr (Katchman et al., 2002). Quant au gène *KCNE1*, il code pour une protéine de domaine transmembranaire qui se combine avec une autre protéine codée par le gène *KNCQ1* pour former un canal potassium voltage-dépendante également appelé canal potassique minimal (ou « MinK ») avec un temps d'activation plus lent que celui du canal *KCNH2* (hREG)(Takumi, Ohkubo, & Nakanishi, 1988), et certaines mutations du gène *KCNE1* ont été associées avec un syndrome d'allongement congénital du QT (Crotti, Celano, Dagradi, & Schwartz, 2008). Nous proposons donc l'hypothèse que la méthadone pourrait induire à une double perturbation des canaux activation rapide hREG (gène *KCNH2*) et des canaux à activation lente MinK (gène *KCNE1*), et que l'allongement du QT chez certains patients serait lié à un effet additif de ces deux perturbations.

Le SNP rs11911509 est un variant intronique du gène *KCNE1* sans effet connu selon la base de données Ensembl (Zerbino et al., 2018) et aucun phénotype n'a été associé avec ce SNP à notre connaissance, y compris l'intervalle QT. Néanmoins, selon la base de données 1000 Genomes (accessible via Ensembl), ce variant est en fort déséquilibre de liaison ($r^2 \geq 0,8$) avec d'autres SNPs du *KCNE1* que ne nous avons pas pu analyser car ils ne sont pas présents sur la puce PsychArray (rs4817657, rs4816488, rs4817658, rs35983014, rs9984007, rs11701051, rs62211545, rs8128386, rs8131017 et rs11702790). Ces SNPs ont été

précédemment associé à un allongement de l'intervalle QT (Zerbino et al., 2018). Ainsi, les résultats obtenus avec le rs11911509 paraissent en accord avec cette littérature.

L'interaction que nous avons mis en évidence est également intéressante, car elle suggère que la corrélation entre la posologie de méthadone et l'allongement du QTc pourrait être génotype dépendante, ceci pourrait expliquer les résultats contradictoires des études en ce qui concerne cette association (cf. paragraphe supra « Rôle de l'environnement »). Dans notre cohorte, la posologie médiane de méthadone était légèrement supérieure à celle habituellement prescrite en France (60 mg/jour contre 51,3 mg/jour)(Brisacier, 2017), mais inférieure à celle retrouvée dans d'autres études étrangères (Ehret et al., 2006; Fanoie et al., 2007; Krantz et al., 2003) où la posologie médiane est généralement supérieure à 70 mg/jour. Ainsi, l'effet confondant lié à de possible posologies élevées de méthadone paraît limité dans notre population.

Plusieurs limites de notre étude méritent d'être discutées. Premièrement, nous n'avons qu'un seul enregistrement ECG par patient et de ce fait nous n'avons pas pu évaluer l'allongement du QTc prospectivement avant-après instauration du traitement par méthadone, ce qui aurait permis d'authentifier l'induction d'un allongement de QT par la prescription de méthadone ou de sélectionner un sous-groupe de sujets présentant cette effet. Deuxièmement, nous n'avons pas accès à d'autres facteurs de risque associés à l'allongement de la repolarisation cardiaque tels que les kaliémies et de magnésiémies. Troisièmement, deux sujets avaient une posologie quotidienne extrême de méthadone (supérieur à 200 mg). En retirant ces sujets de l'analyse la corrélation entre la longueur QTc et la méthadone restait significative. De plus, nous avons les diagnostics de nos modèles d'association génétique (régression linéaire pour tester l'association entre la longueur de l'intervalle QTc d'un côté, et les SNPs avec et sans interaction avec la posologie de méthadone en variables d'entrée), et aucun de ces deux individus n'avait d'influence significative sur le modèle (distance de *Cook* <1). Dans nos analyses nous avons pris le parti de ne pas les retirer car ils sont le reflet de la grande variabilité interindividuelle de la posologie quotidienne de méthadone à l'équilibre observée en pratique clinique (Chin B. Eap et al., 2002). Quatrièmement, nous avons deux populations ethniques dans notre cohorte, et comme nous l'avons cité dans notre méthodologie, nous avons utilisé la méthode EIGENSTRAT (Price et al., 2006) dans toutes nos analyses génétiques pour contrôler un biais

de stratification ethnique. Cette méthode semble suffisante pour maîtriser l'inflation du risque d'erreur de type I, particulièrement pour les SNPs avec un index de fixation faible ce qui est le cas du SNP rs11911509 ($F_{ST} = 0$) (Derks, Zwinderman, & Gamazon, 2017). En outre, en restreignant l'analyse aux sujets caucasiens la taille d'effet de l'association génétique du SNP rs11911509 avec la longueur QTc ne variait pas beaucoup. Le fait qu'elle ne soit plus significative paraît en lien avec une perte de puissance (taille d'effet de Cohen $f^2 = 0,135$ chez les caucasiens, $n = 142$, versus $0,131$ chez l'ensemble de la cohorte, $n = 154$). Enfin, une autre des limites de l'étude est que nous n'avons pas effectué de calcul de puissance a priori pour l'analyse principale qu'est l'association génétique (SNP-Based) avec la longueur de l'intervalle QTc. Cependant, le calcul *a posteriori* retrouvait une puissance de 80 % sur les 154 sujets retenus pour l'analyse en fixant le risque α à 4×10^{-4} (prise en compte des tests multiples sur les 126 SNPs analysés) et en considérant la taille d'effet Cohen f^2 retrouvé de $0,131$.

A travers ce travail nous avons mis en évidence une interaction gène x environnement entre le gène *KCNE1* et la posologie de méthadone. Cette interaction est intéressante de part le message clinique qu'elle peut avoir : les sujets porteurs du génotypes AA seraient plus à risque d'un allongement de QTc en cas d'augmentation posologique, et pourrait bénéficier de ce fait d'une surveillance ECG plus rapprochée avant et après mise sous traitement de substitution par Méthadone ainsi qu'à chaque augmentation posologique. Ceci en raison des conséquences potentiellement létales de cet effet secondaire.

D. ARTICLE N°2 :

QT length during methadone maintenance treatment: Gene x dose interaction.

Zerdazi EH, Vorspan F, Marees AT, Naccache F, Lepine JP, Laplanche JL, Prince N, Marie-Claire C, Bellivier F, Mouly S, Bloch V.

Fundam Clin Pharmacol. 2018 Aug 7.
doi: 10.1111/fcp.12405

DR. EL-HADI ZERDAZI (Orcid ID : 0000-0002-4965-2080)

DR. FLORENCE VORSPAN (Orcid ID : 0000-0001-5168-3727)

Article type : Original Article

QT length during methadone maintenance treatment: Gene x dose interaction

Running title: Gene Methadone dosage interaction in QT

El-Hadi ZERDAZI ^{a,b,#,*}, Florence VORSPAN ^{a,c,#}, Andries T. MAREES ^f, François NACCACHE ^{a,c}, Jean-Pierre LEPINE ^{a,c}, Jean-Louis LAPLANCHE ^a, Nathalie PRINCE ^a, Cynthia MARIE-CLAIRE ^a, Frank BELLIVIER ^{a,c,e}, Stéphane MOULY ^{a,d}, Vanessa BLOCH ^a

these authors contributed as co-first authors.

^a INSERM U1144 Variabilité de réponse aux psychotropes, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

^b APHP, Service d'addictologie, DHU Pe-PSY, Pôle de Psychiatrie et d'Addictologie des Hôpitaux Universitaires, Henri Mondor, Créteil F94000, France

^c APHP, Département de Psychiatrie et de Médecine Addictologique, Hôpital Fernand Widal, Paris 75010, France

^d APHP, Département de Médecine Interne, Hôpital Lariboisière, Paris 75010, France

^e Fondation FondaMental, fondation de coopération scientifique, Créteil, France

^f Department of Psychiatry, Amsterdam Neuroscience, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi:

10.1111/fcp.12405

This article is protected by copyright. All rights reserved.

***Corresponding author:** El-Hadi ZERDAZI.

Address : Hôpital Emile ROUX, Service d'addictologie (Pav. FOUQUET) - 01, Avenue de Verdun - 94450 - Limeil Brévannes

Telephone number : + 33 1 45 95 83 85/53

Fax number : + 33 1 45 95 83 90

e-mail address : el-hadi.zerdazi@inserm.fr

ABSTRACT

Methadone is known to be a risk factor for sudden death by enlarging ECG QT corrected (QTc) interval. For other medical conditions, QTc lengthening has been described as the result of interactions between pharmacological treatments and genetic factors.

Former heroin dependent subjects under methadone maintenance treatment in remission for at last 3 months were recruited. We studied the association between QTc length (Bazett formula) and 126 SNPs located on 5 genes (*KCNE1*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *NOS1AP* and *SCN5A*) previously associated with drug-induced QT prolongation. Both SNP-based and gene-based approaches were used, and we tested also the interaction of the top SNP with methadone dosage to predict the QTc length.

In our sample of 154 patients, current methadone daily dose was associated with QTc length ($r_{\text{Pearson}} = 0.26$; $p = 10^{-3}$). Only one SNP, rs11911509 on *KCNE1*, remained significantly associated with QT length after correction for multiple testing ($p = 3.84 \times 10^{-4}$; $p_{\text{corrected}} = 0.049$). Using a gene-based approach, *KCNE1* was also significantly associated with QTc length ($p_{\text{empirical}} = 0.02$). We found a significant interaction between methadone dosage and rs11911509 minor allele count (allele A vs C ; $p = 0.01$). Stratified analysis revealed that the correlation between QTc length and methadone dosage was restricted only to AA carriers of this top SNP.

Patients' genetic background should be taken into account in the case of clinically relevant QT enlargement during methadone maintenance treatment.

Key words: Methadone, rs11911509, *KCNE1*, QT prolongation.

ABBREVIATIONS

ECG: Electrocardiograph

F_{ST}: Fixation index

hERG: human Ether-A-Go-Go Related Gene

PCA: Principal components analysis

QTc: corrected QT interval

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TdP: Torsade de Pointe

**Pages 64 à 80 enlevées car
droits d'auteurs non
obtenus**

VI. SYMPTÔMES PSYCHOTIQUES TRANSITOIRES LORS DE L'USAGE DE COCAÏNE

Selon l'observatoire Français des drogues et toxicomanies (OFDT) et le baromètre Santé 2014, l'usage de cocaïne est en hausse ; en effet, la part des usagers vie entière a été multipliée par quatre en deux décennies (de 1,2 % en 1995 à 5,6 % en 2014). La même année, elle restait la deuxième substance illicite la plus consommée après le cannabis ; et on estimait que 450 000 de personnes en France en avait pris au moins une fois dans l'année. L'usage de cocaïne touche des milieux socio-économiques de plus en plus étendus, et peut atteindre une prévalence de 10% d'usagers vie entière dans les tranches d'âge les plus jeunes (Beck, Richard, Guignard, Le Nézet, & Spilka, 2015). On estime que 15-20% des usagers de cocaïne développent un trouble lié à l'usage de ce produit, avec son cortège de complications médicales et psychiatriques (Flórez-Salamanca et al., 2013; Lopez-Quintero et al., 2011; Wagner & Anthony, 2002). De plus, la cocaïne est impliquée dans environ 10 % des décès par overdose depuis 2010 (ANSM, 2014; Deborde & Brisacier, 2016). A l'échelle mondiale et en Europe, les derniers rapports suggèrent que le trafic et l'usage de cocaïne en Europe dans le monde seraient en augmentation (EMCDDA, 2017; United Nations & United Nations Office on Drugs and Crime, 2017).

A. Les symptômes psychotiques sous cocaïne : un effet secondaire grave mais variable

Les symptômes psychotiques induits par la cocaïne (SPIC) constituent une complication aiguë qui peut survenir lors de la consommation de cocaïne. Ils durent habituellement entre 30 min et 3 heures (maximum 24 heures), et disparaissent lors des phases d'abstinence (Brady, Lydiard, Malcolm, & Ballenger, 1991; Satel, Southwick, & Gawin, 1991). Chez les usagers de cocaïne, ils sont l'une des principales raisons de consultations aux urgences générales (Pavarin et al., 2011; Tueth, 1993; Derlet & Albertson, 1989; Dhossche, Ferdinand, Van der Ende, Hofstra, & Verhulst, 2002).

Leur fréquence varie de 29 % à 86.5 % selon les études (Bartlett et al., 1997; Brady et al., 1991; Cubells et al., 2005; Kalayasiri et al., 2006a; Roncero et al., 2012; Satel and Edell, 1991;

Tang et al., 2007; Vergara-Moragues et al., 2014; Vorspan et al., 2012) ; cette disparité des incidences des SPIC est liée à plusieurs facteurs dont : les populations étudiées, le protocole d'étude et surtout les modalités de recueil des SPIC. Dans les études utilisant un recueil standardisé par l'échelle SAPS-CIP, spécialement validée pour l'évaluation des SPIC (Joseph F Cubells et al., 2005), on retrouve des prévalences sensiblement similaires (75 % à 86.5 %) (Vergara-Moragues et al., 2014; Florence Vorspan et al., 2012; Joseph F Cubells et al., 2005) (cf. partie méthode pour présentation de l'échelle SAPS-CIP).

1. Les facteurs de risque cliniques

Plusieurs facteurs de risque cliniques ont été associés à la survenue de SPIC. Parmi ceux-ci la précocité de l'âge de la première consommation est le plus fréquemment rapporté dans les études (Brady et al., 1991; Cubells et al., 2005; Floyd et al., 2006; Kalayasiri et al., 2006a; Lichlyter et al., 2011; Vorspan et al., 2012). La dose consommée de cocaïne est également associée à leur survenue (Brady et al., 1991; Kalayasiri et al., 2006a; Mooney et al., 2006; Sherer et al., 1988) et les SPIC pourraient même être dose-dépendants (Florence Vorspan et al., 2011). L'utilisation de voies rapides quand la cocaïne est injectée ou fumée notamment sous forme de crack est également rapportée par plusieurs études (Kalayasiri et al., 2006a; Ursulet and Charles-Nicolas, 1994; Vorspan et al., 2012). La dose cumulée et la durée cumulée de prise de cocaïne au cours de la vie augmenteraient aussi le risque de survenue de SPIC (Bartlett et al., 1997; Brady et al., 1991; Cubells et al., 2005; C. Roncero et al., 2013), ce qui suggère un effet de sensibilisation lors de la prise prolongées de cocaïne. Ainsi, les sujets avec une dépendance sévère à la cocaïne seraient aussi plus enclins à présenter des SPIC (Kalayasiri et al., 2006a; Vorspan et al., 2012), et l'association concomitante avec d'autres substances psychogènes serait également un facteur supplémentaire, de même que des consommations précoces de cannabis en particulier (Brady et al., 1995; Kalayasiri et al., 2010; Tien & Anthony, 1990). Enfin, d'autres facteurs ont été aussi évoqués notamment les comorbidités addictives, les autres troubles des axes I et II et un indice de masse corporelle bas (pour revue (C. Roncero et al., 2013)) ; quant au sexe, son rôle reste sujet à controverse (Brady et al., 1991; Kalayasiri et al., 2006a; Mahoney et al., 2010; Mooney et al., 2006; Sofuoglu et al., 1999).

2. Les études d'association génétiques

Les gènes codants pour les protéines impliquées dans la neurotransmission dopaminergique sont ceux qui ont été le plus souvent étudiés. En effet, cette voie est aussi bien impliquée dans l'effet renforçant de la cocaïne (Volkow, Fowler, & Wang, 1999), que dans la survenue de symptômes psychotiques, que ceux-ci soient des symptômes psychotiques induits par les substances mais aussi plus généralement dans les symptômes psychotiques des troubles psychotiques chroniques comme la schizophrénie (Lieberman, Kinon, & Loebel, 1990; Yui et al., 1999).

Pour ce qui est des symptômes psychotiques induits par la cocaïne, le gène codant pour l'enzyme Dopamine β Hydroxylase (DBH), enzyme qui dégrade la dopamine en noradrénaline, a été le premier à être étudié. Ainsi Cubells & al. avaient mis en évidence une association entre l'haplotype Del-a et les SPIC chez des patients caucasiens américains dépendants à la cocaïne (Cubells et al., 2000). Plus tard, la même équipe retrouve l'association d'un variant fonctionnel (-1021C>T alias rs1611115) du gène *DBH* avec une plus grande vulnérabilité aux effets psychotiques de la cocaïne en conditions expérimentales (Kalayasiri et al. 2007). Chez l'Homme, l'allèle mineur de ce polymorphisme, qui se situe dans la région promotrice du gène *DBH*, est associé à une altération de la transcription et à une baisse des taux circulants de cette enzyme avec comme conséquence une augmentation de rapport basal de dopamine/noradrénaline (Zabetian et al., 2001, 2003). La prise de cocaïne augmenterait ainsi davantage les taux de dopamine synaptique chez les sujets présentant l'allèle mineur, contribuant de ce fait à l'apparition des SPIC (Haile et al., 2009).

D'autres gènes de la voie dopaminergique ont été également associés avec les SPIC. Une seule étude non répliquée avait retrouvé une association avec le gène *SLC6A3* (*Solute Carrier 6A3*) codant pour le transporteur de la dopamine DAT (Dopamine Active Transporter) dont la cocaïne est le ligand (Joel Gelernter, Kranzler, Satel, & Rao, 1994).

Enfin, une étude « génome entier » (GWAS) sans *a priori* publiée par Gelernter et al. (Gelernter et al., 2014c) retrouve une association significative entre les SPIC et un SNP (rs2456778) du gène *CDK1* (Cyclin-dependent kinase 1) codant pour une kinase impliquée dans plusieurs processus cellulaires (Enserink & Kolodner, 2010).

B. Etude d'association des gènes candidats dopaminergiques avec les symptômes psychotiques transitoires induits par la cocaïne

Notre équipe avait recensé l'ensemble des gènes dopaminergiques associés dans la littérature à davantage de symptômes psychotiques sous cocaïne (*DBH* et *SLC6A3*) et avec la dépendance à la cocaïne (*COMT*, *DRD1*, *DRD2*) (Brousse et al., 2010), et avait souhaité répliquer ces études dans une population de patients Français.

Dans mon travail de thèse portant sur les interactions gène-environnement, j'ai testé une combinaison de ces facteurs et de facteurs cliniques dans la survenue des SPIC, en recherchant une éventuelle interaction entre eux.

1. Méthodologie de l'étude

L'hypothèse d'un rôle des polymorphismes des gènes dopaminergiques dans la survenue des SPIC a fait l'objet d'un PHRC national multicentrique (étude PSYCHOCOKE - 2010 AOM10165). Ainsi, dans le cadre de ce PHRC, 418 patients ont été inclus dans 9 centres de soins addictologiques à travers la France. Le critère d'inclusion était l'usage vie entière de cocaïne ; quant aux critères de non inclusion, ils sont essentiellement éthiques (patients mineurs, majeurs protégés, ou non affiliés à un régime de Sécurité sociale). Parmi ces patients, nous avons retenus 267 individus caucasiens sélectionnés sur la base de leur proximité génétique avec les populations caucasiennes de la base publique 1000 Genomes selon la méthodologie décrite par Marees & al. (Marees et al., 2018).

Ont été recueillis pour la cocaïne et les autres substances d'abus l'ensemble des critères de dépendance ou d'abus selon les critères du DSM IV-TR (American psychiatric association., 2004), les modes de consommations, et la chronologie de l'évolution de l'usage (âges de premier contact, d'usage régulier, d'installation de la dépendance et d'arrêt). Les comorbidités psychiatriques ont également été recherchées, en particulier les troubles psychotiques chroniques avec l'entretien DIGS (Diagnostic Interview for Genetic Studies) (Nurnberger et al., 1994).

Pour l'évaluation des SPIC, la version française (Vorspan et al., 2009) de l'échelle SAPS-CIP (Cubells et al., 2005) a été utilisée (cf. annexe 3). Cette échelle a été validée, traduite dans plusieurs langues et utilisée dans plusieurs études (Vergara-Moragues et al., 2014; Vorspan

et al., 2012; Cubells et al., 2005; Trape et al., 2014; Tang et al., 2009). La SAPS-CIP explore rétrospectivement les trois dimensions cliniques des SPIC que sont : *les hallucinations, les idées délirantes, et les troubles du comportement* lors de la pire période d'usage de cocaïne vie entière. Chaque dimension comprend plusieurs symptômes évalués de façon détaillée par l'interviewer qui attribue à chaque symptôme un score compris entre 0 (absence) et 5 (sévère – grave) ; un score synthétique de 0 à 5 est ensuite donné à chacune des trois dimensions. Ainsi, le score total de l'échelle, somme des trois dimensions, *hallucinations, idées délirantes, troubles du comportement*, varie entre 0 et 15. Les SPIC sont considérés comme présents si le sujet cote au moins 2 à l'une des trois dimensions (Cubells et al., 2005). Chaque patient était évalué de façon transversale lors d'une seule consultation.

De plus un prélèvement visant à réaliser une mesure de l'activité enzymatique de la DBH plasmatique a été réalisé. Mais les kits enzymatiques se sont révélés complètement inefficaces sur du plasma préalablement congelé et cette mesure a été abandonnée.

Chaque patient a été prélevé d'un échantillon de sang périphérique dont a été extrait l'ADN génomique. Le génotypage a été réalisé sur la puce *BeadChip Illumina Infinium PsychArray 24 v1.0* en 2015 pour les 100 premiers patients inclus puis sur la Puce *BeadChip Illumina Infinium PsychArray 24 v1.1* en 2017 pour les 316 patients suivants. Ces puces se caractérisent par un enrichissement en SNP impliqués dans les affections psychiatriques et contiennent plus de 500 000 SNPs dont 250 000 variants rares.

Pour l'analyse des données génétiques, nous avons aussi utilisé pour cette étude le script SNPretrieve (chapitre IV) pour extraire les SNPs des cinq gènes étudiés : *COMT* (Catechol-O-methyltransferase, enzyme de dégradation de la dopamine), *DBH*, *SLC6A3* (ou *DAT*), *DRD1* et *DRD2* (Dopamine receptor 1 et 2, codants pour les récepteurs dopaminergiques 1 et 2). Les données génétiques ont fait l'objet de plusieurs étapes de contrôle qualité selon la méthodologie décrite par Marees et al. 2018 (Marees et al., 2018). Les SNPs retenus pour l'analyse sont présentés dans la figure VI-1.

Tous nos tests d'association univariés étaient non paramétriques en raison de l'écart de la distribution normale du score SAPS-CIP dans notre population.

Pour la recherche d'associations génétiques nous avons utilisé un modèle de régression linéaire en prenant le score SAPS-CIP comme variable dépendante et chacun des SNPs disponibles étudiés individuellement comme variables explicatives.

Même si nous n'avons restreint notre analyse qu'à des sujets caucasiens, nous avons inclus les trois premières composantes MDS (Multi Dimensional Scaling) pour corriger encore plus la stratification ethnique de notre population. Ces composantes avaient été calculées sur l'ensemble des SNPs présents sur la puce.

Nous avons également réalisé une analyse haplotypique pour chacun des gènes dont au moins deux SNPs étaient retrouvés comme étant associés au score SAPS-CIP. Les blocs haplotypiques ont été construits avec les logiciels Plink (Purcell et al., 2007) et Haploview (Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005) selon la méthode décrite par Gabriel & al. (Gabriel et al., 2002). Pour chaque bloc n'ont été retenus que les haplotypes avec une fréquence supérieure ou égale à 1%. Seuls les blocs significativement associés au score SAPS-CIP ont été retenus.

Par ailleurs, pour la modélisation de l'effet combiné des facteurs cliniques et génétiques ainsi que de leur interaction, nous avons utilisé une série de régressions linéaires. Le score SAPS-CIP en était la variable dépendante, les facteurs cliniques puis les SNPs individuellement associés à ce score ont été inclus comme variables indépendantes. Nous avons utilisé des ANOVAs pour comparer les différents modèles construits. Pour la recherche d'une éventuelle multi-colinéarité entre les termes du modèle de régression nous avons calculé le facteur d'inflation de la variance (VIF) pour chacune des variables explicatives. Un VIF supérieur à 10 est en faveur d'une absence d'indépendance de la variable concernée avec les autres prédicteurs.

2. Résultats

a) Les variables sociodémographiques et cliniques

Nous présentons ici les résultats obtenus après sélection des sujets caucasiens observés dans notre cohorte (N=267). Dans leur majorité, nos sujets sont de sexe masculin (77,9%) avec une moyenne d'âge de 38 ans (intervalle d'âge de 19 à 71 ans).

La proportion de sujets présentant des symptômes psychotiques certains sur au moins une des trois dimensions de la SAPS-CIP (score ≥ 2) est de 79,4 % (n=212).

Le score SAPS-CIP moyen était de 5,7 ($\pm 0,2$) avec une médiane de 6 (intervalle de 0 à 15). Ce score était positivement corrélé avec la fréquence de prise de cocaïne mesurée en jours par mois durant la pire période d'usage (n = 258 ; $r_{\text{Spearman}} = 0,39$; $p = 8,2 \times 10^{-11}$). Par ailleurs, les usagers de cocaïne par voie intraveineuse avaient des scores SAPS-CIP significativement plus élevés que ceux utilisant toutes les autres voies de consommation (6,8 $\pm 0,4$ versus 5,2 $\pm 0,3$ respectivement ; $W = 5651$; $p = 0,002$). La dépendance vie entière à la cocaïne était également associée au score SAPS-CIP ; les sujets dépendants avaient en effet des scores plus élevés (n = 213 ; 6,7 $\pm 0,3$ versus 6,2 $\pm 0,5$; $W = 8838$, $p = 0,04$).

Chez nos patients, d'autres dépendances étaient aussi associées à des scores SAPS-CIP plus élevés : la dépendance au cannabis (n = 265 ; 6 $\pm 0,3$ versus 5,2 $\pm 0,4$; $W = 6675$; $p = 0,006$), et la dépendance aux sédatifs/hypnotiques (n = 266 ; 6,3 $\pm 0,3$ versus 5,3 $\pm 0,3$; $W = 7379,5$; $p = 0,04$), tandis que les dépendances aux autres substances (alcool et opiacés) n'étaient pas associées (Alcool : n=263 ; $W = 7612,5$; $p = 0,27$; Opiacés : n = 266 ; $W = 9363$; $p = 0,47$).

L'âge précoce (précoce oui/non) du cannabis a été défini par rapport à la médiane qui était de 14 ans. L'âge précoce d'usage du cannabis n'était pas associé avec le score SAPS-CIP (précoce versus non précoce : 6 $\pm 0,4$ versus 5,4 $\pm 0,3$ respectivement ; $W = 8443$; $p = 0,7$).

La variable DIGS, explorant les troubles psychotiques était disponible chez 261 sujets, parmi lesquelles 10% (n=26) avaient un diagnostic probable de trouble schizophrénique. Ces patients avaient des scores SAPS-CIP significativement plus élevés que les sujets non schizophrènes (schizophrènes versus non schizophrènes : 6,7 $\pm 0,8$ versus 5,7 $\pm 0,2$ respectivement ; $W = 2117$; $p = 0,001$).

Les autres variables cliniques sont résumées dans le tableau VI-1.

Tableau VI-1 : Caractéristiques socio démographiques et cliniques des sujets analysés et leur association avec le score total de l'échelle SAPS-CIP

Variables socio démographiques ou cliniques	Moyenne ou pourcentage	Nombre de sujets	Association avec le score total SAPS-CIP Valeur de p
Sexe (homme)	77.9 % (208)	267	0.36
Moyenne d'âge années (± ESM)	38 (± 0.5)	267	0.58
Score total de l'échelle SAPS-CIP (± ESM)	5.7 (± 0.2)	267	-
Age de première consommation de cocaïne années (± ESM)	23.1 (± 0.4)	266	0.08
Fréquence de prise de cocaïne durant la pire période d'usage jour/mois (± ESM)	20.4 (± 0.7)	258	8.2 x 10⁻¹¹
Usage vie entière de cocaïne par voie IV %(n)	29.6 % (79)	267	0.002
Dépendance vie entière à la cocaïne* %(n)	70.4 % (150)	213	0.04
Dépendance vie entière à l'alcool* %(n)	63.5 % (167)	263	0.27
Dépendance vie entière au cannabis* %(n)	62.6 % (166)	265	0.006
Age précoce d'usage de cannabis (<= 14 ans) %(n)	35.7 % (90)	252	0.7
Dépendance vie entière aux sédatifs-hypnotiques* %(n)	42.1 % (112)	266	0.04
Dépendance vie entière aux opiacés* %(n)	49.2 % (131)	266	0.47
Substitution aux opiacés vie entière %(n)	44.9 % (120)	267	0.47
Trouble psychotique selon la DIGS %(n)	10 % (26)	261	0.001

IV : intraveineux

ESM : erreur standard de la moyenne

DIGS : Diagnostic Interview for Genetic Studies

* : Selon les critères du DSM IV-TR (American psychiatric association., 2004)

b) L'analyse allélique et génotypique

Cent quatorze SNPs dans notre puce étaient situés sur les cinq gènes étudiés. Parmi ces SNPs, 32 ont passé l'ensemble des filtres de contrôles qualité et ont été inclus dans l'analyse. Aucun de ces 32 SNPs n'appartenait au gène *DRD1* (Figure VI-1)

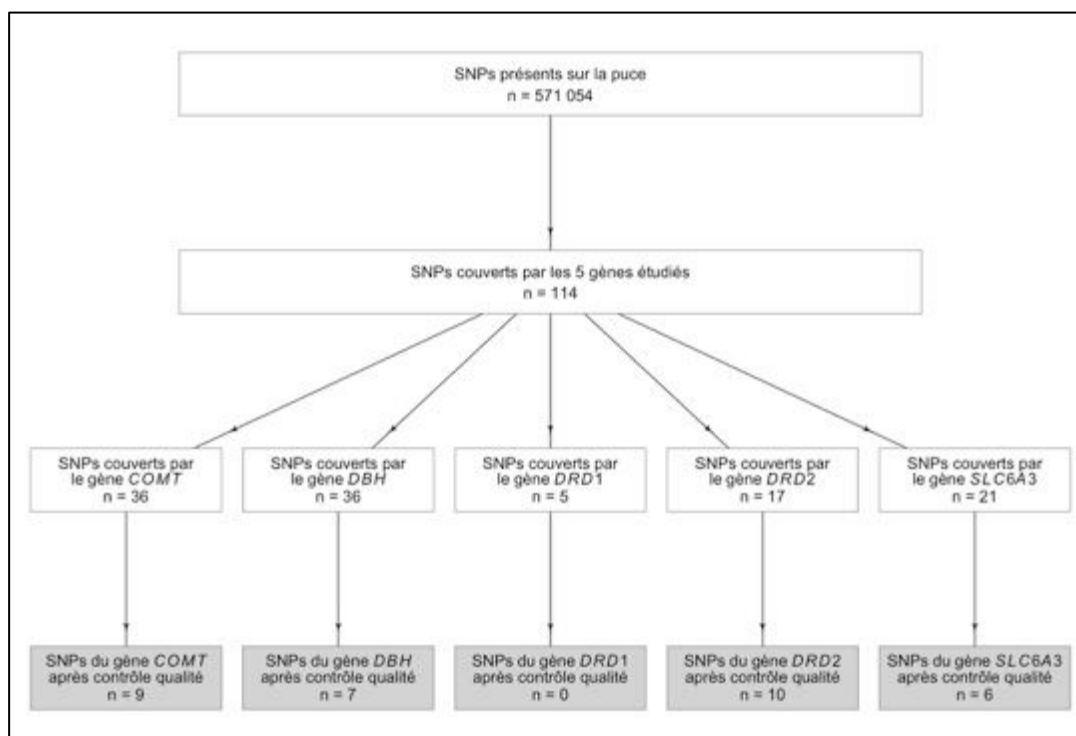


Figure VI-1 : SNPs par gène sélectionnés pour l'analyse

Dans notre population, 6 SNPs sont associés au score SAPS-CIP au seuil nominal de 5 %. Sur ces six SNPs, 5 appartiennent au gène *COMT*, et un au gène *DRD2* (tableau IV-2).

L'association la plus significative est retrouvée pour le SNP rs740603 du gène *COMT* ($p = 4,5 \times 10^{-3}$; Taille d'effet = 0.03; $R^2_{ajusté} = 2,1 \%$). En effet, chaque allèle mineur A supplémentaire augmente le score SAPS-CIP de 1 point. De plus les sujets porteurs d'au moins un allèle A de ce SNP (génotypes AG et AA regroupés, n=169) ont des scores SAPS-CIP significativement plus élevées que les non porteurs de cet allèle (génotype GG, n=98) ($6,3 \pm 0,3$ versus $4,7 \pm 0,4$ respectivement; $W = 6261$; $p = 8,6 \times 10^{-4}$) (Figure VI-2). Néanmoins, l'association de ce SNP rs740603 n'est plus significative après correction de Bonferroni pour tests multiples ($p_{corrigée} = 0,15$).

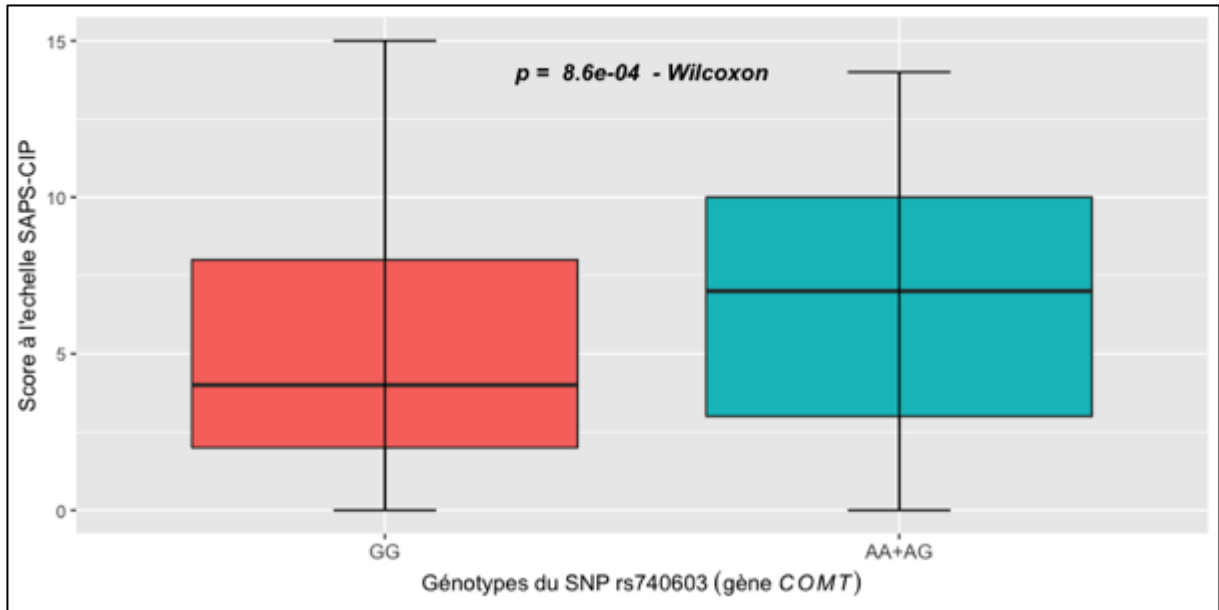


Figure VI-2 : score de l'échelle SAPS-CIP les génotypes du SNP rs740603 (gène COMT)

Tableau VI-2 : Variants associés au score SAPS-CIP avec une valeur nominale de $p < 5\%$

SNP	Locus	Chr.	Position dans le gène	Position (version Gh37)	Allèle [mineur/majeur]	FAM	n	BETA	SE	p	p corrigée
rs740603	COMT	22	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	19945177	[A/G]	0,37	267	1	0,4	$4,5 \times 10^{-3}$	0,15
rs2239393	COMT	22	Variant intronique Variant d'un transcrit NMD	19950428	[A/G]	0,47	267	-0,9	0,3	$5,8 \times 10^{-3}$	0,19
rs4818	COMT	22	Variant exonique synonyme Variant d'un transcrit NMD	19951207	[G/C]	0,47	267	-0,8	0,3	0,01	0,45
rs737866	COMT	22	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	19930109	[T/C]	0,36	267	-0,8	0,4	0,02	0,77
rs5993883	COMT	22	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	19937638	[T/G]	0,38	266	0,7	0,4	0,04	1
rs75349786	DRD2	11	Variant intronique Variant d'un transcrit non codant	113299273	[A/G]	0,06	267	1,4	0,7	0,04	1

FAM : Fréquence de l'allèle mineur

NMD : Nonsense-mediated decay pour dégradation des ARNm non-sens

c) L'analyse haplotypique

Seul le gène *COMT* avait plus de deux SNPs significativement associé avec le score SAPS-CIP. Selon la méthode décrite précédemment (cf. partie méthode), nous avons construit deux blocs haplotypiques dans ce gène (Figure VI-3). Le premier bloc, construit à partir de deux SNPs (rs737866 et rs174674), comprenait trois haplotypes. Ce bloc n'était pas associé au score SAPS-CIP et n'a pas été retenu pour l'analyse (ANOVA ; $n = 260$; $F = 2,96$; $ddl = 2$; $p = 0,054$). Le deuxième bloc a été construit à partir de 4 SNPs (rs165656, rs2239393, rs4818 et rs4680) et comprenait également trois haplotypes avec une fréquence d'au moins 1%. Ce bloc était associé au score SAPS-CIP (ANOVA ; $n = 260$; $F = 3,98$; $ddl = 2$; $p = 0,02$). Comparés aux autres haplotypes réunis, les haplotypes GGCG et GAGG étaient associés au score SAPS-CIP (respectivement : $\beta = -0.7$; IC95 % : [-1.3 - 0.01] ; $p = 0.02$ & $\beta = 1$; IC95 % : [-0,3 - 2,26] ; $p = 0.04$) (Tableau IV-3). Aucun des haplotypes de ce bloc ne restait significatif après correction pour tests multiples (respectivement : $p_{\text{corrigée}} = 0,06$; $p_{\text{corrigée}} = 0.12$). Le top SNP (rs740603) de l'analyse par variant présentée auparavant n'était inclus dans aucun des deux blocs (Figure VI-4).

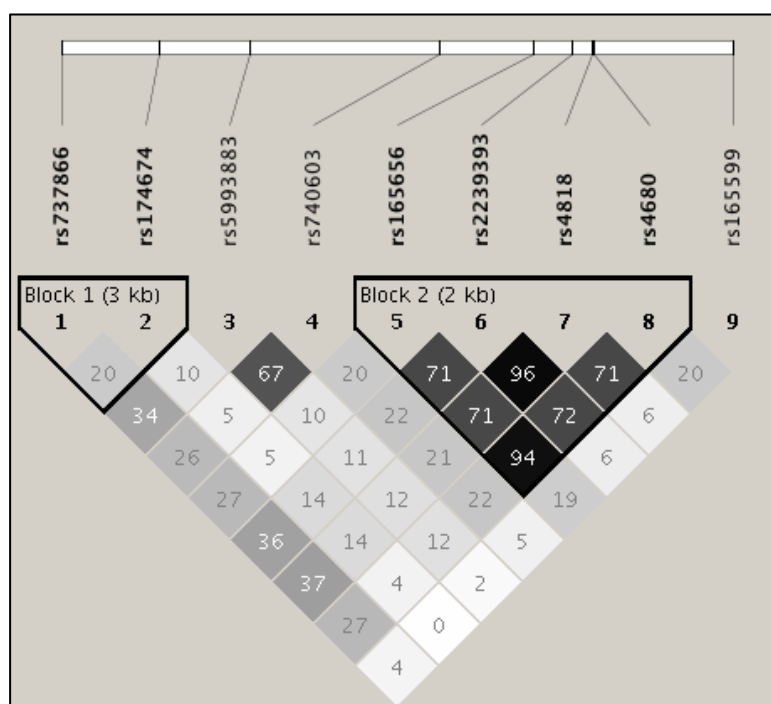


Figure VI-3 : Déséquilibre de liaison entre les SNPs du gène *COMT* (exprimé en r^2) et construction de blocs haplotypiques selon la méthode de Gabriel & al.

Tableau VI-3 : fréquences, moyennes et associations avec le score SAPS-CIP des haplotypes du deuxième bloc haplotypique du gène *COMT*

Haplotype	Fréquence	Moyenne score total SAPS-CIP (\pm ESM)	Association avec le score total SAPS-CIP Valeur de <i>p</i>
GAGG	0.47	6,9 (\pm 3,2)	0.02
CAGA	0.44	6,1 (\pm 3,8)	0.06
GGCG	0.07	5,3 (\pm 3,7)	0.04

ESM : erreur standard de la moyenne

d) Modélisation des facteurs cliniques et du SNP rs740603 du gène COMT

La variable clinique la plus significativement associée au score SAPS-CIP était le nombre de jours de prises de cocaïne par mois durant la pire période de consommation; de ce fait l'étude de l'interaction concernait le SNP le plus significatif (rs740603 du gène *COMT*) avec cette variable. Pour cette étude, nous avons procédé en trois étapes ; nous avons construit trois modèles en prenant à chaque fois comme variable dépendante le score SAPS-CIP.

- Le premier, le modèle clinique, comprend uniquement les variables cliniques significatives (cf. Tableau VI-1). En plus du nombre de jours de prises de cocaïne par mois, nous avons ainsi inclus : l'usage de cocaïne par voie IV, la dépendance vie entière à la cocaïne, la dépendance vie entière au cannabis, la dépendance vie entière aux sédatifs-hypnotiques et la présence d'un trouble schizophrénique selon la DIGS. Nous avons également inclus le sexe et l'âge.
- Le deuxième, le modèle génétique, comprend en plus des variables du modèle clinique, le SNP rs740603 et les trois premières composantes MDS (pour corriger la stratification ethnique de la population).
- Le troisième, le modèle d'interaction, comprend en plus des variables du modèle génétique, un terme d'interaction du SNP avec le nombre de jours de prises de cocaïne par mois.

Le modèle clinique explique 6,7 % de variance du score SAPS-CIP (n= 206 sujets ; ddl = 197). Seul le nombre de jours de prises de cocaïne par mois demeure significatif dans ce modèle (*p*

= 0,003) ; en effet, chaque jour supplémentaire de prise de cocaïne par mois durant la pire période de consommation augmente le score SAPS-CIP de 0,8 points [IC95 % : 0,03 – 0,13].

L'ajout de l'effet du SNP rs740603 du gène *COMT* augmente la variance expliquée du score SAPS-CIP par rapport au modèle clinique (ANOVA ; $F= 2,59$; $ddl = 4$; $p=0,04$). En effet, ce modèle génétique explique 9,6 % de la variance ($n = 206$ sujets ; $ddl = 193$). Dans ce modèle, le nombre de jours de prises de cocaïne par mois ($\beta = 0,08$; IC95 % : [0,03 – 0,13] ; $p = 0,002$) et le nombre d'allèle mineur du SNP rs740603 (A versus G ; $\beta = 1,24$; IC95 % : [0,45 – 2,02] ; $p = 0,002$) sont les seules variables significatives.

Comparé au modèle génétique, l'ajout d'un terme d'interaction du SNP rs740603 avec le nombre de jours de prises de cocaïne par mois n'apporte pas d'amélioration significative ($n = 206$ sujets ; $ddl = 192$) (ANOVA ; $F= 2,49$; $ddl = 1$; $p = 0,11$). La variance du score SAPS-CIP expliquée par ce modèle est de 10,3 %. De plus, nous n'avons pas retrouvé dans ce modèle d'association significative du terme d'interaction avec le score SAPS-CIP ($\beta = -0,07$; IC95 % : [-0,12 – 0,02] ; $p = 0,12$). Les variables : nombre de jours de prises de cocaïne par mois ($\beta = 0,12$; IC95 % : [0,05 – 0,21] ; $p = 0,002$), et nombre d'allèle mineur du SNP rs740603 ($\beta = 2,8$; IC95 % : [0,7 – 4,8] ; $p = 0,009$) restaient quant à elles significatives.

Nous n'avons relevé aucune multi colinéarité entre les variables dans l'ensemble des modèles construits (tous les VIF étaient inférieurs à 10).

3. Discussion

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une association significative entre la fréquence des prises de cocaïne durant la pire période de consommation, estimée en nombre de jours de prises par mois, et l'intensité des SPIC évaluée par l'échelle SAPS-CIP également durant la pire période. De plus, certains variants du gène *COMT* favoriseraient aussi la survenue de ce phénotype que sont les SPIC. Le résultat principal de notre étude est qu'en l'absence d'interaction entre la fréquence de consommation de la cocaïne et le polymorphisme le plus significatif du gène *COMT*, ces deux facteurs de risque de SPIC seraient indépendants et s'additionneraient sans interaction.

La fréquence des SPIC dans notre population (79,4 %) est similaire à celles retrouvées par d'autres équipes évaluant les SPIC avec le même outil SAPS-CIP (75 % à 84 %) (Vergara-

Moragues et al., 2014; Joseph F Cubells et al., 2005). Le score moyen de la SAPS-CIP est également proche de celui retrouvé dans une étude portant sur une population martiniquaise (Trape et al., 2014) ($6,1 \pm 3,7$ versus $5,7 \pm 3,7$ dans notre étude).

La fréquence de prise par mois durant la pire période de consommation est le principal facteur de risque retrouvé comme étant associé à l'intensité des SPIC à l'échelle SAPS-CIP Ce facteur de risque a été peu rapportée dans la littérature, néanmoins une étude observationnelle menée chez des utilisateurs de cocaïne par voie IV avait retrouvé une plus grande fréquence de consommation chez les sujets ayant présenté des SPIC comparés à ceux qui n'en n'avaient pas présenté (Carlos Roncero et al., 2013). D'autre part, une fréquence de consommation plus importante expose à une dose cumulée plus importante de cocaïne, qui est l'un des facteurs de risque de SPIC retrouvé dans les études (cf. facteur de risque clinique - paragraphe A.1). Globalement, plusieurs études sont en faveur d'un effet-dose dans la survenue des SPIC (Vorspan et al., 2011; Kalayasiri et al., 2006a, 2006b; Mooney et al., 2006; Sherer et al., 1988).

Plusieurs études avaient retrouvées une association entre la survenue de SPIC et la dépendance au cannabis (Kalayasiri et al., 2010; C. Roncero et al., 2013; Tang et al., 2007). Nos résultats permettent de préciser cette association : non seulement la dépendance au cannabis est associée à leur survenue mais aussi à leur intensité. En revanche nous ne retrouvons pas un âge de début précoce de l'usage de cannabis comme étant un facteur de risque d'éprouver des SPIC plus intenses (Kalayasiri et al. 2006). Ce facteur avait été avancé pour appuyer l'idée que des expériences psychotiques précoces lors de l'usage de cannabis pouvaient favoriser l'émergence de symptômes psychotiques lors de l'usage ultérieur de cocaïne. Nous n'étions pas en mesure de tester l'effet de symptômes psychotiques préalables lors de l'usage de cannabis dans notre étude.

Nous avons également retrouvé des scores SAPS-CIP plus élevés chez les sujets dépendants aux sédatifs/hypnotiques. Roncero & al. (Carlos Roncero et al., 2013) avait retrouvé un résultat similaire ; en effet la prise de benzodiazépines dans le mois précédent l'évaluation était associée à la survenue de SPIC chez des usagers injecteurs de cocaïne. Ceci rejoint notre résultat à la différence que l'association que nous avons retrouvée ne se limite pas uniquement aux utilisateurs de la voie IV. Comme pour la dépendance au cannabis, la

dépendance aux benzodiazépines pourrait être une signature indirecte des patients les plus sévères, prenant de grandes quantités de toutes les substances, notamment des substances sédatives comme le cannabis ou les benzodiazépines, pour gérer les « descentes » des grandes quantités de cocaïne qu'ils consomment.

Le SNP rs740603 est localisé dans une partie intronique du gène *COMT* et n'a pas d'effet fonctionnel connu. Dans notre cohorte de sujets caucasiens, nous avons identifié l'allèle A du SNP rs740603 du gène *COMT* comme étant l'allèle mineur et associé au risque de survenue des SPIC. Selon, la base 1000 Genomes (accédée via Ensembl (« rs740603 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - GRCh37 Archive browser 92 », s. d.), l'allèle mineur dans l'ensemble des populations est l'allèle G (fréquence allèle G : 0,47). Néanmoins si on se limite aux populations européennes de 1000 Genomes (1000G), les proportions alléliques s'inversent et c'est l'allèle A qui est mineur comme dans notre cohorte (fréquence allèle A dans 1000G: 0,46 et dans notre population 0,37).

Une précédente étude de Ittiwut & al. (Ittiwut et al., 2011) avait étudié ce SNP dans des populations européennes américaines (n=707) et n'avait pas retrouvé d'association avec les SPIC alors que nous disposions de moins de sujets (n=267 dans notre cohorte). A la différence de notre étude, l'évaluation des SPIC faite par Ittiwut & al. se résumait à une seule question fermée, et la fréquence des SPIC était dès lors sensiblement moins importante que celle observée dans notre cohorte (53 % dans Ittiwut & al. versus 79,4 % dans notre étude) ou dans les études utilisant l'échelle SAPS-CIP (cf. paragraphe A.1). Ainsi, la divergence entre nos résultats et ceux de cette étude pourrait être essentiellement liée au mode de recueil des SPIC, qui est plus exhaustif avec l'échelle SAPS-CIP utilisée dans notre travail. De plus une évaluation dimensionnelle des SPIC est plus informative et de ce faite apporte une meilleure puissance statistique.

Parmi les SNP analysés du gène *COMT* nous avons étudié le rs4680. Ce dernier SNP plus connu sous Val158 Met a été largement associé avec plusieurs pathologies psychiatriques dont la schizophrénie (González-Castro et al., 2016), la dépendance à la cocaïne (Lohoff et al., 2008) et la survenue de symptôme psychotiques sous cannabis (Caspi et al., 2005). Dans notre population, l'analyse par SNPs considérés individuellement ne montrait aucune association du rs4680 avec le score SAPS-CIP.

Nous avons identifié deux blocs haplotypiques du gène *COMT* chez nos sujets caucasiens. Notre construction haplotypique concorde parfaitement avec celle faite dans des populations européennes plus larges, et les deux blocs correspondent à des régions de fort déséquilibre de liaison (Mukherjee et al., 2010). Le deuxième bloc haplotypique qui comprend les SNPS rs165656, rs2239393, rs4818 et rs4680 est associé dans notre étude au score SAPS-CIP. Il est intéressant de noter que des haplotypes qui couvrent partiellement ou totalement ce deuxième bloc haplotypique ont été associés avec la survenue de symptômes psychotiques dans la maladie d'Alzheimer (Borroni et al., 2007), avec la schizophrénie (Shifman et al., 2002), la réponse aux antipsychotiques chez des patients schizophrènes (Gupta et al., 2009) ou avec les SPIC évalués de façon catégorielle (Ittiwut et al., 2011).

Notre modélisation des différents facteurs associés aux SPIC montre que dans notre cohorte les facteurs cliniques intervenaient de façon prépondérante par rapport aux facteurs génétiques de l'enzyme *COMT*. En effet la variance des SPIC expliquée par notre modèle clinique était plus importante que celle expliquée par le SNP rs740603 du gène *COMT* uniquement (6,7 % versus 2,1 %). De plus l'ajout du terme d'interaction n'apportait aucune amélioration significative à la variance expliquée, ce qui laisserait suggérer des effets additifs indépendants de la fréquence de consommation de cocaïne et du SNP rs740603 dans la survenue des SPIC dans notre population.

Une des limites de notre étude est la faible puissance statistique. En effet, les associations génétiques retrouvées ne sont plus significatives après la correction pour tests multiples ; la puissance pour détecter une taille d'effet similaire à celle retrouvée dans notre association avec le SNP rs740603 (ie. une taille d'effet de 0,03) chute de 80 à 36 % lors de la correction pour tests multiples.

Au total notre étude apporte un nouvel éclairage sur l'interaction gène et facteur environnementaux. Il apparaît que dans le cas de la fréquence de consommation et les polymorphismes les effets respectifs soient indépendants. De plus les facteurs cliniques représentant la dose de cocaïne consommée jouent un rôle prépondérant comparé aux variations génétiques dans la survenue des SPIC. Néanmoins nous confirmons dans un échantillon indépendant le rôle de la *COMT* dans les symptômes psychotiques induits par la cocaïne (Ittiwut et al., 2011) ou d'autres substances (Caspi et al., 2005) ou d'autres

conditions physiopathologiques comme la schizophrénie (Shifman et al., 2002, Gupta et al., 2009, González-Castro et al., 2016)

Ceci suggère qu'en pratique clinique le repérage de facteurs de risque environnementaux est plus pertinent qu'un génotypage pour la prévention de cette complication de la prise de cocaïne que ceux les effets psychotiques induits. Ces résultats doivent cependant être interprétés avec prudence et une réplication sur des échantillons plus importants devrait être conduite. Mais ceci suggère également que la recherche psychopharmacologique impliquant la COMT doit se poursuivre dans l'objectif de réduire les symptômes psychotiques dans plusieurs affections psychiatriques.

VII. DISCUSSION GENERALE

Dans ce travail de thèse j'ai été amené à m'initier à plusieurs techniques d'analyse et à me perfectionner dans plusieurs champs de compétence, allant du développement de script R, à la modélisation statistique des interactions de variables. De plus même, si le projet n'a pas abouti, je me suis aussi familiarisé avec le traitement des données de séquençage à haut débit, méthodologie d'étude qui est en plein essor en psychiatrie et en addictologie.

A. Technologies : développement logiciel, études d'association génétique, traitement des données de séquençage, variants fréquents/rares, modélisation

Le développement de ce script R nous a permis d'extraire rapidement les variants d'intérêt de notre puce. Sachant que nous disposons d'une grande quantité de données génétiques des patients inclus, ce script nous a permis et nous permettra de vérifier plus facilement nos hypothèses de travail. L'une de des forces de ce script est son adaptabilité. En effet, il peut être utilisé avec d'autres puces de génotypage ainsi qu'avec des données de séquençage.

Le traitement de données de séquençage comprend deux parties : La première consiste en un contrôle qualité afin d'obtenir des données exploitables et fiables. Cette partie est souvent confiée à des bio-informaticiens. Dans mon travail sur les données de séquençage, j'ai été amené à me former à ce contrôle qualité et à la réaliser, ce qui me permettra dans l'avenir de le refaire sur nos futurs projets ou de juger de la qualité des données qui nous seront transmises. J'ai pu aussi mettre en place un « pipeline » de contrôle qualité avec l'aide de Mr Yannick BOURSIN, bio informaticien à l'institut Gustave Roussy.

La deuxième partie de l'analyse des données de séquençage est la partie analytique en elle-même qui comprend notamment la recherche de variants rares associées au phénotype d'intérêt. Sous la supervision du Dr Cynthia MARIE-CLAIRE et du Pr BELLIVIER, et collaboration avec l'équipe INSERM/UMR-S1130 spécialisée dans la signalisation neuronale et les régulations géniques, nous avons cherché à vérifier l'hypothèse d'une vulnérabilité génétique à la dépendance à la cocaïne impliquant une voie de signalisation. Cette hypothèse est issue directement de modèles animaux. De point de vue statistique, cette partie fait appel à des tests d'association spécifiques (SKAT) auxquels j'ai pu m'initier sans

malheureusement pouvoir les mettre en application en raison de données de séquençage de mauvaise qualité.

Dans les études d'association génétiques, sous la supervision du Dr Florence VORSPAN, nous avons identifié des symptômes candidats d'intérêt clinique, et émis des hypothèses quant à l'interaction facteurs de vulnérabilité cliniques et génétiques. Pour vérifier ces hypothèses, j'ai eu accès à deux cohortes de patients poly-dépendants recrutés dans le cadre de deux PHRC dont le Dr VORSPAN est l'investigatrice principale. Cette thèse s'inscrit dans la continuité de mon master en neurobiologie ; en effet, encadré par le Dr VORSPAN, j'avais participé à la rédaction des autorisations auprès du Comité de Protection des Personnes, à la mise en place du formulaire électronique du recueil électronique, et au recrutement des premiers patients du PHRC Psychocoke. Pour les études de ma thèse, j'ai eu à réaliser toutes les étapes de contrôle qualité et d'analyse. Ainsi j'ai pu maîtriser la qualité de mes données et la robustesse de mes résultats. L'étude d'interaction fait appel à des modèles de régression, que j'ai eu à construire et dont j'ai eu à tester la qualité. Pour développer cette compétence j'ai suivi une série de formations proposées par l'Inserm tout au long de ma thèse.

B. Intérêt de la modélisation gènes x environnement dans les phénotypes d'addictions complexes : maladies polygéniques, multifactorielles, variants à taille d'effet faible, fort impact environnemental, et avancées physiopathologiques.

Dans ce travail de thèse nous avons pu atteindre deux objectifs : Le premiers est une meilleure compréhension des effets des variants génétiques selon les condition cliniques associées, et le deuxième est de proposer des hypothèse physiopathologiques qui peuvent ouvrir de nouvelles voie de recherches.

Nous avons exploré l'interaction gène x environnement de différente façon. Dans le premier travail sur le tabagisme, nous avons mis en évidence une association avec un SNP du gène *TLR4* dans une population de patients bipolaires, alors que cette association n'était pas retrouvée dans une étude plus large en population générale. De ce fait nous avons supposé que cette vulnérabilité génétique s'exprime que dans certaine condition clinique (la bipolarité dans ce cas). Ceci constituerait un cas typique d'interaction gène x condition

clinique, et pourrait expliquer la prévalence différente du tabagisme entre les patients bipolaires et la population générale.

Dans les deux autres études (allongement du QT sous méthadone, et effet psychotique sous cocaïne), l'interaction était testée non plus avec une condition clinique (dichotomique) mais avec une caractéristique clinique continue (respectivement avec la dose journalière de méthadone, et le nombre de jours de consommation de cocaïne par mois). Bien que les résultats soit différents (respectivement présence et absence d'interaction), ces études nous ont permis de nuancer l'effet des variants étudiés. A travers ces deux études nous avons pu proposer des pistes de recommandation cliniques. En effet, dans le cas des patients sous méthadone, il est intéressant de proposer un génotypage pour mieux cibler les patients à risque d'allongement du QT en cas de prescription de posologies élevées. Tandis que chez les patients usager de cocaïne, le génotypage des variants de la COMT est moins pertinent vu la faible taille d'effet des variants génétiques comparé aux facteurs cliniques. Dans cette population, il est plus intéressant d'intervenir sur la réduction de la consommation pour prévenir les effets psychotiques de la cocaïne. Ainsi notre travail sur les interactions entre gènes et facteurs cliniques permet d'une part de réfléchir à l'intérêt d'un génotypage dans la prévention d'une complication de l'usage de substance ou de la prescription d'un traitement pharmacologique, et aussi de mieux cibler les populations à risque selon le facteur clinique et leur génotype.

Enfin, au vu des résultats obtenus, nous avons pu proposer des hypothèses physiopathologiques qui pourraient déboucher sur des résultats intéressants. Dans l'étude sur la vulnérabilité au tabagisme chez les patients bipolaire nous avons proposé une hypothèse d'un emballement de la réponse immunitaire comme facteur protecteur vis à vis du tabagisme chez les patients bipolaires. De même dans l'étude de l'allongement du QT sous méthadone, nous proposons un mécanisme additionnel pour expliquer cet allongement faisant intervenir les courants lents de repolarisation.

VIII. CONCLUSION

Ce travail de thèse nous a permis de mettre au point des outils de travail, d'acquérir des compétences dans le traitement de données de génotypage et de séquençage, d'appréhender l'analyse des modèles d'interaction gène environnement, de discuter les résultats confrontés aux données de la littérature et de dégager des hypothèses physiopathologiques intéressantes qui seront mis à profit dans l'analyse de nos cohortes et dans la mise en place de futurs projets de recherche.

L'étude de la pharmacologie de la méthadone sera un de nos axes de recherches futures sachant la grande variabilité de la réponse à ce traitement, ceci afin de proposer des recommandations cliniques plus pertinentes.

Quant à la compréhension des effets de la cocaïne, elle nous permettra de constituer des populations cliniques plus homogènes afin de proposer des prises en charge plus personnalisée dans un domaine où les options thérapeutiques sont rares.

IX. Bibliographie

- Aberg, K., Adkins, D.E., Liu, Y., McClay, J.L., Bukszár, J., Jia, P., Zhao, Z., Perkins, D., Stroup, T.S., Lieberman, J.A., Sullivan, P.F., van den Oord, E.J.C.G., 2012. Genome-wide association study of antipsychotic-induced QTc interval prolongation. *Pharmacogenomics J.* 12, 165–172. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.76>
- Agrawal, A., Verweij, K.J.H., Gillespie, N.A., Heath, A.C., Lessov-Schlaggar, C.N., Martin, N.G., Nelson, E.C., Slutske, W.S., Whitfield, J.B., Lynskey, M.T., 2012. The genetics of addiction—a translational perspective. *Transl. Psychiatry* 2, e140. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.54>
- Ahmad, T., Valentovic, M.A., Rankin, G.O., 2018. Effects of cytochrome P450 single nucleotide polymorphisms on methadone metabolism and pharmacodynamics. *Biochem. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.020>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Alford, D.P., Compton, P., Samet, J.H., 2006. Acute Pain Management for Patients Receiving Maintenance Methadone or Buprenorphine Therapy. *Ann. Intern. Med.* 144, 127–134.
- Alinejad, S., Kazemi, T., Zamani, N., Hoffman, R.S., Mehrpour, O., 2015. A systematic review of the cardiotoxicity of methadone. *EXCLI J.* 14, 577–600. <https://doi.org/10.17179/excli2015-553>
- Amato, L., Davoli, M., Perucci, C.A., Ferri, M., Faggiano, F., Mattick, R.P., 2005. An overview of systematic reviews of the effectiveness of opiate maintenance therapies: available evidence to inform clinical practice and research. *J. Subst. Abuse Treat.* 28, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2005.02.007>
- American psychiatric association., 2004. DSM-IV-TR, 4e édition, texte révisé. ed. Masson, Issy-les-Moulineaux.
- Anderson, C.A., Pettersson, F.H., Clarke, G.M., Cardon, L.R., Morris, A.P., Zondervan, K.T., 2010. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat. Protoc.* 5, 1564–1573. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.116>
- ANSM, 2014. Commission des stupéfiants et psychotropes. Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.
- Balistreri, C.R., Colonna-Romano, G., Lio, D., Candore, G., Caruso, C., 2009. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. *J. Clin. Immunol.* 29, 406–415. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9297-5>
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21, 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
- Bartlett, E., Hallin, A., Chapman, B., Angrist, B., 1997. Selective sensitization to the psychosis-inducing effects of cocaine: a possible marker for addiction relapse vulnerability? *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 16, 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00164-9)
- Beck, F., Richard, J.-B., Guignard, R., Le Nézet, O., Spilka, S., 2015. Les niveaux d'usage des drogues en France en 2014, exploitation des données du Baromètre santé 2014 (No. 99), Tendances. OFDT, observatoire Français des drogues et toxicomanies.
- Bellivier, F., Nosten-Bertrand, M., Leboyer, M., 1998. Génétique et psychiatrie : à la recherche de phénotypes. *MS Médecine Sci. Rev. Pap.* ISSN 0767-0974 1998 Vol 14 N° 12 P1406-12. <https://doi.org/10.4267/10608/983>
- Belsky, D.W., Moffitt, T.E., Baker, T.B., Biddle, A.K., Evans, J.P., Harrington, H., Houts, R., Meier, M., Sugden, K., Williams, B., Poulton, R., Caspi, A., 2013. Polygenic risk accelerates the developmental progression to heavy, persistent smoking and nicotine dependence: Evidence from a 4-Decade Longitudinal Study. *JAMA Psychiatry Chic. Ill* 70, 534–542. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.736>
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamales, M., Hervé, D., Valjent, E., Girault, J.-A., 2008. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5671–5685. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1039-08.2008>

- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pagès, C., Heck, N., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2011. Alterations of Molecular and Behavioral Responses to Cocaine by Selective Inhibition of Elk-1 Phosphorylation. *J. Neurosci.* 31, 14296–14307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2890-11.2011>
- Bienvenu, O.J., Davydow, D.S., Kendler, K.S., 2011. Psychiatric “diseases” versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychol. Med.* 41, 33–40. <https://doi.org/10.1017/S003329171000084X>
- Bierut, L.J., Dinwiddie, S.H., Begleiter, H., Crowe, R.R., Hesselbrock, V., Nurnberger, J.I., Porjesz, B., Schuckit, M.A., Reich, T., 1998. Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 982–988.
- Bland, S.T., Hutchinson, M.R., Maier, S.F., Watkins, L.R., Johnson, K.W., 2009. The glial activation inhibitor AV411 reduces morphine-induced nucleus accumbens dopamine release. *Brain. Behav. Immun.* 23, 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.01.014>
- Boardman, J.D., 2009. State-level moderation of genetic tendencies to smoke. *Am. J. Public Health* 99, 480–486. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.134932>
- Bonaldi, C., Andriantafika, F., Chyderiotis, S., Boussac-Zarebska, M., Cao, B., Benmarhnia, T., Isabelle Gremy, 2016. Les décès attribuables au tabagisme en France. Dernières estimations et tendance, années 2000 à 2013. *Bull. Épidémiologique Hebd.* 30–31, 528–40.
- Borroni, B., Grassi, M., Costanzi, C., Zanetti, M., Archetti, S., Franzoni, S., Caimi, L., Padovani, A., 2007. Haplotypes in catechol-O-methyltransferase gene confer increased risk for psychosis in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 28, 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.027>
- Borsari, B., Carey, K.B., 2006. How the quality of peer relationships influences college alcohol use. *Drug Alcohol Rev.* 25, 361–370. <https://doi.org/10.1080/09595230600741339>
- Brady, K.T., Lydiard, R.B., Malcolm, R., Ballenger, J.C., 1991. Cocaine-induced psychosis. *J. Clin. Psychiatry* 52, 509–512.
- Brady, K.T., Sonne, S., Randall, C.L., Adinoff, B., Malcolm, R., 1995. Features of cocaine dependence with concurrent alcohol abuse. *Drug Alcohol Depend.* 39, 69–71.
- Breunis, M.N., Kupka, R.W., Nolen, W.A., Suppes, T., Denicoff, K.D., Leverich, G.S., Post, R.M., Drexhage, H.A., 2003. High numbers of circulating activated T cells and raised levels of serum IL-2 receptor in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 53, 157–165.
- Brisacier, A.-C., 2017. Traitements de substitution aux opiacés. Tableau Bord - OFDT.
- Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., Bonci, A., 2012. Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron* 76, 790–803. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.040>
- Brousse, G., Vorspan, F., Ksouda, K., Bloch, V., Peoc’h, K., Laplanche, J.L., Mouly, S., Schmidt, J., Llorca, P.M., Lepine, J.P., 2010. Could the inter-individual variability in cocaine-induced psychotic effects influence the development of cocaine addiction? Towards a new pharmacogenetic approach to addictions. *Med. Hypotheses* 75, 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2010.07.043>
- Cadore, R.J., Troughton, E., O’Gorman, T.W., Heywood, E., 1986. An adoption study of genetic and environmental factors in drug abuse. *Arch. Gen. Psychiatry* 43, 1131–1136.
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014. D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol. Psychiatry* 19, 1295–1304. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.73>
- Caprioli, D., Celentano, M., Paolone, G., Badiani, A., 2007. Modeling the role of environment in addiction. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, Sensitization, drug addiction and psychopathology in animals and humans* 31, 1639–1653. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.08.029>
- Carey, C.E., Agrawal, A., Bucholz, K.K., Hartz, S.M., Lynskey, M.T., Nelson, E.C., Bierut, L.J., Bogdan, R., 2016. Associations between Polygenic Risk for Psychiatric Disorders and Substance Involvement. *Front. Genet.* 7, 149. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00149>
- Carlquist, J.F., Moody, D.E., Knight, S., Johnson, E.G., Fang, W.B., Huntinghouse, J.A., Rollo, J.S., Webster, L.R., Anderson, J.L., 2015. A Possible Mechanistic Link Between the CYP2C19 Genotype, the Methadone Metabolite Ethylidene-1,5-Dimethyl-3,3-Diphenylpyrrolidene (EDDP), and Methadone-Induced Corrected

- QT Interval Prolongation in a Pilot Study. *Mol. Diagn. Ther.* 19, 131–138. <https://doi.org/10.1007/s40291-015-0137-4>
- Carney, C.P., Jones, L.E., 2006. Medical comorbidity in women and men with bipolar disorders: a population-based controlled study. *Psychosom. Med.* 68, 684–691. <https://doi.org/10.1097/01.psy.0000237316.09601.88>
- Caspi, A., Moffitt, T.E., Cannon, M., McClay, J., Murray, R., Harrington, H., Taylor, A., Arseneault, L., Williams, B., Braithwaite, A., Poulton, R., Craig, I.W., 2005. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol. Psychiatry* 57, 1117–1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.026>
- Castañero-Rodríguez, N., Kaakoush, N.O., Pardo, A.L., Goh, K.-L., Fock, K.M., Mitchell, H.M., 2014. Genetic polymorphisms in the Toll-like receptor signalling pathway in *Helicobacter pylori* infection and related gastric cancer. *Hum. Immunol.* 75, 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.06.001>
- Chang Yan, Fang Wenfang B., Lin Shen-Nan, Moody David E., 2010. Stereo-Selective Metabolism of Methadone by Human Liver Microsomes and cDNA-Expressed Cytochrome P450s: A Reconciliation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 108, 55–62. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00628.x>
- Chen, B., Cole, J.W., Grond-Ginsbach, C., 2017. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front. Genet.* 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00167>
- Chiara, G.D., Imperato, A., 1988. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 5274–5278. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Chou, R., Weimer, M.B., Dana, T., 2014. Methadone Overdose and Cardiac Arrhythmia Potential: Findings From a Review of the Evidence for an American Pain Society and College on Problems of Drug Dependence Clinical Practice Guideline. *J. Pain* 15, 338–365. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.01.495>
- Cloninger, C.R., Bohman, M., Sigvardsson, S., von Knorring, A.L., 1985. Psychopathology in adopted-out children of alcoholics. The Stockholm Adoption Study. *Recent Dev. Alcohol. Off. Publ. Am. Med. Soc. Alcohol. Res. Soc. Alcohol. Natl. Council. Alcohol.* 3, 37–51.
- Cohen, J., 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, 2nd ed. ed. L. Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J.
- Coller, J.K., Hutchinson, M.R., 2012. Implications of central immune signaling caused by drugs of abuse: mechanisms, mediators and new therapeutic approaches for prediction and treatment of drug dependence. *Pharmacol. Ther.* 134, 219–245. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.01.008>
- Crews, F.T., Zou, J., Qin, L., 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain. Behav. Immun.* 25 Suppl 1, S4–S12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.003>
- Crotti, L., Celano, G., Dagradi, F., Schwartz, P.J., 2008. Congenital long QT syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 3, 18. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-18>
- Cubells, J.F., Feinn, R., Pearson, D., Burda, J., Tang, Y., Farrer, L.A., Gelernter, J., Kranzler, H.R., 2005. Rating the severity and character of transient cocaine-induced delusions and hallucinations with a new instrument, the Scale for Assessment of Positive Symptoms for Cocaine-Induced Psychosis (SAPS-CIP). *Drug Alcohol Depend.* 80, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2005.03.019>
- Cubells, J.F., Kranzler, H.R., McCance-Katz, E., Anderson, G.M., Malison, R.T., Price, L.H., Gelernter, J., 2000. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol. Psychiatry* 5, 56–63.
- Deborde, T., Brisacier, A.-C., 2016. Les décès par surdose en France - État des lieux et comparaisons européennes. OFDT, observatoire Français des drogues et toxicomanies.
- Derks, E.M., Zwinderman, A.H., Gamazon, E.R., 2017. The Relation Between Inflation in Type-I and Type-II Error Rate and Population Divergence in Genome-Wide Association Analysis of Multi-Ethnic Populations. *Behav. Genet.* 47, 360–368. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9837-3>
- Derlet, R.W., Albertson, T.E., 1989. Emergency department presentation of cocaine intoxication. *Ann. Emerg. Med.* 18, 182–186. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(89\)80111-8](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(89)80111-8)
- Dhossche, D., Ferdinand, R., Van der Ende, J., Hofstra, M.B., Verhulst, F., 2002. Diagnostic outcome of self-reported hallucinations in a community sample of adolescents. *Psychol. Med.* 32, 619–627.

- Dole, V.P., Joseph, H., 1978. Long-Term Outcome of Patients Treated with Methadone Maintenance*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 311, 181–196. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1978.tb16775.x>
- Dole, V.P., Nyswander, M., 1965. A Medical Treatment for Diacetylmorphine (Heroin) Addiction: A Clinical Trial With Methadone Hydrochloride. *JAMA* 193, 646–650. <https://doi.org/10.1001/jama.1965.03090080008002>
- Doz, E., Noulin, N., Boichot, E., Guénon, I., Fick, L., Bert, M.L., Lagente, V., Ryffel, B., Schnyder, B., Quesniaux, V.F.J., Couillin, I., 2008. Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 Signaling Dependent. *J. Immunol.* 180, 1169–1178. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.1169>
- Ducci, F., Goldman, D., 2012. The Genetic Basis of Addictive Disorders. *Psychiatr. Clin. North Am.* 35, 495–519. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2012.03.010>
- Eap, C.B., Buclin, T., Baumann, P., 2002. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin. Pharmacokinet.* 41, 1153–1193. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241140-00003>
- Eap, C.B., Crettol, S., Rougier, J.-S., Schläpfer, J., Sintra Grilo, L., Déglon, J.-J., Besson, J., Croquette-Krokar, M., Carrupt, P.-A., Abriel, H., 2007. Stereoselective Block of hERG Channel by (S)-Methadone and QT Interval Prolongation in CYP2B6 Slow Metabolizers. *Clin. Pharmacol. Ther.* 81, 719–728. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100120>
- Ehret, G.B., Voide, C., Gex-Fabry, M., Chabert, J., Shah, D., Broers, B., Piguet, V., Musset, T., Gaspoz, J.-M., Perrier, A., Dayer, P., Desmeules, J.A., 2006. Drug-Induced Long QT Syndrome in Injection Drug Users Receiving Methadone: High Frequency in Hospitalized Patients and Risk Factors. *Arch. Intern. Med.* 166, 1280–1287. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.12.1280>
- Elliot, E.E., 2002. Cocaine sensitization in the mouse using a cumulative dosing regime. *Behav. Pharmacol.* 13, 407–415.
- EMCDDA, 2017. European Drug Report. Trends and Developments. 2017.
- Enserink, J.M., Kolodner, R.D., 2010. An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div.* 5, 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-11>
- Fagerström, K.O., Kunze, M., Schoberberger, R., Breslau, N., Hughes, J.R., Hurt, R.D., Puska, P., Ramström, L., Zatoński, W., 1996. Nicotine dependence versus smoking prevalence: comparisons among countries and categories of smokers. *Tob. Control* 5, 52–56.
- Fan, Y., Wu, Y., Liu, H., Yu, Y., Jiang, Y., Xue, Y., Liu, Z., Wei, M.-X., 2014. TLR4 polymorphisms associated with developing gastric pre-cancer lesions in a Chinese Han population. *Hum. Immunol.* 75, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2013.11.002>
- Fanoë, S., Hvidt, C., Ege, P., Jensen, G.B., 2007. Syncope and QT prolongation among patients treated with methadone for heroin dependence in the city of Copenhagen. *Heart* 93, 1051–1055. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.100180>
- Fareed, A., Vayalapalli, S., Scheinberg, K., Gale, R., Casarella, J., Drexler, K., 2013. QTc interval prolongation for patients in methadone maintenance treatment: a five years follow-up study. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 39, 235–240. <https://doi.org/10.3109/00952990.2013.804525>
- Flórez-Salamanca, L., Secades-Villa, R., Hasin, D.S., Cottler, L., Wang, S., Grant, B.F., Blanco, C., 2013. Probability and predictors of transition from abuse to dependence on alcohol, cannabis, and cocaine: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 39, 168–179. <https://doi.org/10.3109/00952990.2013.772618>
- Floyd, A.G., Boutros, N.N., Struve, F.A., Wolf, E., Oliwa, G.M., 2006. Risk factors for experiencing psychosis during cocaine use: a preliminary report. *J. Psychiatr. Res.* 40, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2005.05.001>
- Frank, J., Cichon, S., Treutlein, J., Ridinger, M., Mattheisen, M., Hoffmann, P., Herms, S., Wodarz, N., Soyka, M., Zill, P., Maier, W., Mössner, R., Gaebel, W., Dahmen, N., Scherbaum, N., Schmä, C., Steffens, M., Lucae, S., Ising, M., Müller-Myhsok, B., Nöthen, M.M., Mann, K., Kiefer, F., Rietschel, M., 2012. Genome-Wide Significant Association between Alcohol Dependence and a Variant in the ADH Gene Cluster. *Addict. Biol.* 17, 171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00395.x>
- Freitag, C.M., 2007. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol. Psychiatry* 12, 2–22. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001896>

- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J., Altshuler, D., 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225–2229. <https://doi.org/10.1126/science.1069424>
- Gelernter, J., Kranzler, H.R., Satel, S.L., Rao, P.A., 1994. Genetic Association between Dopamine Transporter Protein Alleles and Cocaine-Induced Paranoia. *Neuropsychopharmacology* 11, 195–200. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1380106>
- Gelernter, J., Kranzler, H.R., Sherva, R., Almasy, L., Koesterer, R., Smith, A.H., Anton, R., Preuss, U.W., Ridinger, M., Rujescu, D., Wodarz, N., Zill, P., Zhao, H., Farrer, L.A., 2014a. Genome-wide association study of alcohol dependence: significant findings in African- and European-Americans including novel risk loci. *Mol. Psychiatry* 19, 41–49. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.145>
- Gelernter, J., Sherva, R., Koesterer, R., Almasy, L., Zhao, H., Kranzler, H.R., Farrer, L., 2014b. Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol. Psychiatry* 19, 717–723. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.99>
- Gelernter, J., Sherva, R., Koesterer, R., Almasy, L., Zhao, H., Kranzler, H.R., Farrer, L., 2014c. Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol. Psychiatry* 19, 717–723. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.99>
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Sibley, D.R., 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429–1432.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Goldman, D., Oroszi, G., Ducci, F., 2005. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat. Rev. Genet.* 6, 521–532. <https://doi.org/10.1038/nrg1635>
- Goldstein, B.I., Kemp, D.E., Soczynska, J.K., McIntyre, R.S., 2009. Inflammation and the Phenomenology, Pathophysiology, Comorbidity, and Treatment of Bipolar Disorder: A Systematic Review of the Literature. *J. Clin. Psychiatry* 70, 1078–1090. <https://doi.org/10.4088/JCP.08r04505>
- González-Castro, T.B., Hernández-Díaz, Y., Juárez-Rojop, I.E., López-Narváez, M.L., Tovilla-Zárate, C.A., Fresan, A., 2016. The Role of a Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Val158Met Genetic Polymorphism in Schizophrenia: A Systematic Review and Updated Meta-analysis on 32,816 Subjects. *Neuromolecular Med.* 18, 216–231. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8392-z>
- Goodwin, D.W., Schulsinger, F., Hermansen, L., Guze, S.B., Winokur, G., 1973. Alcohol Problems in Adoptees Raised Apart From Alcoholic Biological Parents. *Arch. Gen. Psychiatry* 28, 238–243. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1973.01750320068011>
- Grant, B.F., Stinson, F.S., Hasin, D.S., Dawson, D.A., Chou, S.P., Ruan, W.J., Huang, B., 2005. Prevalence, correlates, and comorbidity of bipolar I disorder and axis I and II disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *J. Clin. Psychiatry* 66, 1205–1215.
- Gupta, M., Bhatnagar, P., Grover, S., Kaur, H., Baghel, R., Bhasin, Y., Chauhan, C., Verma, B., Manduva, V., Mukherjee, O., Purushottam, M., Sharma, A., Jain, S., Brahmachari, S.K., Kukreti, R., 2009. Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment. *Pharmacogenomics* 10, 385–397. <https://doi.org/10.2217/14622416.10.3.385>
- Gurriarán, X., Rodríguez-López, J., Flórez, G., Pereiro, C., Fernández, J.M., Fariñas, E., Estévez, V., Arrojo, M., Costas, J., GenPol Study Group, 2018. Relationships between substance abuse/dependence and psychiatric disorders based on polygenic scores. *Genes Brain Behav.* e12504. <https://doi.org/10.1111/gbb.12504>
- Haber, S.N., 2016. Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 7–21.
- Haile, C.N., Kosten, T.R., Kosten, T.A., 2009. Pharmacogenetic treatments for drug addiction: cocaine, amphetamine and methamphetamine. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 35, 161–177. <https://doi.org/10.1080/00952990902825447>
- Hajj, A., Ksouda, K., Peoc'h, K., Curis, E., Messali, A., Deveaux, L.L., Bloch, V., Prince, N., Mouly, S., Scherrmann, J.-M., Lépine, J.-P., Laplanche, J.-L., Drici, M.-D., Vorspan, F., 2014. KCNH2 polymorphism and methadone dosage interact to enhance QT duration. *Drug Alcohol Depend.* 141, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.04.027>

- Hamdani, N., Tamouza, R., Leboyer, M., 2012. Immuno-inflammatory markers of bipolar disorder: a review of evidence. *Front. Biosci. Elite Ed.* 4, 2170–2182.
- Harris, J.E., Baldessarini, R.J., 1973. Uptake of [3H]-catecholamines by homogenates of rat corpus striatum and cerebral cortex: Effects of amphetamine analogues. *Neuropharmacology* 12, 669–679. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(73\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0028-3908(73)90120-2)
- Hart, A.B., Kranzler, H.R., 2015. Alcohol dependence genetics: Lessons learned from genome-wide association studies (GWAS) and post-GWAS analyses. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39, 1312–1327. <https://doi.org/10.1111/acer.12792>
- Hayes, J.F., Miles, J., Walters, K., King, M., Osborn, D.P.J., 2015. A systematic review and meta-analysis of premature mortality in bipolar affective disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 131, 417–425. <https://doi.org/10.1111/acps.12408>
- Heatherton, T.F., Kozlowski, L.T., Frecker, R.C., Fagerström, K.O., 1991. The Fagerström Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *Br. J. Addict.* 86, 1119–1127.
- Heffner, J.L., DelBello, M.P., Fleck, D.E., Anthenelli, R.M., Strakowski, S.M., 2008. Cigarette smoking in the early course of bipolar disorder: association with ages-at-onset of alcohol and marijuana use. *Bipolar Disord.* 10, 838–845. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2008.00630.x>
- Heffner, J.L., Strawn, J.R., DelBello, M.P., Strakowski, S.M., Anthenelli, R.M., 2011. The Co-occurrence of Cigarette Smoking and Bipolar Disorder: Phenomenology and Treatment Considerations. *Bipolar Disord.* 13, 439–453. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2011.00943.x>
- Hendrie, H.C., Lindgren, D., Hay, D.P., Lane, K.A., Gao, S., Purnell, C., Munger, S., Smith, F., Dickens, J., Boustani, M.A., Callahan, C.M., 2013. Comorbidity Profile and Healthcare Utilization in Elderly Patients with Serious Mental Illnesses. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 21, 1267–1276. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2013.01.056>
- HGNC database of human gene names | HUGO Gene Nomenclature Committee [WWW Document], n.d. URL <https://www.genenames.org/> (accessed 7.25.18).
- Hu, S.X., Sui, H.X., Jin, H.J., Ni, X.Y., Liu, X.X., Xue, M.Q., Zhang, Y., Gao, F.G., 2012. Lipopolysaccharide and dose of nicotine determine the effects of nicotine on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Mol. Med. Rep.* 5, 1005–1010. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.751>
- Huang, H., Wu, J., Jin, G., Zhang, H., Ding, Y., Hua, Z., Zhou, Y., Xue, Y., Lu, Y., Hu, Z., Xu, Y., Shen, H., 2010. A 5'-flanking region polymorphism in toll-like receptor 4 is associated with gastric cancer in a Chinese population. *J. Biomed. Res.* 24, 100–106. [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(10\)60017-6](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(10)60017-6)
- Hughes, J.R., Helzer, J.E., Lindberg, S.A., 2006. Prevalence of DSM/ICD-defined nicotine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 85, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.04.004>
- Hwang, Y.-H., Ro, H., Choi, I., Kim, H., Oh, K.-H., Hwang, J.-I., Park, M.H., Kim, S., Yang, J., Ahn, C., 2009. Impact of polymorphisms of TLR4/CD14 and TLR3 on acute rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 88, 699–705. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b2f34a>
- Icick, R., Gard, S., Barde, M., Carminati, M., Desage, A., Guillaume, S., Scott, J., Bellivier, F., FondaMental Advanced Centers of Expertise in Bipolar Disorders (FACE-BD) Collaborators, 2017. Physical and mental health burden in cases of bipolar disorder classified as current, former, or non-tobacco smokers. *J. Affect. Disord.* 208, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2016.09.022>
- Infinium PsychArray-24 Kit | Psychiatric predisposition microarray [WWW Document], n.d. URL <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-psycharray.html> (accessed 7.25.18).
- Ittiwut, R., Listman, J.B., Ittiwut, C., Cubells, J.F., Weiss, R.D., Brady, K., Oslin, D., Farrer, L.A., Kranzler, H.R., Gelernter, J., 2011. Association between polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and cocaine-induced paranoia in European-American and African-American populations. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31205>
- Jin, B., Sun, T., Yu, X.-H., Yang, Y.-X., Yeo, A.E.T., 2012. The Effects of TLR Activation on T-Cell Development and Differentiation. *Clin. Dev. Immunol.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/836485>
- Johnston, I.N., Milligan, E.D., Wieseler-Frank, J., Frank, M.G., Zapata, V., Campisi, J., Langer, S., Martin, D., Green, P., Fleshner, M., Leinwand, L., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2004. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7353–7365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1850-04.2004>

- Kääb, S., Crawford, D.C., Sinner, M.F., Behr, E.R., Kannankeril, P.J., Wilde, A.A.M., Bezzina, C.R., Schulze-Bahr, E., Guicheney, P., Bishopric, N.H., Myerburg, R.J., Schott, J.-J., Pfeufer, A., Beckmann, B.-M., Martens, E., Zhang, T., Stallmeyer, B., Zumhagen, S., Denjoy, I., Bardai, A., Gelder, I.C.V., Jamshidi, Y., Dalageorgou, C., Marshall, V., Jeffery, S., Shakir, S., Camm, A.J., Steinbeck, G., Perz, S., Lichtner, P., Meitinger, T., Peters, A., Wichmann, H.-E., Ingram, C., Bradford, Y., Carter, S., Norris, K., Ritchie, M.D., George, A.L., Roden, D.M., 2012. A Large Candidate Gene Survey Identifies the KCNE1 D85N Polymorphism as a Possible Modulator of Drug-Induced Torsades de Pointes. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 5, 91–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.111.960930>
- Kalayasiri, R., Gelernter, J., Farrer, L., Weiss, R., Brady, K., Gueorguieva, R., Kranzler, H.R., Malison, R.T., 2010. Adolescent cannabis use increases risk for cocaine-induced paranoia. *Drug Alcohol Depend.* 107, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.10.006>
- Kalayasiri, R., Kranzler, H.R., Weiss, R., Brady, K., Gueorguieva, R., Panhuysen, C., Yang, B.-Z., Farrer, L., Gelernter, J., Malison, R.T., 2006a. Risk factors for cocaine-induced paranoia in cocaine-dependent sibling pairs. *Drug Alcohol Depend.* 84, 77–84. <https://doi.org/doi: DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2005.12.002>
- Kalayasiri, R., Sughondhabiro, A., Gueorguieva, R., Coric, V., Lynch, W.J., Morgan, P.T., Cubells, J.F., Malison, R.T., 2006b. Self-reported paranoia during laboratory “binge” cocaine self-administration in humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.02.005>
- Kalivas, P.W., 2009. The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561–572. <https://doi.org/10.1038/nrn2515>
- Kao, D., Bartelson, B.B., Khatri, V., Dart, R., Mehler, P.S., Katz, D., Krantz, M.J., 2013. Trends in Reporting Methadone-Associated Cardiac Arrhythmia, 1997–2011. *Ann. Intern. Med.* 158, 735–740. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-10-201305210-00008>
- Karila, L., Reynaud, M., 2008. Facteurs de risque et de vulnérabilité, in: *Traité d’addictologie*. Flammarion, Paris, pp. 43–46.
- Katchman, A.N., McGroary, K.A., Kilborn, M.J., Kornick, C.A., Manfredi, P.L., Woosley, R.L., Ebert, S.N., 2002. Influence of Opioid Agonists on Cardiac Human Ether-a-go-go-related Gene K⁺ Currents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 688–694. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.038240>
- Kendler, K.S., Davis, C.G., Kessler, R.C., 1997. The familial aggregation of common psychiatric and substance use disorders in the National Comorbidity Survey: a family history study. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 170, 541–548.
- Khanna, A., Guo, M., Mehra, M., Royal, W., 2013. Inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in Lewis rat brains. *J. Neuroimmunol.* 254, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.09.006>
- Kilbourne, A.M., Morden, N.E., Austin, K., Ilgen, M., McCarthy, J.F., Dalack, G., Blow, F.C., 2009. Excess heart-disease-related mortality in a national study of patients with mental disorders: identifying modifiable risk factors. *Gen. Hosp. Psychiatry* 31, 555–563. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2009.07.008>
- Kim, S.J., Lee, H.J., Koo, H.G., Kim, J.W., Song, J.Y., Kim, M.K., Shin, D.H., Jin, S.Y., Hong, M.S., Park, H.J., Yoon, S.H., Park, H.K., Chung, J.-H., 2004. Impact of IL-1 receptor antagonist gene polymorphism on schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatr. Genet.* 14, 165–167.
- Kim, Y.-K., Myint, A.-M., Lee, B.-H., Han, C.-S., Lee, S.-W., Leonard, B.E., Steinbusch, H.W.M., 2004. T-helper types 1, 2, and 3 cytokine interactions in symptomatic manic patients. *Psychiatry Res.* 129, 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.08.005>
- Kim, Y.-K., Na, K.-S., Shin, K.-H., Jung, H.-Y., Choi, S.-H., Kim, J.-B., 2007. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31, 1044–1053. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.03.004>
- Kobus, K., 2003. Peers and adolescent smoking. *Addict. Abingdon Engl.* 98 Suppl 1, 37–55.
- Krantz, M.J., Kutinsky, I.B., Robertson, A.D., Mehler, P.S., 2003. Dose-related effects of methadone on QT prolongation in a series of patients with torsade de pointes. *Pharmacotherapy* 23, 802–805.
- Krantz, M.J., Martin, J., Stimmel, B., Mehta, D., Haigney, M.C.P., 2009. QTc interval screening in methadone treatment. *Ann. Intern. Med.* 150, 387–395.
- Kutikhin, A.G., 2011. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. *Hum. Immunol.* 72, 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.11.003>

- Lala, S.V., Sajatovic, M., 2012. Medical and Psychiatric Comorbidities Among Elderly Individuals With Bipolar Disorder A Literature Review. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 25, 20–25. <https://doi.org/10.1177/0891988712436683>
- Lasser, K., Boyd, J.W., Woolhandler, S., Himmelstein, D.U., McCormick, D., Bor, D.H., 2000a. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 284, 2606–2610.
- Lasser, K., Boyd, J.W., Woolhandler, S., Himmelstein, D.U., McCormick, D., Bor, D.H., 2000b. Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 284, 2606–2610.
- Leboyer, M., Soreca, I., Scott, J., Frye, M., Henry, C., Tamouza, R., Kupfer, D.J., 2012. Can bipolar disorder be viewed as a multi-system inflammatory disease? *J. Affect. Disord.* 141, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2011.12.049>
- Ledeboer, A., Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., Johnson, K.W., 2007. Ibutilast (AV-411). A new class therapeutic candidate for neuropathic pain and opioid withdrawal syndromes. *Expert Opin. Investig. Drugs* 16, 935–950. <https://doi.org/10.1517/13543784.16.7.935>
- Li, M.D., Cheng, R., Ma, J.Z., Swan, G.E., 2003. A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addict. Abingdon Engl.* 98, 23–31.
- Lichlyter, B., Purdon, S., Tibbo, P., 2011. Predictors of psychosis severity in individuals with primary stimulant addictions. *Addict. Behav.* 36, 137–139. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2010.08.019>
- Lieberman, J.A., Kinon, B.J., Loebel, A.D., 1990. Dopaminergic mechanisms in idiopathic and drug-induced psychoses. *Schizophr. Bull.* 16, 97–110.
- Liu, J., Rädler, D., Illi, S., Klucker, E., Turan, E., von Mutius, E., Kabesch, M., Schaub, B., 2011. TLR2 polymorphisms influence neonatal regulatory T cells depending on maternal atopy: TLR2 polymorphisms influence neonatal regulatory T cells. *Allergy* 66, 1020–1029. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02573.x>
- Liu, J.Z., Tozzi, F., Waterworth, D.M., Pillai, S.G., Muglia, P., Middleton, L., Berrettini, W., Knouff, C.W., Yuan, X., Waeber, G., Vollenweider, P., Preisig, M., Wareham, N.J., Zhao, J.H., Loos, R.J.F., Barroso, I., Khaw, K.-T., Grundy, S., Barter, P., Mahley, R., Kesaniemi, A., McPherson, R., Vincent, J.B., Strauss, J., Kennedy, J.L., Farmer, A., McGuffin, P., Day, R., Matthews, K., Bakke, P., Gulsvik, A., Lucae, S., Ising, M., Brueckl, T., Horstmann, S., Wichmann, H.-E., Rawal, R., Dahmen, N., Lamina, C., Polasek, O., Zgaga, L., Huffman, J., Campbell, S., Kooner, J., Chambers, J.C., Burnett, M.S., Devaney, J.M., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L., Lindsay, J.M., Waksman, R., Epstein, S., Wilson, J.F., Wild, S.H., Campbell, H., Vitart, V., Reilly, M.P., Li, M., Qu, L., Wilensky, R., Matthai, W., Hakonarson, H.H., Rader, D.J., Franke, A., Wittig, M., Schäfer, A., Uda, M., Terracciano, A., Xiao, X., Busonero, F., Scheet, P., Schlessinger, D., Clair, D.S., Rujescu, D., Abecasis, G.R., Grabe, H.J., Teumer, A., Völzke, H., Petersmann, A., John, U., Rudan, I., Hayward, C., Wright, A.F., Kolcic, I., Wright, B.J., Thompson, J.R., Balmforth, A.J., Hall, A.S., Samani, N.J., Anderson, C.A., Ahmad, T., Mathew, C.G., Parkes, M., Satsangi, J., Caulfield, M., Munroe, P.B., Farrall, M., Dominiczak, A., Worthington, J., Thomson, W., Eyre, S., Barton, A., Consortium, T.W.T.C.C., Mooser, V., Francks, C., Marchini, J., 2010. Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat. Genet.* 42, 436–440. <https://doi.org/10.1038/ng.572>
- Lohoff, F.W., Weller, A.E., Bloch, P.J., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Berrettini, W.H., 2008. Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 33, 3078–3084. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.126>
- Lopez-Quintero, C., Pérez de los Cobos, J., Hasin, D.S., Okuda, M., Wang, S., Grant, B.F., Blanco, C., 2011. Probability and predictors of transition from first use to dependence on nicotine, alcohol, cannabis, and cocaine: results of the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *Drug Alcohol Depend.* 115, 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2010.11.004>
- Maes, T., Bracke, K.R., Joos, G.F., Brusselle, G.G., 2008. Comment on “Cigarette Smoke-Induced Pulmonary Inflammation Is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 Signaling Dependent.” *J. Immunol.* 180, 5761–5761. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5761>
- Mahoney, J.J., 3rd, Hawkins, R.Y., De La Garza, R., 2nd, Kalechstein, A.D., Newton, T.F., 2010. Relationship between gender and psychotic symptoms in cocaine-dependent and methamphetamine-dependent participants. *Gen. Med.* 7, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.genm.2010.09.003>

- Marees, A.T., de Kluiver, H., Stringer, S., Vorspan, F., Curis, E., Marie-Claire, C., Derks, E.M., 2018. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 27. <https://doi.org/10.1002/mpr.1608>
- Mathers, C., World Health Organization, 2012. WHO global report mortality attributable to tobacco. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Mattick, R.P., Breen, C., Kimber, J., Davoli, M., 2014. Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. *Cochrane Libr.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002207.pub4>
- Mayet, S., Gossop, M., Lintzeris, N., Markides, V., Strang, J., 2011. Methadone maintenance, QTc and torsade de pointes: Who needs an electrocardiogram and what is the prevalence of QTc prolongation? *Drug Alcohol Rev.* 30, 388–396. <https://doi.org/10.1111/j.1465-3362.2010.00237.x>
- McClave, A.K., McKnight-Eily, L.R., Davis, S.P., Dube, S.R., 2010. Smoking characteristics of adults with selected lifetime mental illnesses: results from the 2007 National Health Interview Survey. *Am. J. Public Health* 100, 2464–2472. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2009.188136>
- McEachin, R.C., Saccone, N.L., Saccone, S.F., Kleyman-Smith, Y.D., Kar, T., Kare, R.K., Ade, A.S., Sartor, M.A., Cavalcoli, J.D., McInnis, M.G., 2010. Modeling complex genetic and environmental influences on comorbid bipolar disorder with tobacco use disorder. *BMC Med. Genet.* 11, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-14>
- Merikangas, K.R., Stolar, M., Stevens, D.E., Goulet, J., Preisig, M.A., Fenton, B., Zhang, H., O'Malley, S.S., Rounsaville, B.J., 1998. Familial transmission of substance use disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 55, 973–979.
- Metzger, D.S., Woody, G.E., McLellan, A.T., O'Brien, C.P., Druley, P., Navaline, H., DePhilippis, D., Stolley, P., Abrutyn, E., 1993. Human immunodeficiency virus seroconversion among intravenous drug users in- and out-of-treatment: an 18-month prospective follow-up. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 1049–1056.
- Midanik, L., 1983. Familial alcoholism and problem drinking in a national drinking practices survey. *Addict. Behav.* 8, 133–141.
- Milaniak, I., Watson, B., Jaffee, S.R., 2015. Gene-Environment Interplay and Substance Use: A Review of Recent Findings. *Curr. Addict. Rep.* 2, 364–371. <https://doi.org/10.1007/s40429-015-0069-4>
- Miller, B.C., Fan, X., Christensen, M., Grotevant, H.D., van Dulmen, M., 2000. Comparisons of adopted and nonadopted adolescents in a large, nationally representative sample. *Child Dev.* 71, 1458–1473.
- Miller, C.A., Marshall, J.F., 2005. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47, 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.006>
- Minică, C.C., Verweij, K.J.H., van der Most, P.J., Mbarek, H., Bernard, M., van Eijk, K.R., Lind, P.A., Liu, M.Z., Maciejewski, D.F., Palviainen, T., Sánchez-Mora, C., Sherva, R., Taylor, M., Walters, R.K., Abdellaoui, A., Bigdeli, T.B., Branje, S.J.T., Brown, S.A., Casas, M., Corley, R.P., Smith, G.D., Davies, G.E., Ehli, E.A., Farrer, L., Fedko, I.O., Garcia-Martínez, I., Gordon, S.D., Hartman, C.A., Heath, A.C., Hickie, I.B., Hickman, M., Hopfer, C.J., Hottenga, J.J., Kahn, R.S., Kaprio, J., Korhonen, T., Kranzler, H.R., Krauter, K., van Lier, P.A.C., Madden, P.A.F., Medland, S.E., Neale, M.C., Meeus, W.H.J., Montgomery, G.W., Nolte, I.M., Oldehinkel, A.J., Pausova, Z., Ramos-Quiroga, J.A., Richarte, V., Rose, R.J., Shin, J., Stallings, M.C., Wall, T.L., Ware, J.J., Wright, M.J., Zhao, H., Koot, H.M., Paus, T., Hewitt, J.K., Ribasés, M., Loukola, A., Boks, M.P., Snieder, H., Munafò, M.R., Gelernter, J., Boomsma, D.I., Martin, N.G., Gillespie, N.A., Vink, J.M., Derks, E.M., 2018. GENOME-WIDE ASSOCIATION META-ANALYSIS OF AGE AT FIRST CANNABIS USE. *Addict. Abingdon Engl.* <https://doi.org/10.1111/add.14368>
- Mooney, M., Sofuoglu, M., Dudish-Poulsen, S., Hatsukami, D.K., 2006. Preliminary observations of paranoia in a human laboratory study of cocaine. *Addict. Behav.* 31, 1245–1251. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2005.08.003>
- Mukherjee, N., Kidd, K., Pakstis, A., Speed, W., Li, H., Tarnok, Z., Barta, C., Kajuna, S., Kidd, J., 2010. The complex global pattern of genetic variation and linkage disequilibrium at Catechol-O-methyl transferase (COMT). *Mol. Psychiatry* 15, 216–225. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.64>
- Myint, A.-M., Leonard, B.E., Steinbusch, H.W.M., Kim, Y.-K., 2005. Th1, Th2, and Th3 cytokine alterations in major depression. *J. Affect. Disord.* 88, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.07.008>
- Neale, B.M., Sham, P.C., 2004. The Future of Association Studies: Gene-Based Analysis and Replication. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 353–362. <https://doi.org/10.1086/423901>

- Nurnberger, J.I., Jr, Blehar, M.C., Kaufmann, C.A., York-Cooler, C., Simpson, S.G., Harkavy-Friedman, J., Severe, J.B., Malaspina, D., Reich, T., 1994. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 849–859; discussion 863–864.
- Nurnberger, J.I., Wiegand, R., Bucholz, K., O'Connor, S., Meyer, E.T., Reich, T., Rice, J., Schuckit, M., King, L., Petti, T., Bierut, L., Hinrichs, A.L., Kuperman, S., Hesselbrock, V., Porjesz, B., 2004. A family study of alcohol dependence: coaggregation of multiple disorders in relatives of alcohol-dependent probands. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 1246–1256. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.12.1246>
- O'Connor, P.G., Fiellin, D.A., 2000. Pharmacologic treatment of heroin-dependent patients. *Ann. Intern. Med.* 133, 40–54.
- Okun, E., Griffioen, K.J., Lathia, J.D., Tang, S.-C., Mattson, M.P., Arumugam, T.V., 2009. Toll-Like Receptors in Neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 59, 278–292. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.09.001>
- Olds, J., Milner, P., 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427.
- Oliveira, J., Busson, M., Etain, B., Jamain, S., Hamdani, N., Boukouaci, W., Amokrane, K., Bennabi, M., Le Guen, E., Dargél, A.A., Houenou, J., Ivanova, R., Bellivier, F., Henry, C., Kahn, J.-P., Charron, D., Krishnamoorthy, R., Vervoitte, L., Leboyer, M., Tamouza, R., 2014. Polymorphism of Toll-like receptor 4 gene in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 152–154, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.09.043>
- Ortiz-Domínguez, A., Hernández, M.E., Berlanga, C., Gutiérrez-Mora, D., Moreno, J., Heinze, G., Pavón, L., 2007. Immune variations in bipolar disorder: phasic differences. *Bipolar Disord.* 9, 596–602. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2007.00493.x>
- Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.-A., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2011. Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* 69, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.08.031>
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P., 2014. Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2 Activation by Addictive Drugs: A Signal Toward Pathological Adaptation. *Biol. Psychiatry, N-Methyl-D-Aspartate Receptors, Synaptic Plasticity, Psychopathology, and Treatment* 76, 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.04.005>
- Pavarin, R., Lugoboni, F., Mathewson, S., Ferrari, A.M., Guizzardi, G., Quaglio, G., 2011. Cocaine-related medical and trauma problems: a consecutive series of 743 patients from a multicentre study in Italy. *Eur. J. Emerg. Med. Off. J. Eur. Soc. Emerg. Med.* 18, 208–214. <https://doi.org/10.1097/MEJ.0b013e3283440f25>
- Pearson, E.C., Woosley, R.L., 2005. QT prolongation and torsades de pointes among methadone users: reports to the FDA spontaneous reporting system. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 14, 747–753. <https://doi.org/10.1002/pds.1112>
- Peles, E., Bodner, G., Kreek, M.J., Rados, V., Adelson, M., 2007. Corrected-QT intervals as related to methadone dose and serum level in methadone maintenance treatment (MMT) patients: a cross-sectional study. *Addict. Abingdon Engl.* 102, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01668.x>
- Pennington, R., Gatenbee, C., Kennedy, B., Harpending, H., Cochran, G., 2009. Group differences in proneness to inflammation. *Infect. Genet. Evol.*, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico” 9, 1371–1380. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.017>
- Pettit, H.O., Justice, J.B., 1989. Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34, 899–904.
- Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A., Reich, D., 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38, 904–909. <https://doi.org/10.1038/ng1847>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- R Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramus, F., 2013. Au-delà de l'inné et de l'acquis [WWW Document]. Ramus Méninges. URL <http://www.scilogs.fr/ramus-meninges/au-dela-de-linne-et-de-lacquis/> (accessed 8.5.18).

- Romero, J., Baldinger, S.H., Goodman-Meza, D., Engstrom, K., Valencia, C.R., Golive, A., Medrano, F., Rangasamy, S., Makkiya, M., Fisher, J.D., Gross, J., Krumer, A., Kim, S., Garcia, M.J., Biase, L.D., Ferrick, K.J., 2016. Drug-induced torsades de pointes in an underserved urban population. Methadone: is there therapeutic equipoise? *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 45, 37–45. <https://doi.org/10.1007/s10840-015-0077-2>
- Roncero, C., Daigre, C., Gonzalvo, B., Valero, S., Castells, X., Grau-López, L., Eiroa-Orosa, F.J., Casas, M., 2013. Risk factors for cocaine-induced psychosis in cocaine-dependent patients. *Eur. Psychiatry J. Assoc. Eur. Psychiatr.* 28, 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2011.06.012>
- Roncero, Carlos, Martínez-Luna, N., Daigre, C., Grau-López, L., Gonzalvo, B., Pérez-Pazos, J., Casas, M., 2013. Psychotic symptoms of cocaine self-injectors in a harm reduction program. *Subst. Abuse* 34, 118–121. <https://doi.org/10.1080/08897077.2012.691446>
- Roncero, C., Ros-Cucurull, E., Daigre, C., Casas, M., 2012. Prevalence and risk factors of psychotic symptoms in cocaine-dependent patients. *Actas Esp. Psiquiatr.* 40, 187–197.
- Roy, A.K., McCarthy, C., Kiernan, G., McCorrigan, C., Keenan, E., Mahon, N.G., Sweeney, B., 2012. Increased incidence of QT interval prolongation in a population receiving lower doses of methadone maintenance therapy. *Addict. Abingdon Engl.* 107, 1132–1139. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03767.x>
- rs740603 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - GRCh37 Archive browser 92 [WWW Document], n.d. URL http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=22:19944677-19945677;v=rs740603;vdb=variation;vf=530381#population_freq_EUR (accessed 7.10.18).
- Salvatore, J.E., Aliev, F., Edwards, A.C., Evans, D.M., Macleod, J., Hickman, M., Lewis, G., Kendler, K.S., Loukola, A., Korhonen, T., Latvala, A., Rose, R.J., Kaprio, J., Dick, D.M., 2014. Polygenic Scores Predict Alcohol Problems in an Independent Sample and Show Moderation by the Environment. *Genes* 5, 330–346. <https://doi.org/10.3390/genes5020330>
- Satel, S.L., Edell, W.S., 1991. Cocaine-induced paranoia and psychosis proneness. *Am. J. Psychiatry* 148, 1708–1711.
- Satel, S.L., Southwick, S.M., Gawin, F.H., 1991. Clinical features of cocaine-induced paranoia. *Am. J. Psychiatry* 148, 495–498.
- Savage, J.E., Salvatore, J.E., Aliev, F., Edwards, A.C., Hickman, M., Kendler, K.S., Macleod, J., Latvala, A., Loukola, A., Kaprio, J., Rose, R.J., Chan, G., Hesselbrock, V., Webb, B.T., Adkins, A., Bigdeli, T.B., Riley, B.P., Dick, D.M., 2018. Polygenic Risk Score Prediction of Alcohol Dependence Symptoms Across Population-Based and Clinically Ascertained Samples. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 42, 520–530. <https://doi.org/10.1111/acer.13589>
- Scheinost, D., Sinha, R., Cross, S.N., Kwon, S.H., Sze, G., Constable, R.T., Ment, L.R., 2017. Does prenatal stress alter the developing connectome? *Pediatr. Res.* 81, 214–226. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.197>
- Scherbaum, N., Specka, M., 2008. Factors influencing the course of opiate addiction. *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 17 Suppl 1, S39–44. <https://doi.org/10.1002/mpr.244>
- Schultz, W., Romo, R., 1987. Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *J. Neurophysiol.* 57, 201–217. <https://doi.org/10.1152/jn.1987.57.1.201>
- Scofield, M.D., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Kupchik, Y.M., Spencer, S., Smith, A.C.W., Roberts-Wolfe, D., Kalivas, P.W., 2016. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol. Rev.* 68, 816–871. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012484>
- Sherer, M.A., Kumor, K.M., Cone, E.J., Jaffe, J.H., 1988. Suspiciousness induced by four-hour intravenous infusions of cocaine. Preliminary findings. *Arch. Gen. Psychiatry* 45, 673–677.
- Shifman, S., Bronstein, M., Sternfeld, M., Pisanté-Shalom, A., Lev-Lehman, E., Weizman, A., Reznik, I., Spivak, B., Grisaru, N., Karp, L., Schiffer, R., Kotler, M., Strous, R.D., Swartz-Vanetik, M., Knobler, H.Y., Shinar, E., Beckmann, J.S., Yakir, B., Risch, N., Zak, N.B., Darvasi, A., 2002. A Highly Significant Association between a COMT Haplotype and Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1296–1302.
- Simhan, H.N., MacPherson, T., Caritis, S.N., Krohn, M.A., 2008. Maternal and fetal Toll-like receptor 4 genotype and chorionic plate inflammatory lesions. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 400.e1–400.e4. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.043>

- Sofuoglu, M., Dudish-Poulsen, S., Nelson, D., Pentel, P.R., Hatsukami, D.K., 1999. Sex and Menstrual Cycle Differences in the Subjective Effects From Smoked Cocaine in Humans. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 7, 274–283. <https://doi.org/doi>:
- Stringer, S., Minică, C.C., Verweij, K.J.H., Mbarek, H., Bernard, M., Derringer, J., van Eijk, K.R., Isen, J.D., Loukola, A., Maciejewski, D.F., Mihailov, E., van der Most, P.J., Sánchez-Mora, C., Roos, L., Sherva, R., Walters, R., Ware, J.J., Abdellaoui, A., Bigdeli, T.B., Branje, S.J.T., Brown, S.A., Bruinenberg, M., Casas, M., Esko, T., Garcia-Martinez, I., Gordon, S.D., Harris, J.M., Hartman, C.A., Henders, A.K., Heath, A.C., Hickie, I.B., Hickman, M., Hopfer, C.J., Hottenga, J.J., Huizink, A.C., Irons, D.E., Kahn, R.S., Korhonen, T., Kranzler, H.R., Krauter, K., van Lier, P. a. C., Lubke, G.H., Madden, P. a. F., Mägi, R., McGue, M.K., Medland, S.E., Meeus, W.H.J., Miller, M.B., Montgomery, G.W., Nivard, M.G., Nolte, I.M., Oldehinkel, A.J., Pausova, Z., Qaiser, B., Quaye, L., Ramos-Quiroga, J.A., Richarte, V., Rose, R.J., Shin, J., Stallings, M.C., Stiby, A.I., Wall, T.L., Wright, M.J., Koot, H.M., Paus, T., Hewitt, J.K., Ribasés, M., Kaprio, J., Boks, M.P., Snieder, H., Spector, T., Munafò, M.R., Metspalu, A., Gelernter, J., Boomsma, D.I., Iacono, W.G., Martin, N.G., Gillespie, N.A., Derks, E.M., Vink, J.M., 2016. Genome-wide association study of lifetime cannabis use based on a large meta-analytic sample of 32 330 subjects from the International Cannabis Consortium. *Transl. Psychiatry* 6, e769. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.36>
- Sullivan, P.F., Kendler, K.S., 1999. The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob. Res. Off. J. Soc. Res. Nicotine Tob.* 1 Suppl 2, S51-57; discussion S69-70.
- Takumi, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., 1988. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 242, 1042–1045.
- Tang, Y., Kranzler, H.R., Gelernter, J., Farrer, L.A., Pearson, D., Cubells, J.F., 2009. Transient cocaine-associated behavioral symptoms rated with a new instrument, the scale for assessment of positive symptoms for cocaine-induced psychosis (SAPS-CIP). *Am. J. Addict. Am. Acad. Psychiatr. Alcohol. Addict.* 18, 339–345. <https://doi.org/10.3109/10550490903077937>
- Tang, Y.-L., Kranzler, H.R., Gelernter, J., Farrer, L.A., Cubells, J.F., 2007. Comorbid psychiatric diagnoses and their association with cocaine-induced psychosis in cocaine-dependent subjects. *Am. J. Addict. Am. Acad. Psychiatr. Alcohol. Addict.* 16, 343–351. <https://doi.org/10.1080/10550490701525723>
- Teixeira, C.A.B., Lasiuk, G., Barton, S., Fernandes, M.N. de F., Gherardi-Donato, E.C. da S., 2017. An exploration of addiction in adults experiencing early-life stress: a metasyntesis. *Rev. Lat. Am. Enfermagem* 25, e2939. <https://doi.org/10.1590/1518-8345.2026.2939>
- Thorgeirsson, T.E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K.P., Manolescu, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Ingason, A., Stacey, S.N., Bergthorsson, J.T., Thorlacius, S., Gudmundsson, J., Jonsson, T., Jakobsdottir, M., Saemundsdottir, J., Olafsdottir, O., Gudmundsson, L.J., Bjornsdottir, G., Kristjansson, K., Skuladottir, H., Isaksson, H.J., Gudbjartsson, T., Jones, G.T., Mueller, T., Gottsäter, A., Flex, A., Aben, K.K.H., Vegt, F. de, Mulders, P.F.A., Isla, D., Vidal, M.J., Asin, L., Saez, B., Murillo, L., Blondal, T., Kolbeinsson, H., Stefansson, J.G., Hansdottir, I., Runarsdottir, V., Pola, R., Lindblad, B., Rij, A.M. van, Dieplinger, B., Haltmayer, M., Mayordomo, J.I., Kiemenev, L.A., Matthiasson, S.E., Oskarsson, H., Tyrifingsson, T., Gudbjartsson, D.F., Gulcher, J.R., Jonsson, S., Thorsteinsdottir, U., Kong, A., Stefansson, K., 2008. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452, 638–642. <https://doi.org/10.1038/nature06846>
- Tien, A.Y., Anthony, J.C., 1990. Epidemiological analysis of alcohol and drug use as risk factors for psychotic experiences. *J. Nerv. Ment. Dis.* 178, 473–480.
- Tobacco and Genetics Consortium, 2010. Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat. Genet.* 42, 441–447. <https://doi.org/10.1038/ng.571>
- Trape, S., Charles-Nicolas, A., Jehel, L., Lacoste, J., 2014. Early cannabis use is associated with severity of Cocaine-Induced Psychosis among cocaine smokers in Martinique, French West Indies. *J. Addict. Med.* 8, 33–39. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000003>
- Treutlein, J., Cichon, S., Ridinger, M., Wodarz, N., Soyka, M., Zill, P., Maier, W., Moessner, R., Gaebel, W., Dahmen, N., Fehr, C., Scherbaum, N., Steffens, M., Ludwig, K.U., Frank, J., Wichmann, H.E., Schreiber, S., Dragano, N., Sommer, W.H., Leonardi-Essmann, F., Lourdasamy, A., Gebicke-Haerter, P., Wienker, T.F., Sullivan, P.F., Nöthen, M.M., Kiefer, F., Spanagel, R., Mann, K., Rietschel, M., 2009. Genome-wide Association Study of Alcohol Dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 773–784. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.83>

- Tueth, M.J., 1993. High incidence of psychosis in cocaine intoxication and preventing violence in the ED. *Am. J. Emerg. Med.* 11, 676.
- United Nations, United Nations Office on Drugs and Crime, 2017. World drug report 2017.
- Ursulet, G., Charles-Nicolas, A., 1994. [A new drug: crack]. *Soins Rev. Réf. Infirm.* 25–28.
- Valjent, E., Corbillé, A.-G., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., 2006a. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2932–2937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511030103>
- Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R., Caboche, J., 2000. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8701–8709.
- Valjent, E., Corvol, J.-C., Trzaskos, J.M., Girault, J.-A., Hervé, D., 2006b. Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. *BMC Neurosci.* 7, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-20>
- Vanable, P.A., Carey, M.P., Carey, K.B., Maisto, S.A., 2003. Smoking among psychiatric outpatients: relationship to substance use, diagnosis, and illness severity. *Psychol. Addict. Behav. J. Soc. Psychol. Addict. Behav.* 17, 259–265. <https://doi.org/10.1037/0893-164X.17.4.259>
- Vergara-Moragues, E., Araos Gómez, P., González-Saiz, F., Rodríguez-Fonseca, F., 2014. Cocaine-induced psychotic symptoms in clinical setting. *Psychiatry Res.* 217, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.02.024>
- Vink, J.M., 2016. Genetics of Addiction: Future Focus on Gene × Environment Interaction? *J. Stud. Alcohol Drugs* 77, 684–687. <https://doi.org/10.15288/jsad.2016.77.684>
- Vink, J.M., Hottenga, J.J., de Geus, E.J.C., Willemssen, G., Neale, M.C., Furberg, H., Boomsma, D.I., 2014. Polygenic risk scores for smoking: predictors for alcohol and cannabis use? *Addict. Abingdon Engl.* 109, 1141–1151. <https://doi.org/10.1111/add.12491>
- Visscher, P.M., Hill, W.G., Wray, N.R., 2008. Heritability in the genomics era — concepts and misconceptions. *Nat. Rev. Genet.* 9, 255–266. <https://doi.org/10.1038/nrg2322>
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.-J., 1999. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 13, 337–345. <https://doi.org/10.1177/026988119901300406>
- Vorspan, F., Bellais, L., Bloch, V., Lépine, J.-P., 2009. Cocaine induced psychotic symptoms in a French sample of cocaine addicts.
- Vorspan, F., Bloch, V., Brousse, G., Bellais, L., Gascon, J., Lépine, J.-P., 2011. Prospective assessment of transient cocaine-induced psychotic symptoms in a clinical setting. *Am. J. Addict. Am. Acad. Psychiatr. Alcohol. Addict.* 20, 535–537. <https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2011.00181.x>
- Vorspan, F., Brousse, G., Bloch, V., Bellais, L., Romo, L., Guillem, E., Coeuru, P., Lépine, J.-P., 2012. Cocaine-induced psychotic symptoms in French cocaine addicts. *Psychiatry Res.* 200, 1074–1076. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.04.008>
- Wagner, F.A., Anthony, J.C., 2002. From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 26, 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00367-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00367-0)
- Wang, S.-C., Ho, I.-K., Tsou, H.-H., Liu, S.-W., Hsiao, C.-F., Chen, C.-H., Tan, H.K.-L., Lin, L., Wu, C.-S., Su, L.-W., Huang, C.-L., Yang, Y.-H., Liu, M.-L., Lin, K.-M., Liu, S.C., Wu, H.-Y., Kuo, H.-W., Chen, A.C.H., Chang, Y.-S., Liu, Y.-L., 2013. Functional genetic polymorphisms in CYP2C19 gene in relation to cardiac side effects and treatment dose in a methadone maintenance cohort. *Omics J. Integr. Biol.* 17, 519–526. <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0068>
- Wang, Y.Y., Hu, C.F., Li, J., You, X., Gao, F.G., 2016. Increased translocation of antigens to endosomes and TLR4 mediated endosomal recruitment of TAP contribute to nicotine augmented cross-presentation. *Oncotarget* 7, 38451–38466. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9498>
- Warnes, G., Gregor Gorjanc, Michael Man, 2013. genetics: Population Genetics, Genetics R package.
- Weinstock, L.M., Gaudiano, B.A., Wenze, S.J., Epstein-Lubow, G., Miller, I.W., 2016. Demographic and clinical characteristics associated with comorbid cannabis use disorders (CUDs) in hospitalized patients with bipolar I disorder. *Compr. Psychiatry* 65, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.comppsy.2015.10.003>

- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38, 1358–1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Westermeyer, J., 1999. THE ROLE OF CULTURAL AND SOCIAL FACTORS IN THE CAUSE OF ADDICTIVE DISORDERS. *Psychiatr. Clin. North Am.* 22, 253–273. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70075-7](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70075-7)
- What is the PGC? — Psychiatric Genomics Consortium [WWW Document], n.d. URL <http://www.med.unc.edu/pgc> (accessed 7.24.18).
- Wilens, T.E., Biederman, J., Adamson, J.J., Henin, A., Sgambati, S., Gignac, M., Sawtelle, R., Santry, A., Monuteaux, M.C., 2008. Further evidence of an association between adolescent bipolar disorder with smoking and substance use disorders: A controlled study. *Drug Alcohol Depend.* 95, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2007.12.016>
- Wong, C.C.Y., Schumann, G., 2008. Genetics of addictions: strategies for addressing heterogeneity and polygenicity of substance use disorders. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 3213–3222. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0104>
- World Health Organization, 2015. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking, 2015.
- World Health Organization, 2008. The methadone fix. *Bull. World Health Organ.* 86, 164–165. <https://doi.org/10.2471/BLT.08.010308>
- Xie, L., Choudhury, G.R., Winters, A., Yang, S.-H., Jin, K., 2015. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10: Immunomodulation. *Eur. J. Immunol.* 45, 180–191. <https://doi.org/10.1002/eji.201444823>
- Xu, Y., Zhang, Y., Cardell, L.-O., 2014. Nicotine exaggerates LPS-induced airway hyperreactivity via JNK-mediated up-regulation of Toll-like receptor 4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51, 370–379. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0409OC>
- Yang, P., Kanki, H., Drolet, B., Yang, T., Wei, J., Viswanathan, P.C., Hohnloser, S.H., Shimizu, W., Schwartz, P.J., Stanton, M., Murray, K.T., Norris, K., George, A.L., Roden, D.M., 2002. Allelic Variants in Long-QT Disease Genes in Patients With Drug-Associated Torsades de Pointes. *Circulation* 105, 1943–1948. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000014448.19052.4C>
- Yelnik, J., François, C., Percheron, G., Heyner, S., 1987. Golgi study of the primate substantia nigra. I. Quantitative morphology and typology of nigral neurons. *J. Comp. Neurol.* 265, 455–472. <https://doi.org/10.1002/cne.902650402>
- Yui, K., Goto, K., Ikemoto, S., Ishiguro, T., Angrist, B., Duncan, G.E., Sheitman, B.B., Lieberman, J.A., Bracha, S.H., Ali, S.F., 1999. Neurobiological basis of relapse prediction in stimulant-induced psychosis and schizophrenia: the role of sensitization. *Mol. Psychiatry* 4, 512–523.
- Zabetian, C.P., Anderson, G.M., Buxbaum, S.G., Elston, R.C., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kim, K.S., Kim, C.H., Malison, R.T., Gelernter, J., Cubells, J.F., 2001. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 515–522. <https://doi.org/10.1086/318198>
- Zabetian, C.P., Buxbaum, S.G., Elston, R.C., Köhnke, M.D., Anderson, G.M., Gelernter, J., Cubells, J.F., 2003. The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1389–1400. <https://doi.org/10.1086/375499>
- Zerbino, D.R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Bhai, J., Billis, K., Cummins, C., Gall, A., Girón, C.G., Gil, L., Gordon, L., Haggerty, L., Haskell, E., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Janacek, S.H., Juettemann, T., To, J.K., Laird, M.R., Lavidas, I., Liu, Z., Loveland, J.E., Maurel, T., McLaren, W., Moore, B., Mudge, J., Murphy, D.N., Newman, V., Nuhn, M., Ogeh, D., Ong, C.K., Parker, A., Patricio, M., Riat, H.S., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Sparrow, H., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Walts, B., Zadissa, A., Frankish, A., Hunt, S.E., Kostadima, M., Langridge, N., Martin, F.J., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Staines, D.M., Trevanion, S.J., Aken, B.L., Cunningham, F., Yates, A., Flicek, P., 2018. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, D754–D761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>

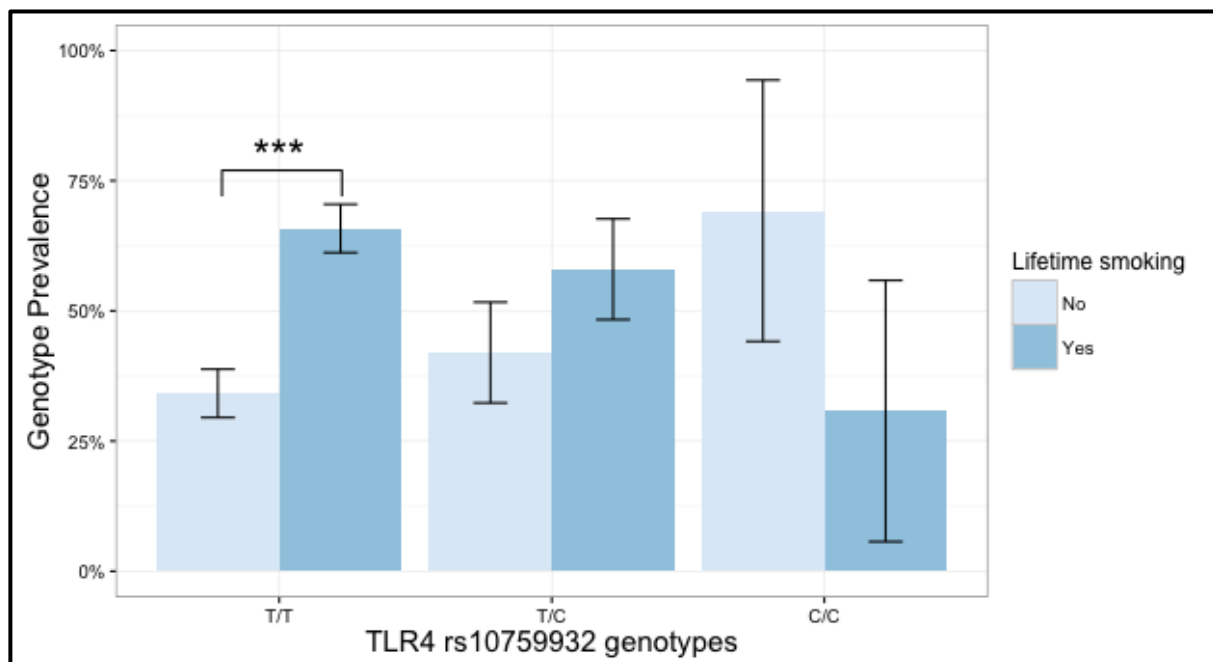
X. Annexes

A. Annexe 1: Matériel supplémentaire article « Récepteur TLR4 et Tabagisme des patients bipolaires »

S.Tableau X-1 : Distributions génotypique et allélique des patients bipolaires fumeurs et non fumeurs avec la valeur p du test exact d' Hardy Weinberg (HWE) chez ceux qui n'ont jamais fumé après correction de Bonferroni pour tests multiples.

SNP	Groupe fumeurs vie entière N=326 Fréquence (n)	Groupe jamais fumé N=188 Fréquence (n)	HWE chez ceux qui n'ont jamais fumé (valeur de p corrigée)
rs1927914			
AA	0.51 (167)	0.46 (87)	
AG	0.40 (130)	0.38 (71)	0.15
GG	0.09 (29)	0.16 (30)	
A	0.71 (464)	0.65 (245)	
rs10759932			
TT	0.81 (264)	0.73 (137)	
TC	0.18 (58)	0.22 (42)	0.17
CC	0.01 (4)	0.05 (9)	
T	0.9 (586)	0.84 (316)	
rs4986790			
AA	0.89 (290)	0.88 (165)	
AG	0.11 (36)	0.12 (23)	1
GG	-	-	
A	0.94 (616)	0.94 (353)	
rs4986791			
CC	0.89 (289)	0.88 (165)	
CT	0.11 (37)	0.12 (23)	1
TT	-	-	
C	0.94 (615)	0.94 (353)	
rs11536889			
GG	0.68 (221)	0.76 (143)	
GC	0.29 (96)	0.23 (43)	1
CC	0.03 (9)	0.01 (2)	
G	0.83 (538)	0.88 (329)	
rs11536891			
TT	0.72 (234)	0.72 (135)	
TC	0.27 (87)	0.22 (42)	0.046*
CC	0.02 (5)	0.06 (11)	
T	0.85 (555)	0.83 (312)	

* p (avec correction de Bonferroni) < 0.05

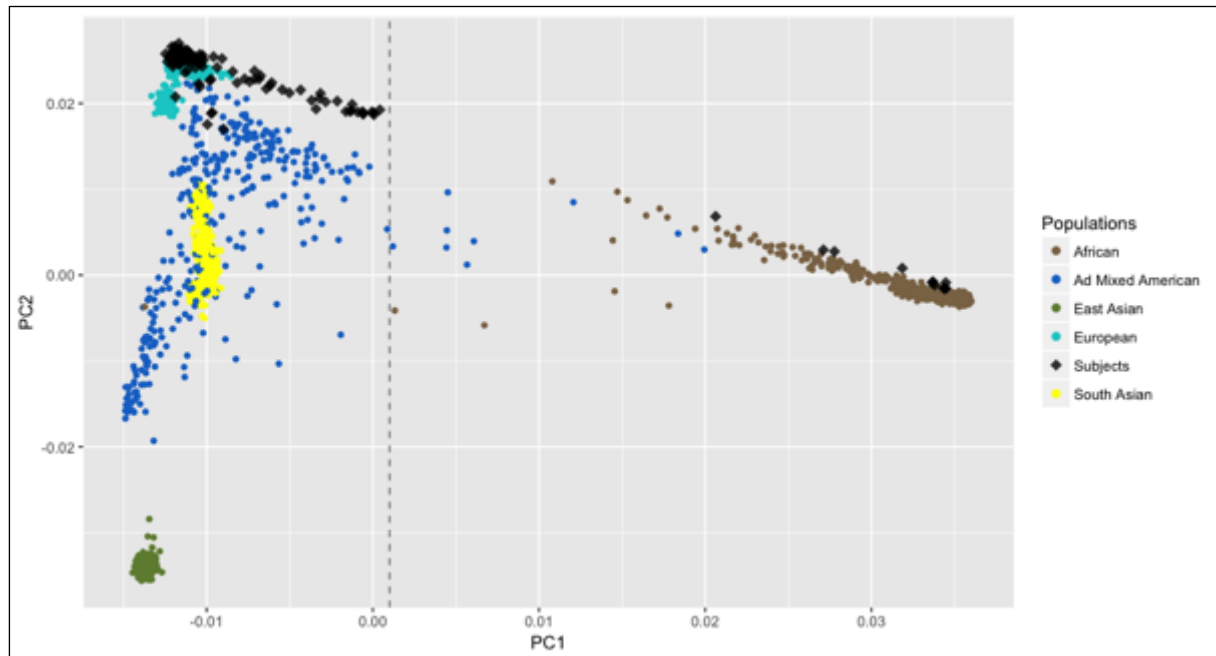


S.Figure X-1 : Fréquences génotypiques du SNP rs10759932 du gene TLR4 chez les patients bipolaires fumeurs et jamais fumeurs (***) : p (avec correction de Bonferroni) < 0.001 .

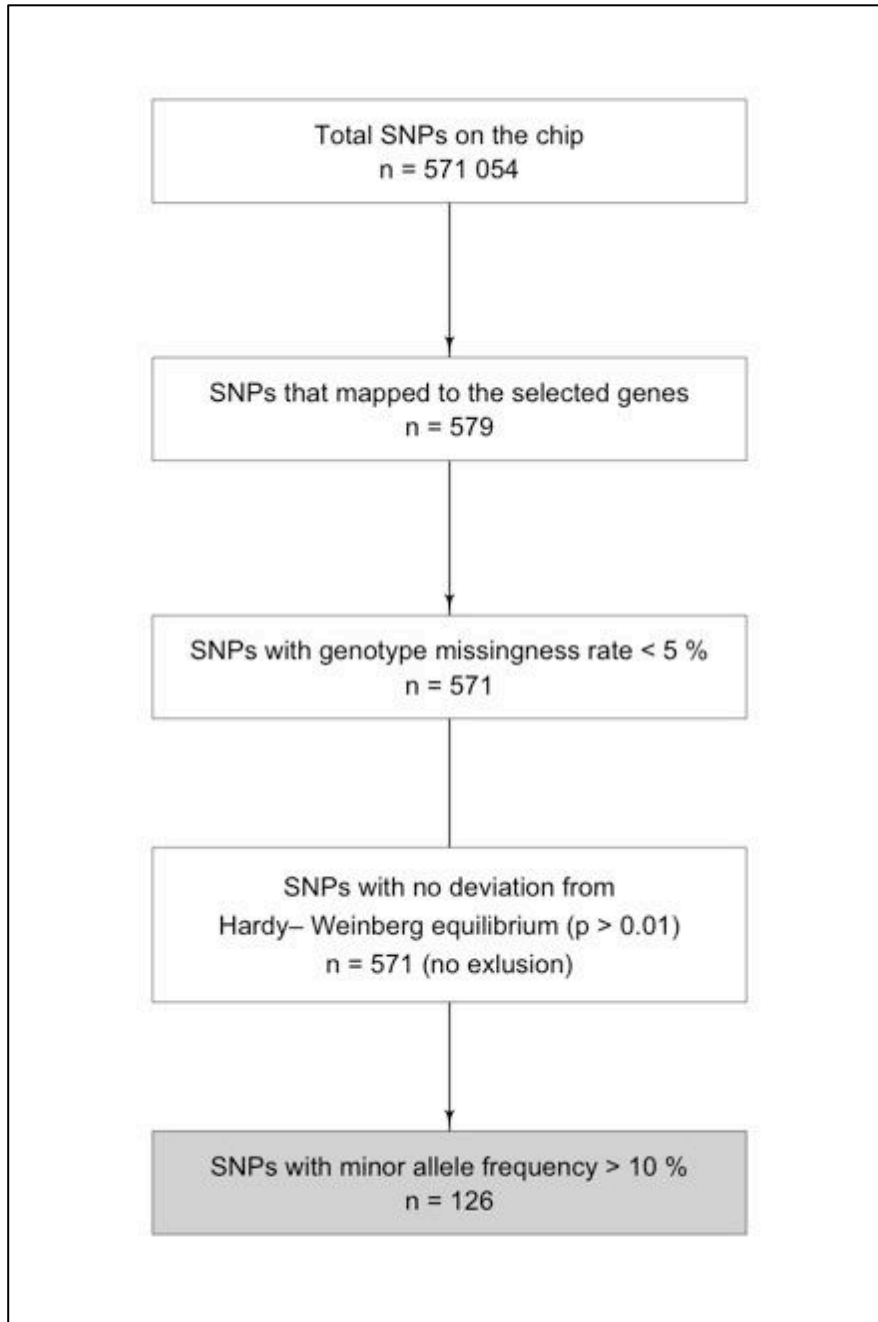
B. Annexe 2 : Matériel supplémentaire de l'article « Risque d'allongement de l'intervalle QT à l'ECG lors du traitement par Méthadone des patients dépendants de l'héroïne ».

S.Tableau X-2 : Résumé de l'analyse Gene-Based

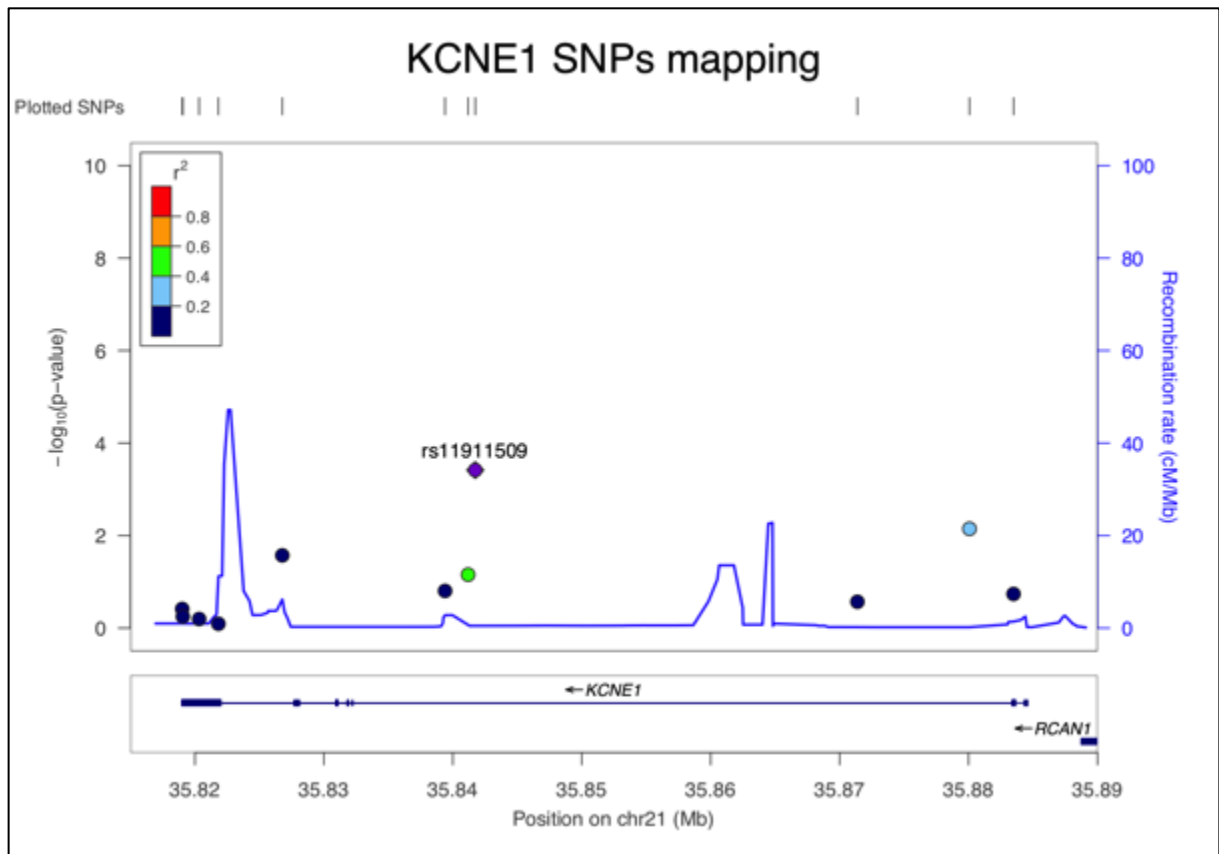
Locus	Numbers of SNPs on the PsychArray Chip	Number of SNPs after quality control	Number of SNPs with nominal p-value below 0.05	Number of significant SNPs also passing LD-criterion	Empirical set-based p-value	List of the SNPs in the locus included for the gene based analysis
<i>KCNE1</i>	17	11	6	5	0.02	rs11911509, exm-rs727957, rs2070359, rs4817656, rs2247810
<i>KCNH2</i>	14	4	3	3	0.04	exm-rs3807375, rs3807370, exm671435
<i>KCNQ1</i>	88	50	10	5	0.48	psy_rs234868, rs2106467, rs2237869, rs2283169, exm2267247
<i>NOS1AP</i>	68	42	15	5	0.14	rs1337062, rs10157390, rs347300, rs7528328, rs6677052
<i>SCN5A</i>	392	19	3	3	0.28	rs6599228, rs6793245, rs7372712



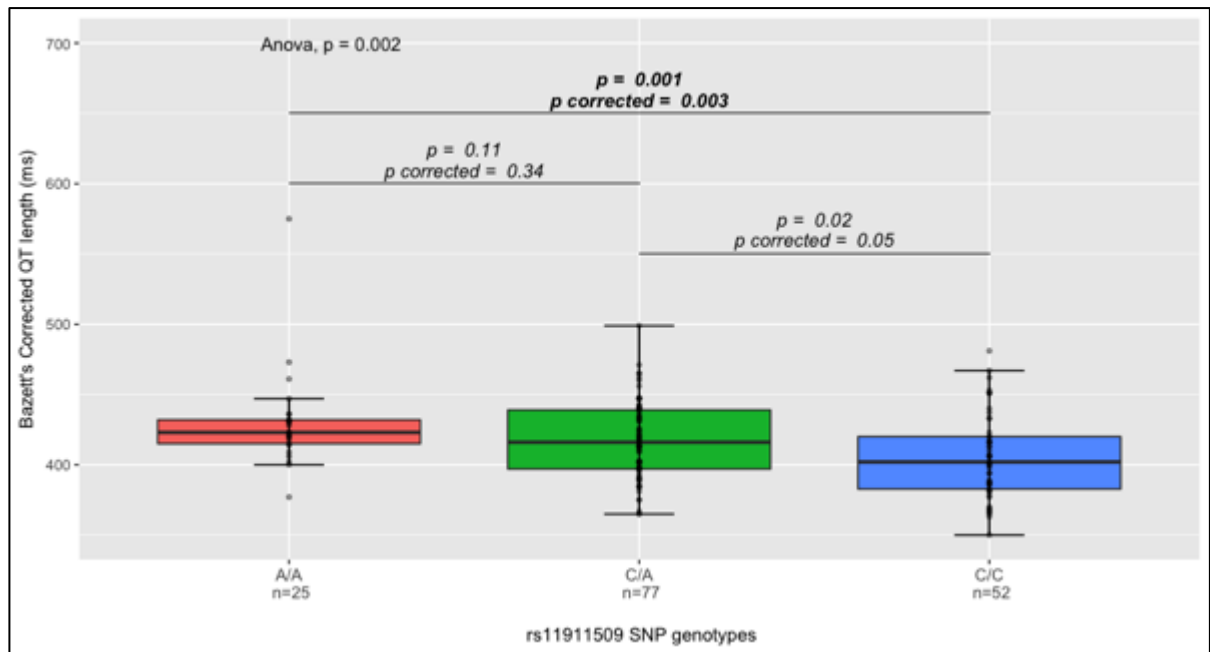
S.Figure X-1 : Analyse en composante principale de la fusion de la cohorte d'étude avec les populations de la base 1000Genome. La ligne pointillée verticale représente la limite entre les sujets caucasiens et africains dans notre cohorte



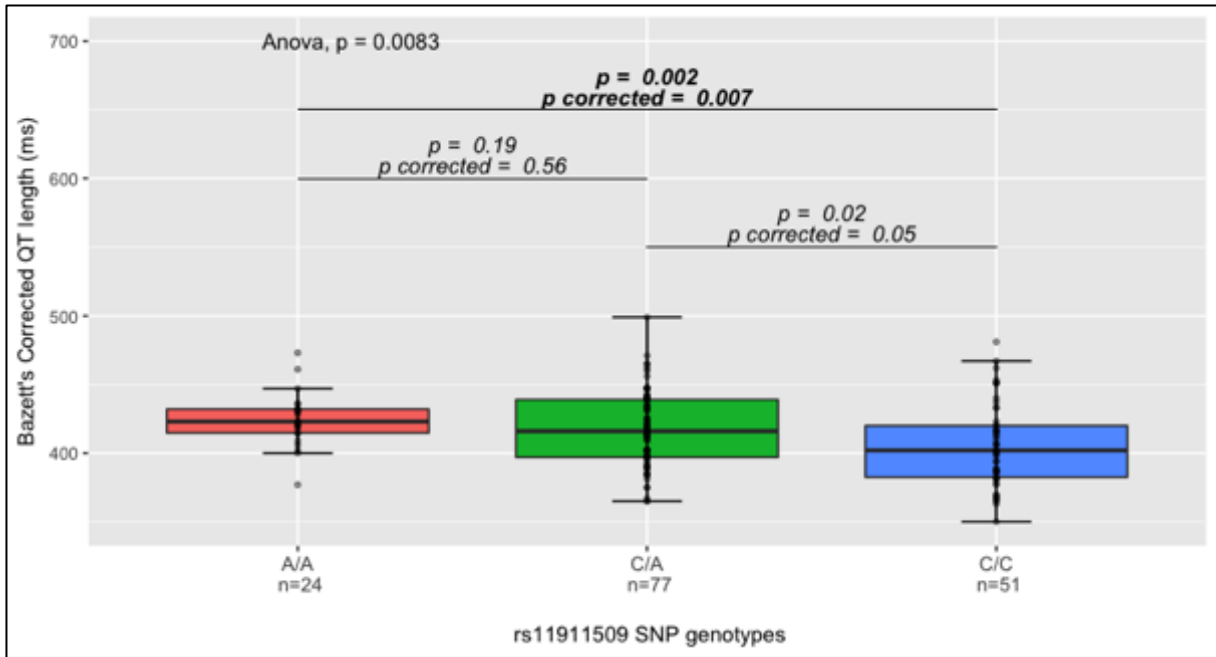
S.Figure X-2 : Etapes des contrôles qualité et sélection des SNPs étudiés



S.Figure X-3 : Graphique Locus zoom des SNPs du gène *KCNE1*



S.Figure X-4 : Longueur de l'intervalle QT corrigé (Bazett) selon les génotypes du SNPs rs11911509 chez l'ensemble des patients (n=154)



S.Figure X-5 : Longueur de l'intervalle QT corrigé (Bazett) selon les génotypes du SNPs rs11911509 chez les patients avec une posologie quotidienne de Méthadone supérieure à 200 mg/j (n=152)

C. Annexe 3 : Echelle SAPS-CIP

Première page de l'échelle SAPS-CIP (Scale For the Assessment of Positive Symptoms of Cocaine Induced Psychosis) (*Adaptée de Cubells 2002 et traduite en français par Vorspan 2009*)

Instructions pour l'examinateur : reporter l'intensité selon le modèle général suivant :	
<ol style="list-style-type: none"> 1. absente – aucune – inexistante 2. doute – discutable 3. léger(e) 4. moyen(ne) 5. important(e) 6. sévère - grave <p>N : non P : peut-être C : certain</p>	
NB : pour chaque symptôme évaluer sa survenue au cours de la vie entière	
HALLUCINATIONS	
En utilisant du crack, avez-vous déjà entendu, (ou vu, ressenti, senti une odeur, ou ressenti un goût) quelque chose d'inhabituel, étrange ou effrayant ? Décrivez ces choses aussi précisément que possible.	
I. Hallucinations auditives	0 1 2 3 4 5
<i>Le sujet rapporte entendre des voix, bruits ou sons. Les voix peuvent être celles d'hommes ou de femmes, connus ou inconnus, critiques ou élogieuses.</i>	
En utilisant du crack, avez-vous déjà entendu ou avez-vous déjà pensé entendre quelque chose qui n'existait pas réellement ? Avez-vous déjà entendu Et découvert finalement qu'il n'y avait personne pour faire ce bruit ?	
1. bruits de pas	N P C
2. frapper à la porte	N P C
3. sonnerie de téléphone	N P C
4. fréquence radio de la police	N P C
5. personnes s'adressant au sujet	N P C
<i>Préciser : disant :</i>	
6. personnes parlant entre elles	N P C
<i>Préciser : disant :</i>	
7. autre	N P C
<i>Préciser :</i>	

D. Annexe 4 : Script SNPretrieve

```
SNPretrieve <- fonction(Genelist, start.extend = 0, end.extend=0, use.Kb = F)
{
require("GenomicRanges")
require("pipeR")
require("plyr")
require("doBy")
require("reshape2")
source("~/Documents/OutilsStat/R/Script/FactorToNumeric.R")

load(file=chemin vers le fichier Grange de la position des SNP dans le genome selon la version utilisée)
load(file=chemin vers le fichier de corespondance des nom Illumina-dbSNP)
load(file= chemin du fichier de la puce )
load(file = chemin du fichier d'annotation des SNP fourni par Illumina)

#transformation des noms du fichier de la puce
seqlevels(FV.SNP.List.GRange)[0:24] <- c(0:22,"X")
seqlevels(FV.SNP.List.GRange)[26:27] <- c("Y","MT")
#le chr23 est le X est le chr25 est le pseudo autosomal X
seqnames(FV.SNP.List.GRange)[which(seqnames(FV.SNP.List.GRange)=="chr23")] <- "X"
seqlevels(FV.SNP.List.GRange,force=T)<- seqlevels(FV.SNP.List.GRange)[-
which(seqlevels(FV.SNP.List.GRange)=="chr23")]

Gh.Gene = Gh37p13.Genes

# transformation en kilobase des start & end extend
if (use.Kb == T)
  {start.extend = start.extend* 1000
  end.extend = end.extend * 1000}

#coordonnées des gènes
Gh.Gene[Gh.Gene$Genes %in% Genelist] %>>%
  # sauvegarde des ranges originaux des gènes
  (~Gene.GRange.Orig) %>>%
  # ajout des regions etendues
  (GR ~ {## upstream
  union(GR,flank(GR,start.extend)) %>>%
  ## downstream
  union(flank(., end.extend, start=F)) %>>%
  ## reconstitution du GRanges
  (GRanges(seqnames = seqnames(.),
           ranges = IRanges(start = start(.),
                           end = end(.),
                           names = NULL),
           strand = strand(.),
           Genes=GR$Genes)) }) %>>%
#intersection avec les SNP
(~Gene.GRange) %>>%
(subsetByOverlaps(FV.SNP.List.GRange,.)) %>>%
(~rs.GRange) %>>%
findOverlaps(Gene.GRange) %>>%
(GRanges(seqnames = seqnames(rs.GRange)[queryHits(.)],
         ranges = IRanges(start = start(rs.GRange)[queryHits(.)],
                           end = end(rs.GRange)[queryHits(.)],
                           names = NULL),
         strand = strand(Gene.GRange[subjectHits(.)]),
         SNP=names(rs.GRange)[queryHits(.)],
         Genes=(Gene.GRange$Genes [subjectHits(.)])) %>>%
(~rs.GRange) %>>%
(table(.$Genes)) %>>%
t %>>%
as.data.frame %>>%
(data.frame(Gene=.,[2],NbSNP=.[3])) %>>%
merge(y = as.data.frame(Gene.GRange)[c("Genes","start","end")],
      by = intersect("Genes","Genes"),
```

```

        by.x = "Gene", by.y = "Genes") %>>%
mutate(Longueur = (end-start),
       Ratio.Covrage = round(1000*NbSNP/Longueur,digits = 2)) %>>%
(orderBy(~Ratio.Covrage,.)) -> CovrageTable

rs.GRange %>>%
  (data.frame(SNP=.$SNP,Genes=.$Genes)) %>>%
  split(. $Genes) %>>%
  lapply (function(x) {
    paste (c(unique(as.character(x[,2])),as.character(x[,1]),"END"), collapse = " ")
  }) %>>%
  cbind -> GeneSet

# récupération des nom rs
IlluminaID.rs %>>%
  merge(data.frame(SNP=rs.GRange$SNP, Gene=rs.GRange$Genes, row.names = NULL),
        by=intersect("Name","SNP"),
        all.x=F,all.y=T,
        by.x = "Name",by.y="SNP") -> rs.name

# Annotation via le fichier illumina
illumina %>>%
  merge(data.frame(SNP=rs.GRange$SNP,
                  Genes = rs.GRange$Genes,
                  BP=start(rs.GRange),
                  row.names = NULL),
        by=intersect("Name","SNP"),
        all.x=F,all.y=T,
        by.x = "Name",by.y="SNP") %>>%
  merge (rs.name[,1:2],
        by=intersect("Name","Name"),
        all = T,
        by.x = "Name",by.y="Name") %>>%
  subset (select = c(Name,Genes,RsID,Alleles,InExon,Mutation,Transcript,BP)) %>>%
  mutate (RsID = ifelse(is.na(RsID)==T,
                      stringr::str_extract(Name, "rs[0-9]+"),
                      as.character(RsID))) -> Ann

Ann %>>%
  (df ~{duplicated(df$BP) %>>%
   (which(==F)) %>>%
   (df[.,]) }) -> Ann.unique

# resultat
list(Genes.Origin=Gene.GRange.Orig,
     Genes.Extend=Gene.GRange,
     SNP=rs.GRange,
     list.rs=unique(rs.GRange$SNP),
     Annotation = Ann,
     Annotation.unique = Ann.unique,
     rs.name = rs.name,
     Gene.set = GeneSet,
     Covrage=CovrageTable) -> result
return(result)
}

```