

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES TABLEAUX.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
REMERCIEMENTS	X
AVANT-PROPOS	XI
CHAPITRE 1 - RECENSION DES ÉCRITS.....	1
1.1. Asthme.....	1
1.1.1. Description et prévalence	1
1.1.2. Physiopathologie	2
1.1.3. Phénotypes.....	14
1.2. Composante génétique de l’asthme	14
1.2.1. Superfamille de l’interleukine 1	17
1.2.2. Interleukine 1 et ses récepteurs.....	18
1.2.2.1. Récepteur de type 1 de l’interleukine 1	21
1.2.2.2. Récepteur de type 2 de l’interleukine 1	21
1.2.3. Interleukine 33.....	25
1.3. Composante environnementale de l’asthme	28
1.3.1. Épigénétique	30
1.3.2. Méthylation de l’ADN.....	32
1.3.3. Facteurs intrinsèques	35
1.3.4. Facteurs extrinsèques.....	36
1.4. Problématique et hypothèses.....	37
CHAPITRE 2 - SIGNATURE DE MÉTHYLATION DE L’ADN DES RÉCEPTEURS DE L’INTERLEUKINE 1 DANS L’ASTHME ET L’ALLERGIE / DNA METHYLATION SIGNATURE OF INTERLEUKIN 1 RECEPTORS IN ASTHMA AND ATOPY.....	39
2.1. Avant-propos.....	40
2.2. Résumé	42
2.3. Abstract	42
2.4. Introduction.....	42
2.5. Clinical characteristics and methods	43
2.6. Results	44
2.7. Discussion	44
2.8. Conclusions.....	45
2.9. Acknowledgements.....	45
2.10. References.....	51

CHAPITRE 3 – SIGNATURE DE MÉTHYLATION DU GÈNE DE L’INTERLEUKINE 33 DANS DES CELLULES ÉPITHÉLIALES BRONCHIQUES D’INDIVIDUS ASTHMATIQUES / ASTHMA-INDUCED REGULATION OF IL33 GENE EXPRESSION BY DNA METHYLATION IN AIRWAY EPITHELIUM	54
3.1. Avant-propos	55
3.2. Résumé	58
3.3. Capsule summary	58
3.4. Introduction.....	58
3.5. Results	59
3.6. Discussion	59
3.7. Conclusions.....	61
3.8. Disclosure of potential conflict of interest.....	61
3.9. References.....	65
3.10. Appendix - Methods	67
3.10.1. Bronchial epithelial cell lines (BECs).....	67
3.10.2. DNA methylation level measure.....	67
3.10.3. Expression study	68
3.10.4. Statistical analyses	68
3.10.5. Identification of potential binding motifs	68
3.10.6. References.....	69
CHAPITRE 4 - DISCUSSION.....	70
4.1. Association épigénétique entre les récepteurs de type 1 et 2 de l’interleukine 1 et l’asthme 70	
4.1.1. Discordance entre les résultats d’expression du récepteur 2 de l’interleukine 1 obtenus et ceux rapportés dans la littérature scientifique	71
4.1.2. Signature de méthylation pour le récepteur de type 2 de l’interleukine 1 dans l’asthme et le lupus systémique érythémateux, deux pathologies à composantes inflammatoire.....	73
4.2. Association épigénétique entre l’interleukine 33 et l’asthme.....	74
4.3. Limites de l’étude	77
4.3.1. Choix des modèles cellulaires	77
4.3.2. Intégration de la composante environnementale.....	78
CHAPITRE 5 – CONCLUSION ET PERSPECTIVES	79
5.1. Conclusion générale de l’étude.....	79
5.2. Perspectives	80
RÉFÉRENCES.....	81

Liste des tableaux

Table 1. Clinical characteristics of individuals from the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial collection	46
Table 2. Summary of DNA methylation analysis on promoter of two interleukin 1 receptors in whole blood samples from Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial collection	47
Table 3. Clinical data of healthy controls and asthmatic individuals	62

Liste des figures

Figure 1. Installation du mécanisme de réponse allergique.....	4
Figure 2. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et la persistance de l'inflammation et dans le remodelage des voies respiratoires.....	12
Figure 3. Déterminants génétiques de l'asthme	17
Figure 5. Représentation simplifiée de certains gènes de la famille de l'interleukine 1 localisés sur le locus 2q12-14.....	20
Figure 6. Schématisation de la structure moléculaire des récepteurs de types 1 et 2 de l'interleukine 1	23
Figure 7. Cascade de signalisation intracellulaire lors de la formation du complexe de l'interleukine 1 et son récepteur actif.....	24
Figure 8. Schématisation du gène de l'interleukine 33 codé par le locus 9p24,1	26
Figure 9. Signalisation intracellulaire induite par la libération de l'interleukine 33 suite à la stimulation par un allergène	27
Figure 10. Facteurs déclenchants de l'asthme	30
Figure 11. Mécanismes épigénétiques du chromosome à l'ADN.....	32
Figure 12. Régulation de la transcription par la méthylation de l'ADN.....	34
Figure 13. Association between CpGs' DNA methylation levels for <i>IL1R2</i> and gene expression in asthma and atopy.....	48
Figure 14. DNA methylation at the <i>IL33</i> promoter region and gene expression in asthma.....	63
Supplementary Figure 1. Schematic representation of <i>IL1R1</i> and location of epigenotyped CpG sites.....	49
Supplementary Figure 2. Potential binding sites for transcription factors in <i>IL1R1</i> and <i>IL1R2</i>	50
Supplementary Figure 3. Potential binding sites for transcription factors in interleukine 33 promoter gene locus	64

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
BEC : Cellule épithéliale bronchique
CCL11 : Éotaxine-1
CCL5 : *Chemokine (C-C motif) ligand 5*
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CTCF : *Zinc finger protein*
CpG : Site cytosine-phosphate-guanine dinucléotide
CXCL5 : *Epithelial neutrophil-activating peptide 78*
DNA-me : Méthylation de l'ADN
FcεRI : Récepteur à forte affinité pour l'immunoglobuline de type E
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA1 : *Globin transcription factor 1*
GWAS : Genome-wide association study
GxE : Interaction gène-environnement
GxG : Interaction gène-gène
IFNγ : Interféron gamma
IgE : Immunoglobuline de type E
IL : Interleukine
IL-1 : Interleukine 1
IL1R1 : Récepteur 1 de l'interleukine 1
IL1R2 : Récepteur 2 de l'interleukine 1
IL1RAcP : Protéine accessoire du récepteur d'IL1
IL1RL1 : *Interleukine 1 receptor-like-1*
IL-1α : Interleukine 1 sous-unité alpha
IL-1β : Interleukine 1 sous-unité beta
IL-2 : Interleukine 2
IL-3 : Interleukine 3
IL-4 : Interleukine 4
IL-5 : Interleukine 5
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IL-10 : Interleukine 10
IL-12 : Interleukine 12
IL-13 : Interleukine 13
IL-25 : Interleukine 25
IL-33 : Interleukine 33
JNK : *c-Jun N-terminal kinase*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
miARN : Micro acide ribonucléique
MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*

NFκB : *Nuclear factor-kappa B*
NGF : *Nerve growth factor*
RPLP0 : *ribosomal protein, large, P0*
SLE : *Lupus érythémateux systémique*
SNP : *Polymorphisme d'un seul nucléotide*
T1R : *Toll-IL1-receptor*
TGFα : *Tumor necrosis factor alpha*
T_H : *Lymphocyte T auxiliaire*
T_H1 : *Lymphocyte T auxiliaire de type 1*
T_H17 : *Lymphocyte T auxiliaire de type 17*
T_H2 : *Lymphocyte T auxiliaire de type 2*
TLR : *Toll-like receptor*
TNFα : *Tumor necrosis factor alpha*
TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*
TSS : *Transcription start site*
TSLP : *Thymic stromal lymphopietin*
Δβ : *Différence de méthylation*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche Dre Catherine Laprise pour m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche. Je te remercie également d'avoir cru en mes capacités de poursuivre au deuxième cycle. Tu as été pour moi un mentor, une inspiration et une source de motivation substantielle.

Un sincère remerciement est également à souligner pour les membres du laboratoire de génétique et de protéomique, qui ont été pour moi des amis et des collègues, mais également des rayons de soleil dans un quotidien parfois parsemé de tracés sinueux.

J'aimerais remercier le Dr Luigi Bouchard et son étudiant au doctorat Simon-Pierre Guay pour leur collaboration aux travaux sur le récepteur de type 2 de l'interleukine 1.

J'aimerais également remercier la principale collaboratrice de l'étude sur l'IL-33, la Dre Jamila Chakir, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour avoir contribué si significativement à la réussite de ma maîtrise. J'aimerais également souligner l'importance du centre de recherche de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec (IUCPQ) dans la réalisation des travaux sur l'IL-33. C'est grâce à un accueil et à un soutien constant qu'il m'a été possible d'explorer l'utilisation d'un modèle fonctionnel dans cette étude.

Je souhaiterais également remercier mon entourage : ma famille, mes amis, mon conjoint, d'avoir cru en mon potentiel, de m'avoir épaulée dans mes décisions, quelles qu'elles soient. Je n'aurais jamais pu penser être celle que je suis aujourd'hui sans votre contribution à ma personnalité... à mes grandes ambitions. Je n'aurais jamais pu m'envoler de mes propres ailes comme une petite libellule.

Finalement, ceux qui me connaissent savent que je ne manquerai pas de souligner l'importance de mes trésors dans l'accomplissement de cette maîtrise. Mozart, Mowgli et Shere Khan ont contribué à ma zoothérapie quotidienne.

Avant-propos

Le présent document est séparé en 5 chapitres distincts. Le chapitre 1 permet de faire une mise en contexte du sujet de recherche. Il vise ainsi à introduire les notions de base sur la pathogénèse et la physiopathologie de l'asthme. Il permet également de mettre l'emphase sur les gènes qui ont été ciblés pour ces études, soient les récepteurs de type I et II de l'interleukine 1 (*IL1R1* et *IL1R2*) ainsi que l'interleukine 33 (*IL33*). Le premier chapitre tend à faire le pont entre la génétique et l'épigénétique en permettant l'intégration de cette dernière composante par le biais d'études de la méthylation de l'ADN. Les objectifs du présent projet sont également indiqués au terme du premier chapitre. Les chapitres 2 et 3 sont composés des articles issus de ce projet. Ils sont d'abord introduits par un avant-propos qui détaille l'implication de chacun des auteurs dans la réalisation de l'article. Le chapitre 2 comprend le premier article issu de ce projet. Celui-ci porte sur la signature de méthylation de l'ADN du gène *IL1R2* dans l'asthme et l'allergie qui a été identifiée dans un échantillon sanguin issu de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean. Cet article a été accepté par le journal *Clinical Epigenetics* le 11 juillet 2015. Le chapitre 3 est composé du deuxième article permettant de documenter la signature de méthylation du gène *IL33* dans l'asthme allergique. Cette seconde étude utilise des lignées de cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques provenant de personnes asthmatiques et de personnes non asthmatiques. Cet article a été soumis au *Journal of Allergy and Clinical Immunology* le 14 août 2015. Le chapitre 4 propose une discussion intégrée des éléments de résultats présentés dans les articles du mémoire. Elle ne se veut pas une répétition des éléments de discussion retrouvés dans les articles, mais plutôt une réflexion plus large des limites et de la contribution de ce travail au domaine. Finalement, le chapitre 5 présente les conclusions tirées de ce projet de recherche de même que les perspectives de celui-ci.

Chapitre 1 - Recension des écrits

Asthme

1.1.1. Description et prévalence

L'asthme est une maladie respiratoire chronique qui cause une oppression de la cage thoracique et provoque des sifflements, une respiration difficile et des épisodes de toux en raison d'une inflammation et d'un remodelage des voies respiratoires (Ganong 2005; Holgate 2011). Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 235 millions d'individus souffraient d'asthme en 2013 (OMS 2013). Statistique Canada estimait à environ 8% le nombre d'individus ayant été diagnostiqués asthmatiques avant ou pendant l'année 2013 (Statistique Canada 2014). Ce nombre réducteur ne tient compte que des individus âgés de plus de 12 ans diagnostiqués par un clinicien (Chen 2005). En 2007, le « Global Burden of Asthma » rapportait que 14,1% des canadiens avait déjà reçu un diagnostic d'asthme au cours de leur vie (Masoli *et al.* 2004). Cela plaçait alors le Canada au 10^e rang sur les 100 pays ayant la prévalence d'asthme la plus élevée (Masoli *et al.* 2004). De plus, cette prévalence est susceptible d'augmenter d'environ 20% au Canada au cours des deux prochaines décades, tous âges et sexes confondus (Masoli *et al.* 2004). Bien que cette prédiction englobe tous les canadiens, des études ont démontré que la prévalence et la sévérité de l'asthme variaient en fonction de l'âge et du sexe des individus. Lors de l'enfance, les garçons auraient plus de risques de développer la pathologie que les filles et exprimeraient des phénotypes plus sévères d'asthme. Lors de l'adolescence, la tendance serait inversée puisque les jeunes femmes seraient plus prédisposées à développer de l'asthme que les jeunes hommes (Bjornson et Mitchell 2000; Meurer *et al.* 2000). Or, à l'âge adulte, certains chercheurs prétendent que la prévalence entre les hommes et les femmes deviendrait relativement égale, alors que d'autres sous-entendent que les femmes seraient plus à risque (Chen *et al.* 2003).

L'asthme est une maladie dont les taux de mortalité et de morbidité sont élevés (Subbarao *et al.* 2009). Elle affecte considérablement la qualité de vie des individus atteints (Ahmed *et al.* 2014). Au Canada, les crises d'asthme causent plus de 146 000 hospitalisations annuellement (Ismaila *et al.* 2013). Il s'agit donc de la première cause

d'admission dans les hôpitaux chez la population en générale, de même que chez les enfants (Ismaila *et al.* 2013). Au Canada, les coûts directs reliés aux soins hospitaliers dans un contexte d'asthme varient entre 400\$ et 700\$ par patient (Ismaila *et al.* 2013). Les visites aux urgences des enfants pour des symptômes reliés à l'asthme totalisent 275 millions par an au Canada et il est estimé que chaque visite coûte en moyenne 1000\$ (Sears 2015). Ces coûts sont généralement dus à un mauvais contrôle de la maladie. Toujours au Canada, plus de 50% des individus souffrant d'asthme ne contrôlent pas adéquatement la maladie et il y avait plus de 300 décès évitables causés par l'asthme l'an dernier au Canada (Sears 2015). Ce mauvais contrôle peut être dû à deux facteurs : 1-les gens ne respectent généralement pas les doses et les fréquences des traitements (mauvaise adhésion au traitement ou observance thérapeutique) et; 2-le traitement ne suffit pas à diminuer les symptômes (patients non-répondants à la médication) (Szeffler 2015). Bien qu'il n'existe aucun remède pour l'asthme, les symptômes peuvent être atténués par le biais de divers traitements, incluant des bronchodilatateurs et des anti-inflammatoires (Bousquet *et al.* 2010). Or, le contrôle de l'asthme sévère est plus difficile et la communauté scientifique cherche encore à comprendre les causes du moins bon fonctionnement des traitements (Darveaux et Busse 2015). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie pourrait permettre d'améliorer la qualité des traitements, voir même de développer de meilleures thérapies.

1.1.2. Physiopathologie

Le système immunitaire constitue la défense naturelle contre les pathogènes. Lorsqu'une infection passe la barrière physique, le corps réagit en deux étapes successives soit par l'immunité innée, qui intervient dans les douze premières heures de l'infection, et par l'immunité acquise ou adaptative, qui peut perdurer jusqu'à plusieurs jours après l'introduction du pathogène (Chapel 2004). L'immunité acquise implique l'action de plusieurs cellules immunitaires circulantes appelées leucocytes, dont les lymphocytes B et T. L'immunité acquise peut se diviser en deux types de réponse, soit cellulaire ou humorale (Roitt 2007). Les anticorps sont produits lors de la réponse humorale par les lymphocytes B. Ils servent à cibler les corps étrangers. La réponse cellulaire met en jeu plusieurs cellules clés dont les lymphocytes T effecteurs CD8+ qui sont responsables de détruire les pathogènes (Roitt 2007). Les lymphocytes T auxiliaires CD4+ (T_H) sont également impliqués dans ce type de réponse, notamment en aidant les

autres types cellulaires à accomplir leurs fonctions immunitaires (Kaisho 2013). Les lymphocytes T CD4+ naïfs sont aussi appelés T_H0 puisqu'ils peuvent se spécialiser. Leur spécialisation déterminera les médiateurs chimiques qu'ils pourront sécréter (Pillai et Calhoun 2014). Les phases précoce et tardive de l'inflammation seront décrites ultérieurement et les principaux acteurs de ces processus seront détaillés.

La symptomatologie de l'asthme s'explique par des mécanismes clés dont l'inflammation, le remodelage des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique (Calhoun 2014). Or, l'activation de ces mécanismes nécessite un *stimulus* (Roitt 2007). Dans le présent mémoire, les allergènes représentent la source de *stimulus* puisqu'il s'agit de cohortes d'asthmatiques allergiques. Comme le développement de l'asthme allergique passe par un continuum allergie-asthme, il est nécessaire de préciser dans un premier temps comment se produit la sensibilisation aux allergènes. Le processus de réactions allergiques s'explique par les phases de sensibilisation et de réexposition (voir figure 1) (Bauer *et al.* 2015). La réponse allergique débute par l'entrée d'allergènes, des molécules inertes perçues à tort comme des pathogènes par le système immunitaire (Kim *et al.* 2014). Les allergènes ayant passé la barrière épithéliale sont d'abord internalisés par les cellules dendritiques (Kitamura *et al.* 2007). Ils sont ensuite dégradés en peptides dans le phagolysosome et présentés aux T_H0 par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Riese et Chapman 2000). Les T_H0 permettent de reconnaître ultérieurement les peptides allergéniques et se spécialisent en T_H2 provoquant un déséquilibre T_H1/T_H2 (Kool *et al.* 2012). Cette voie est caractérisée par la libération de glycoprotéines qui induisent l'inflammation (Hammad et Lambrecht 2006; Ray *et al.* 2010). Ces étapes seront décrites ultérieurement.

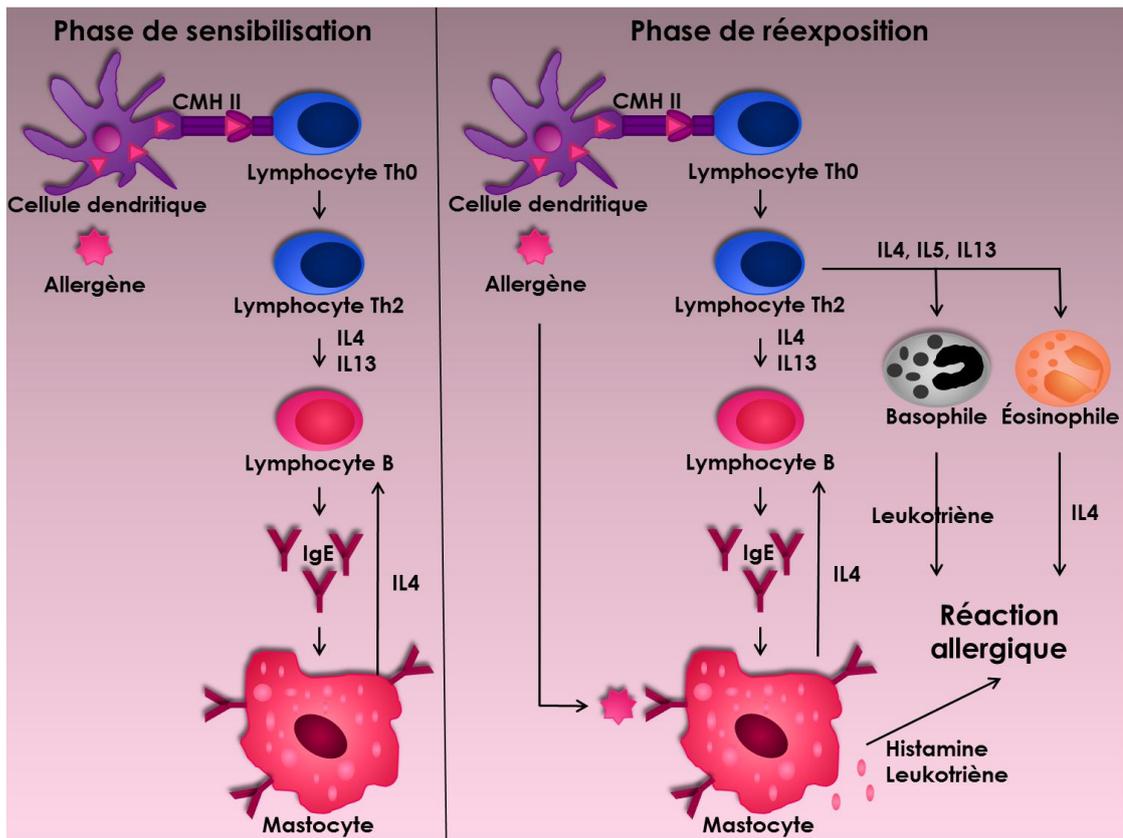


Figure 1. Installation du mécanisme de réponse allergique. Lors d'une première exposition aux allergènes (phase de sensibilisation), les lymphocytes T auxiliaires naïfs (Th0) se différencient en lymphocytes de type (Th2) grâce au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Cela permet de produire des récepteurs immunoglobulines E (IgE) à la surface des mastocytes. Lorsque l'allergène est rencontré de nouveau (phase de réexposition), il se fixera aux récepteurs du mastocytes, permettant une libération de médiateurs inflammatoires et une réaction d'allergie. L'allergène pourra également être internalisé par les cellules dendritiques pour réguler la différenciation des lymphocytes T. La réexposition pourra ensuite provoquer le recrutement de granulocytes (basophiles, éosinophiles) et entraîner une réaction d'allergie chronique (Modifiée de Taher *et al.* 2010).

La physiopathologie du processus inflammatoire de l'asthme sera présentée suivant les phases précoce et tardive et selon les principales cellules impliquées dans ces phases. Dans les sections suivantes, les cellules et les médiateurs ne sont pas présentés en détails, mais sont plutôt centrés sur les objectifs du présent mémoire.

1.1.2.1. Phase précoce de l'inflammation

La phase précoce ou phase aiguë de l'inflammation est la première réponse immunitaire suite à l'exposition aux *stimuli* inhalés. Elle se caractérise par un bronchospasme, qui est engendré entre autres par l'activation des cellules épithéliales des voies respiratoires et des mastocytes qui sont déjà localisés au site de la réaction (Murdoch et Lloyd 2010). Les mastocytes activés libèrent des médiateurs chimiques incluant l'histamine, la prostaglandine et les leucotriènes. Cette triade de médiateurs provoque ensuite une augmentation de la vascularité des poumons et permettront ainsi une infiltration des médiateurs de la phase tardive de réponse immunitaire (Hall et Agrawal 2014).

1.1.2.1.1. Épithélium bronchique

La communauté scientifique a longtemps pensé que le rôle des cellules épithéliales des voies respiratoires dans le processus de réponse inflammatoire se limitait à la constitution d'une barrière physique de défense contre les pathogènes et les allergènes. Or, il est aujourd'hui connu que les fonctions immunitaires épithéliales permettent la libération de médiateurs pro-inflammatoires par le biais de récepteurs antigènes-épithélium (Lloyd et Saglani 2015). Les médiateurs impliqués dans la réponse inflammatoire précoce compte entre autres les cytokines *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), l'interleukine (IL)-25 et l'IL-33 (Ziegler 2012). Ces cytokines interagissent avec plusieurs cellules immunitaires incluant les cellules dendritiques, les lymphocytes T, les éosinophiles, les mastocytes et les cellules musculaires des voies respiratoires (West *et al.* 2012). Les rôles de ces cytokines dérivées des cellules épithéliales dans l'inflammation se résument à accroître la réponse T_H2 , activer les macrophages et supprimer la tolérance aux antigènes dans les poumons (Hall et Agrawal 2014). Les cellules épithéliales des voies respiratoires sont également aptes à libérer les protéines du surfactant (Hall et Agrawal 2014). Ces protéines hydrophiles tapissent les voies respiratoires pour produire une barrière physique supplémentaire contre les pathogènes et les allergènes (Kishore *et al.* 2006). L'épithélium bronchique peut également sécréter de l'activine A, qui appartient à la famille des facteurs de croissance (Hall et Agrawal 2014), laquelle est impliquée dans le développement et la réparation tissulaire. Elle est également impliquée dans la régulation de divers éléments de l'inflammation, mais les

résultats de diverses recherches réalisées ne suffisent pas actuellement à déterminer si ce médiateur chimique agit comme une molécule pro- ou anti-inflammatoire (Karagiannidis *et al.* 2006; Semitekolou *et al.* 2009; Hall et Agrawal 2014).

1.1.2.1.2. Mastocytes et basophiles

Les **mastocytes** sont d'abord impliqués dans la sensibilisation aux allergènes. Le mécanisme d'installation de la réponse allergique a été décrit précédemment. Les mastocytes expriment à leur surface des récepteurs à forte affinité pour l'IgE (FcεRI) qui se fixent ensuite aux IgE sécrétés par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes (Stone *et al.* 2010). Lors d'une réexposition, les mastocytes seront très rapidement activés. Il s'agit donc de cellules importantes dans la réponse inflammatoire précoce puisque suite à l'introduction d'antigènes, ils sont aptes à libérer très rapidement des médiateurs chimiques (histamine, prostaglandine, leucotriènes) qui agissent ensuite sur les cellules musculaires lisses et les cellules inflammatoires dont, entre autres, les lymphocytes B et T, les cellules épithéliales et musculaires des voies respiratoires (Amin 2012). Les mastocytes pourraient également être impliqués dans la réponse inflammatoire tardive puisqu'ils contribuent au recrutement des éosinophiles, à la libération de l'interleukine 4 (IL-4) (Mayr *et al.* 2002) ainsi qu'à la prolifération des cellules musculaires lisses (Alkhoury *et al.* 2014).

Les **basophiles** ressemblent en plusieurs points aux mastocytes puisqu'ils sont activés par la fixation d'antigènes aux IgE localisés à leur surface et sécrètent également de l'histamine et des leucotriènes (Schroeder 2009; Stone *et al.* 2010). De plus, les basophiles peuvent contribuer à la différenciation des lymphocytes T vers la voie T_H2 (Hall et Agrawal 2014) par le biais de deux mécanismes biologiques. D'abord, ils peuvent sécréter de l'IL-4 qui influence la différenciation des lymphocytes T_H0 (Sokol *et al.* 2008). Ensuite, ils seraient aptes à présenter les antigènes à ces mêmes lymphocytes T_H0 en voyageant jusqu'aux ganglions lymphatiques (Sokol *et al.* 2008; Hall et Agrawal 2014).

Dans le but de mieux comprendre le rôle des mastocytes et des basophiles dans la réponse inflammatoire, il est nécessaire de décrire les médiateurs chimiques spécifiques libérés par ces deux types de cellules. L'histamine, la prostaglandine et les

leucotriènes sont les principales substances chimiques libérées par les mastocytes et les basophiles dans un contexte inflammatoire.

L'histamine est une amine qui peut se fixer à quatre types de récepteurs, exprimés par de nombreuses cellules dans les poumons (leucocytes, cellules épithéliales et musculaires) (Hall et Agrawal 2014). Une fois fixées à l'un ou l'autre de ces récepteurs, l'histamine peut engendrer la contraction du muscle lisse dans les voies respiratoires, l'hypersécrétion de mucus par les cellules à gobelet et la production d'oxyde nitrique (Neumann *et al.* 2010).

La prostaglandine est un métabolite de l'acide arachidonique qui peut agir dans les réactions d'oxydo-réduction (Hall et Agrawal 2014). Elle peut également se fixer à des récepteurs qui sont localisés à la surface des lymphocytes T_{H2}, des éosinophiles et des basophiles (Ricciotti et FitzGerald 2011). Une fois fixée, la prostaglandine entraîne la bronchoconstriction, la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le recrutement des éosinophiles (Arima et Fukuda 2011).

Les leucotriènes sont des eicosanoïdes qui peuvent se fixer aux mastocytes, aux lymphocytes B, aux éosinophiles et aux macrophages (Singh *et al.* 2010). Ils sont impliqués dans la bronchoconstriction, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'activation des éosinophiles et l'hypersécrétion de mucus (Hallstrand et Henderson 2010).

1.1.2.1.3. Cellules lymphoïdes innées de type 2

Les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2) ont récemment été identifiées pour leur implication dans la pathogénèse de l'asthme (Neill *et al.* 2010). Ces dernières sont activées par les cytokines épithéliales IL-33 et IL-25 (Halim et McKenzie 2013). Ces cellules impliquées dans la réponse immune innée ressemblent aux lymphocytes T puisqu'elles sont activées par des voies biologiques similaires et engendrent la sécrétion de plusieurs cytokines communes (Hepworth et Sonnenberg 2014). En effet, les ILC2 sont une source d'IL-13 dans les poumons et sont donc impliquées dans l'hyperréactivité bronchique et dans l'inflammation des voies respiratoires (Barlow *et al.* 2012). Certains

chercheurs pensent que les ILC2 contribueraient également à la réponse inflammatoire tardive, mais cette hypothèse devra être validée (Hall et Agrawal 2014).

1.1.2.2. Phase tardive de l'inflammation

La phase tardive de l'inflammation survient, comme son nom l'indique, après la phase précoce. Il est toutefois difficile de bien séparer ces deux stades inflammatoires puisqu'il existe de nombreuses interactions entre les cellules immunitaires innées impliquées dans la phase inflammatoire précoce et les cellules immunitaires adaptatives impliquées dans la phase tardive (Hall et Agrawal 2014). Or, la phase tardive comprend principalement l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T, recrutés par les médiateurs chimiques libérés par les mastocytes et les cellules épithéliales lors de la phase précédente (Holgate 2012). Les lymphocytes T différenciés permettront ensuite le recrutement d'autres lymphocytes T, des éosinophiles et des neutrophiles dans les voies respiratoires (Hall et Agrawal 2014).

1.1.2.2.1. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (Roitt 2007). Elles sont localisées dans l'épithélium des voies respiratoires dans le but de détecter la présence d'antigènes (Hall et Agrawal 2014). Lorsqu'elles captent un antigène, elles le dégradent en peptides dans le phagolysosome et voyagent jusqu'aux ganglions lymphatiques (Gaurav et Agrawal 2013). Elles le présentent ensuite aux lymphocytes T non différenciés. Elles peuvent présenter les peptides aux lymphocytes T effecteurs par le CMH de classe I ou aux lymphocytes T_{H0} par le CMH de classe II (Roitt 2007). Elles permettront ensuite leur spécialisation.

1.1.2.2.2. Lymphocytes T

La réponse inflammatoire implique plusieurs cellules dont les lymphocytes T (Roitt 2007). Les lymphocytes T effecteurs (CD8+) ciblent les pathogènes pour les détruire. Les lymphocytes T auxiliaires (T_H) (CD4+) soutiennent les cellules immunes dans l'accomplissement de leurs fonctions grâce à la libération de médiateurs inflammatoires (Kaisho 2013). Les lymphocytes T_{H0} peuvent se différencier en de

nombreux types de cellules spécialisées, ce qui leur permettra d'être impliqués de diverses manières dans le processus inflammatoire (Pillai et Calhoun 2014). Les premières voies de différenciation des lymphocytes T ayant été identifiées sont les T_{H1} et T_{H2} (Roitt 2007). En situation d'homéostasie, ces deux voies sont, en théorie, sollicitées de manière relativement égale. Or, certaines pathologies résultent d'un déséquilibre des voies T_{H1}/T_{H2}. Ainsi, le développement et la persistance des maladies allergiques résulteraient d'un excès de T_{H2} dans le tissu pulmonaire (Gaurav et Agrawal 2013). Ce paradigme a été conservé et respecté jusqu'en 2005 où une nouvelle voie de différenciation a été identifiée : la voie T_{H17} (Harrington *et al.* 2005). Depuis, l'implication de la voie T_{H17} dans le recrutement et l'infiltration de cellules inflammatoires a clairement été illustrée et démontrée (Peck et Mellins 2009). Les voies T_{H1} et T_{H17} ont également été associées au développement et à la persistance de maladies allergiques, incluant l'asthme (Lu *et al.* 2015; Vocca *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015a). Or, les voies T_{H1} et T_{H17} sont principalement reliées à l'asthme neutrophilique contrairement à la voie T_{H2} qui est plutôt associée à l'asthme éosinophilique (Pelaia *et al.* 2015).

Les cytokines T_{H2} sont principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-33 (Hall et Agrawal 2014). Ces cytokines ont toutes été génétiquement associées à l'asthme (Mukherjee et Zhang 2011) et elles contribuent au remodelage des voies respiratoires qui caractérise les asthmatiques notamment par le recrutement et l'activation des éosinophiles (principalement par IL-4, IL-5 et IL-13) (Pelaia *et al.* 2015) et des macrophages alvéolaires (entre autres par IL-33) (Bunting *et al.* 2013).

Enfin, d'autres voies de différenciation des T_H ont été identifiées dans la pathogénèse de l'asthme. Parmi ces voies, il y a les T_{H9}, T_{H22} et T_{H25} (Vock *et al.* 2010). Bien que ces voies aient été associées à l'asthme dans des modèles animaux, leur implication dans le développement de maladies humaines est encore spéculative (Vock *et al.* 2010).

1.1.2.2.3. Éosinophiles

Les éosinophiles, principalement recrutées par la libération d'IL-5 par les T_H2 et les ILC2, ont été associés à de nombreuses maladies allergiques incluant l'asthme (Busse et Sedgwick 1992; Deckers *et al.* 2013; Hall et Agrawal 2014). Ces cellules circulantes appartiennent à la famille des granulocytes au même titre que les basophiles et les neutrophiles (Roitt 2007). Cette famille de cellules immunitaires s'appelle granulocytes puisqu'elles contiennent des granules qui peuvent être libérées dans l'organisme en réponse à plusieurs *stimuli*, incluant les pathogènes et les allergènes (Davoine et Lacy 2014). Les granules des éosinophiles sont composées de peroxydases, de protéines basiques majeures et de protéines cationiques (ou protéines cationiques de l'éosinophile) (Hogan *et al.* 2008). Les peroxydases sont les médiateurs qui attirent les macrophages aux pathogènes à éliminer (Wolthers 2003). Les protéines basiques majeures, conjointement aux protéines cationiques, se lient à certains pathogènes pour fragmenter leur membrane (Hogan *et al.* 2008). Elles permettent également la dégranulation des basophiles par les canaux calcium pour libérer l'histamine dans les tissus (Kierszenbaum 2002). Les protéines cationiques peuvent également neutraliser l'héparine, ce qui permet la coagulation. Les éosinophiles peuvent également libérer de nombreuses cytokines, chimiokines, enzymes et facteurs de croissance pour perpétuer l'inflammation dont l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-13, l'interféron-gamma (IFN γ), le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), le *nerve growth factor* (NGF), le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), le *stem cell factor*, le *transforming growth factor alpha* (TGF- α), le *chemokine (C-C motif) ligand 5* (CCL5), l'éotaxine-1 (CCL11), le *growth-related oncogene alpha* et l'*epithelial neutrophil-activating peptide 78* (CXCL5) (Muniz *et al.* 2012; Davoine et Lacy 2014). Les éosinophiles sont donc impliqués dans l'initiation, la propagation et la résolution des réponses immunes innée et adaptative (Travers et Rothenberg 2015).

1.1.2.2.4. Neutrophiles

Les neutrophiles ont également été associés à certains types d'asthme incluant les formes les plus sévères (Pelaia *et al.* 2015). Ils sont recrutés au site de l'inflammation par les cytokines libérées principalement par les T_H1 et T_H17 (IL-8 et IL-17) (Hall et Agrawal 2014). Les neutrophiles activés libèrent ensuite leurs granules. Les granules

contiennent de l'IL-8 et des facteurs de croissance (Monteseirin 2009; Bogaert *et al.* 2011). La sécrétion d'IL-8 par les neutrophiles entraîne une boucle de rétro-activation. Les granules libérées par les neutrophiles contiennent également des élastases et des métalloprotéases (Kierszenbaum 2002). Ensemble, ces enzymes augmentent la perméabilité vasculaire, la sécrétion de mucus et contribuent à la bronchoconstriction (Hall et Agrawal 2014). Encore aujourd'hui, des efforts considérables sont en cours dans différents laboratoires de recherche afin de mieux définir le rôle des neutrophiles dans le développement et la persistance des formes moins sévères d'asthme (Pelaia *et al.* 2015).

La figure suivante présente les différentes cellules et les médiateurs qui sont impliqués dans les phases précoce et tardive de l'inflammation.

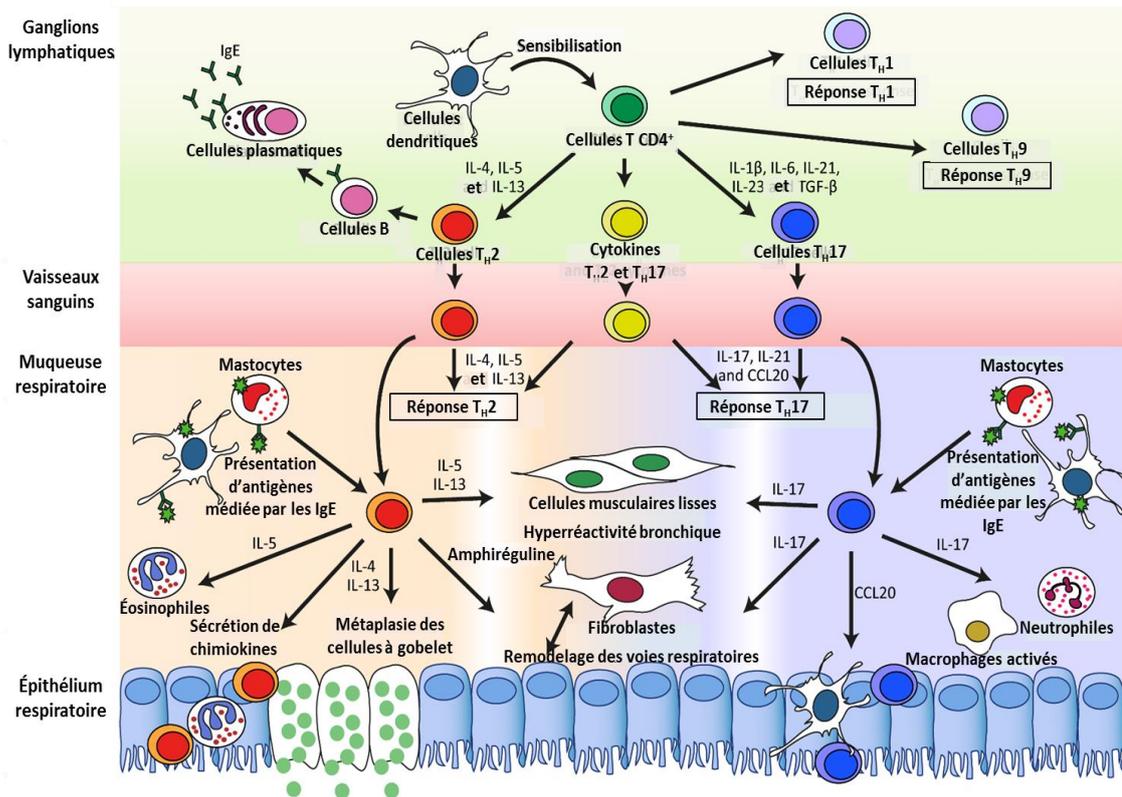


Figure 2. Mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et la persistance de l'inflammation et dans le remodelage des voies respiratoires. Cette figure schématise l'implication des lymphocytes T auxiliaires (T_H) $CD4^+$ dans le développement et la persistance de l'asthme. Suite à une première exposition, les allergènes activent les cellules dendritiques qui migrent dans les ganglions lymphatiques. C'est à cet endroit que se fait la sensibilisation des lymphocytes T naïfs $CD4^+$ (T_H0). Les voies de différenciation T_H2 et T_H17 sont priorisées chez les individus asthmatiques. La voie T_H2 se caractérise par la sécrétion d'interleukine (IL)-4, IL-5 et IL-13 alors que la voie T_H17 met en jeu l'IL-1, l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le *transforming growth factor-beta* ($TGF\beta$). Les lymphocytes T activés migrent alors dans les vaisseaux sanguins pour se rendre aux cellules dendritiques localisées dans le tissu pulmonaire. Les médiateurs de l'inflammation pro- T_H2 sont libérés dans le tissu et engendrent l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires par le biais de plusieurs mécanismes dont le recrutement et l'activation des cellules éosinophiles, la métaplasie des cellules à gobelet, le remodelage des voies respiratoires par les fibroblastes et l'épithélium bronchique. Ces processus s'accompagnent d'une hyperactivité bronchique causée principalement par une hyperplasie et une hypertrophie du muscle lisse des voies respiratoires. Les médiateurs chioimioattractants pro- T_H17 permettent le recrutement des cellules T_H17 , des neutrophiles, des cellules dendritiques et des macrophages alvéolaires (Catherine Laprise ©).

1.1.2.3. Remodelage des voies respiratoires

L'inflammation engendrée par l'excès de cellules T_H1, T_H2 et/ou T_H17 favorise l'activation et le recrutement de divers types de cellules immunitaires incluant les éosinophiles et neutrophiles, les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes (Dunnill 1971; Kroegel *et al.* 1994; Metcalfe *et al.* 1997; Coico et Sunshine 2009). Les cellules migrent à travers la membrane basale et provoquent le remodelage des voies respiratoires des personnes asthmatiques. D'abord, les cellules épithéliales bronchiques sont endommagées et se détachent de la membrane basale, clivant les jonctions épithéliales (Heijink *et al.* 2014). Cela fragilise l'épithélium bronchique et altère considérablement son rôle de barrière physique contre les agressions (Lozewicz *et al.* 1990). De plus, l'altération de l'épithélium bronchique favorise la sécrétion de facteurs de croissance, qui viennent augmenter la prolifération de fibroblastes (hyperplasie) et créer une fibrose sous-épithéliale (Zhang *et al.* 1999). Les fibroblastes peuvent également se différencier en divers types cellulaires. Dans les bronches d'individus asthmatiques, ils peuvent se différencier en myofibroblastes, ce qui peut contribuer à augmenter la masse du muscle lisse et peut diminuer par le fait même la lumière bronchique (Michalik *et al.* 2009). Holgate et ses collègues ont démontré que la plus grande quantité de myofibroblastes observée chez les individus asthmatiques était également corrélée avec l'épaisseur de la couche inférieure de la membrane basale (*lamina reticularis*) (Holgate 2011). Les cellules épithéliales bronchiques endommagées et les myofibroblastes hypertrophiés, et plus nombreux, favorisent la synthèse anormale de facteurs fibrogéniques. Parmi ceux-ci on retrouve la fibronectine, le collagène de type I, III et V ainsi que d'autres protéines provenant de la matrice extracellulaire (Pepe *et al.* 2005). Cette accumulation de substances pro-fibrotiques entraînera l'épaississement de la *lamina reticularis* (Jeffery *et al.* 2003). De plus, les myofibroblastes entraînent la sécrétion de médiateurs chimiques pro-inflammatoires, qui contribuent à la persistance de l'asthme (Al-Muhsen *et al.* 2011). Ces médiateurs chimiques pourraient être impliqués dans l'hyperplasie des cellules à gobelet et dans la synthèse de mucine, menant à l'hypersécrétion de mucus qui contribue à la diminution de la lumière bronchique (Turner et Jones 2009).

1.1.3. Phénotypes

L'asthme peut être divisé en différentes catégories suivant le type cellulaire activé et augmenté (asthme neutrophilique ou éosinophilique), ou encore suivant le facteur qui déclenche les symptômes respiratoires (exercice, allergène, tabac, froid, etc.) (Chen *et al.* 2006; Dales *et al.* 2008). Dans le cadre de ce projet, la classification basée sur le facteur déclencheur a été utilisée, ici la sensibilisation aux allergènes, qui constitue la cause la plus fréquente d'asthme (Martinez 2011). En effet, depuis 1980, le pourcentage d'adultes et d'enfants asthmatiques également allergiques sont estimés respectivement à 50% et 80% (Haahtela *et al.* 1980; Gold 2000). L'asthme allergique peut être induit par n'importe quel allergène (antigène provoquant de l'allergie) (Johansson *et al.* 2001; Handoyo et Rosenwasser 2009). En effet, la sensibilisation à divers aéroallergènes (i.e. allergènes inhalés) incluant notamment l'exposition aux acariens, aux squames d'animaux, à certains *fungi* et aux pollens d'arbres et d'herbacés est considérée comme un facteur de risque de l'asthme (Baxi et Phipatanakul 2010). Les asthmatiques allergiques peuvent être sous-divisés selon l'activation ou non d'IgE spécifiques (Johansson *et al.* 2001) ou selon le niveau sérique d'IgE (Laprise 2014).

Composante génétique de l'asthme

L'implication d'une composante génétique dans le développement de l'asthme est bien documentée. Les premières études familiales réalisées par Cooke et ses collègues en 1916 et en 1924 ont permis de démontrer des différences de prévalence de l'asthme dans la parenté selon le statut asthmatique du *propositus* (Mathias 2014). Ces résultats ont par la suite été validés dans plusieurs autres études familiales (Schwartz 1952; Gerrard *et al.* 1976; Dold *et al.* 1992; Aberg 1993; Laprise et Boulet 1996) et dans des cohortes de jumeaux (Edfors-Lubs 1971; Duffy *et al.* 1990). L'asthme est hérité en partie des parents, mais il est aujourd'hui connu que le mode de transmission n'est pas Mendélien (Los *et al.* 2001). Des études ont permis de démontrer que l'asthme suivait un modèle polygénique qui comprend de la codominance, de la dominance et de la récessivité (Mathias 2014). Ces études témoignent de la complexité de la maladie et permettent de reconnaître que l'asthme est un trait complexe où les interactions gène-gène (GxG) et les interactions gène-environnement (GxE) modulent la sévérité de l'atteinte (Mathias 2014).

Dans le but d'identifier des régions chromosomiques liées à l'asthme, plusieurs études pangénomiques de liaisons (*Genome scan*) ont été réalisées en se basant sur l'utilisation de microsatellites hautement polymorphiques dans l'ADN (Daniels *et al.* 1996; Wills-Karp et Ewart 2004; Denham *et al.* 2008; Bouzigon *et al.* 2010). L'utilisation de ce type d'études a permis d'identifier pas moins de 20 régions chromosomiques associées à l'asthme et aux phénotypes reliés (Mathias 2014). Moffatt et ses collègues ont d'ailleurs associé les *loci* 2q12,1 et 9p24,1 à l'asthme, *loci* codant pour plusieurs gènes de la famille de l'IL-1 (Moffatt *et al.* 2010). Ces *loci* de susceptibilité ont permis de souligner la potentielle implication de plusieurs gènes dans la physiopathologie. Toutefois, les limites de cette approche méthodologique comprennent entre autres la taille substantielle des régions à explorer à la recherche des variants génétiques et la faible capacité de détection des gènes à effets modestes (Ober et Yao 2011). Ainsi, dans le but d'optimiser les travaux visant à dresser le « catalogue » des gènes d'asthme, de nouvelles technologies ont été mises sur pied.

Deux types d'approches ont été développés à la suite des études pangénomiques de liaisons (*Genome scan*), la première est l'approche par gène candidat (Mathias 2014). Cette approche est basée sur la recherche de déterminants génétiques dont les fonctions biologiques sont connues pour avoir un lien logique avec la physiopathologie (Vercelli 2008; Mathias 2014). Ces fonctions biologiques sont généralement classées selon 4 grandes catégories selon l'implication du gène dans : 1) l'immunité et l'immunorégulation; 2) la différenciation des lymphocytes T_{H0} vers la voie T_{H2}; 3) l'immunité reliée à la surproduction de mucus par les cellules épithéliales; et 4) les fonctions respiratoires, soient essentiellement, le remodelage des voies respiratoires et la sévérité de la maladie (Vercelli 2008). Cette approche a toutefois permis de valider l'association entre plus de 30 gènes et le développement et la persistance de l'asthme et des allergies parmi lesquels *IL1* et *IL33* (Ober et Yao 2011). Il est à noter que cette approche est limitée en termes de découverte de nouveaux gènes de susceptibilité puisqu'elle se base sur les fonctions biologiques déjà connues des gènes sélectionnés.

Le second type d'approche se base quant à lui sur des associations pangénomiques en utilisant les variants génétiques communs ou polymorphismes (SNP) de l'ADN. Ces études ont été possibles grâce au projet « *Thousand Genomes Projects* » qui a permis l'identification de plus de 35 millions de variants génétiques communs

(Abecasis *et al.* 2010). En sachant que les SNP peuvent être transmis en déséquilibre de liaison (transmission conjointe de SNP fortement corrélés), il a été possible de réaliser des études à l'échelle génomique plutôt que de cibler les gènes candidats (Mathias 2014). Ces études pangénomiques (*Genome-wide association study* : GWAS) reposent sur l'hypothèse que les maladies fréquentes doivent être causées par des SNP. Le premier GWAS en lien avec l'asthme a été publié en 2007 (Moffatt *et al.* 2007). Depuis, plus de 1000 nouveaux gènes candidats ont été identifiés grâce aux GWAS (Garcia-Sanchez *et al.* 2014). En 2011, 4 gènes avaient déjà été associés dans plus de 15 GWAS (incluant *TNF*, *IL4*, son récepteur et *IL13*), 6 gènes dans plus de 10 GWAS (incluant, entre autres, *TGFβ*) et 11 gènes dans plus de 5 GWAS (dont notamment *IL10*) (Murk *et al.* 2011).

Grâce à la combinaison de ces différentes approches, plus de 300 gènes ont déjà été associés à l'asthme et à l'allergie grâce à diverses études d'association par gène candidat et études d'associations pangénomiques lesquelles ont été validées dans des études indépendantes (Lee *et al.* 2011). Ces gènes de susceptibilité comprennent des cytokines pro-inflammatoires dont l'*IL1* et l'*IL33* qui sont considérés aujourd'hui comme des « *gold standards* » dans l'asthme allergique puisqu'ils ont été associés dans au moins dix études indépendantes (Moffatt *et al.* 2010; Torgerson *et al.* 2011). La figure suivante permet de visualiser les différentes régions chromosomiques ayant été associées à l'asthme avec une emphase sur IL-1 et IL-33. Les récepteurs de ces cytokines ont également été associés à l'asthme ce qui renforce l'implication biologique de ces médiateurs de l'inflammation (Gudbjartsson *et al.* 2009; Moffatt *et al.* 2010; Torgerson *et al.* 2011; Ramasamy *et al.* 2012; Wan *et al.* 2012; Wjst *et al.* 2013).

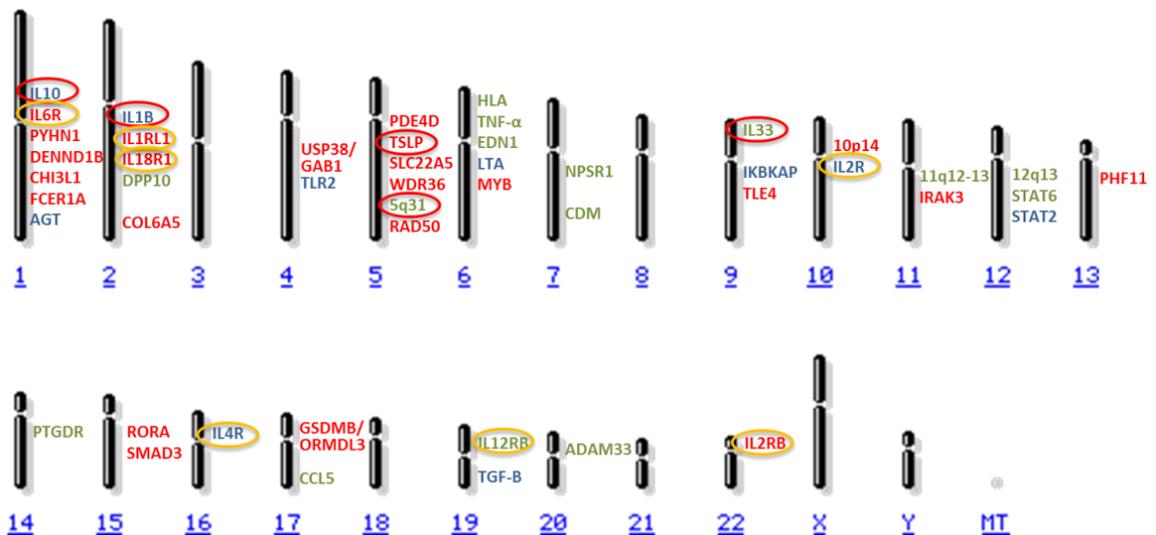


Figure 3. Déterminants génétiques de l'asthme. Cette schématisation représente les autosomes, les chromosomes sexuels et le génome mitochondrial. Les gènes associés à l'asthme sont indiqués à droite des chromosomes. Les gènes et les *loci* présentés en rouge indiquent les associations génétiques réalisées par une approche pangénomique (*Genome scan* ou GWAS) alors que les gènes et les *loci* en bleu ont été associés à l'asthme par approche gène candidat. Ceux inscrits en verts ont été associés à l'asthme à l'aide des deux approches. Les cytokines sont encerclées en rouge et les récepteurs en jaune (Schwartz 1952; Gerrard *et al.* 1976; Dold *et al.* 1992; Aberg 1993; Laprise et Boulet 1996; Edfors-Lubs 1971; Duffy *et al.* 1990; Daniels *et al.* 1996; Wills-Karp et Ewart 2004; Denham *et al.* 2008; Bouzigon *et al.* 2010; Moffatt *et al.* 2010; Murk *et al.* 2011; Gudbjartsson *et al.* 2009; Torgerson *et al.* 2011; Ramasamy *et al.* 2012; Wan *et al.* 2012; Wjst *et al.* 2013).

1.2.1. Superfamille de l'interleukine 1

Une cytokine est un médiateur chimique qui se caractérise par son potentiel de communication cellule-cellule (Roitt 2007). Parmi les cytokines, les interleukines jouent un rôle important dans la communication entre les leucocytes (Coico et Sunshine 2009). En 2011, plus de 40 interleukines avaient déjà été identifiées (Akdis *et al.* 2011). Elles sont séparées en familles en fonction de leur champ d'action. La superfamille de l'IL-1 agit dans un contexte inflammatoire. L'inflammation est un mécanisme important dans la physiopathologie de l'asthme tel qu'il a été décrit précédemment et l'implication des membres de la famille de l'IL-1 dans ce processus justifie le choix de ces voies biologiques pour la présente étude. Les associations génétiques qui seront décrites

ultérieurement permettent également de souligner l'intérêt de ces cytokines immunopathologiques.

La superfamille de l'IL-1 comprend des ligands et des récepteurs Toll-like (TLR) qui sont caractérisés par la présence d'un domaine intracellulaire *Toll-IL1-receptor* (T1R) (Garlanda *et al.* 2013). L'activation du T1R entraîne une cascade de signalisation intracellulaire qui passe par l'adaptateur *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88). Cette cascade entraîne conjointement l'activation des tyrosines kinases *mitogen-activated* (MAPK) dont *c-Jun N-terminal* (JNK), et du facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NFκB) (Barton et Medzhitov 2003). L'activation de ces voies mène à la translocation des facteurs de transcription dans le noyau. Ces facteurs modulent l'expression de certains gènes dont les protéines associées ont une fonction dans l'augmentation et la persistance de l'inflammation (Martin et Resch 1988; Osborn *et al.* 1989; Subramaniam *et al.* 2004). Les ligands de la superfamille de l'IL-1 contribuent donc à la fois à la réponse immune innée et adaptative par le biais de l'activation des cellules lymphoïdes qui expriment leurs récepteurs spécifiques (Garlanda *et al.* 2013). Les voies biologiques de la superfamille de l'IL-1 sont activées en réponse à des pathogènes et des dommages cellulaires (Dinarello 2010). Toutefois, lorsque l'activation de ces voies devient excessive, il en résulte diverses immunopathologies, incluant les réponses allergiques (Dinarello *et al.* 2012).

1.2.2. Interleukine 1 et ses récepteurs

La famille de l'IL-1 comprend plusieurs ligands dont les sous-unités alpha et beta de l'IL-1 (IL-1 α et IL-1 β) qui possèdent une structure moléculaire similaire rappelant leur origine phylogénique (Dinarello 1996). La sous-unité α est une alarmine et est donc produite rapidement en guise de signal d'alarme suite à l'introduction d'un pathogène (Rider *et al.* 2011). Elle est produite principalement dans le poumon par les cellules épithéliales et endothéliales (Garlanda *et al.* 2013). La sous-unité β , contrairement à l'isoforme α , nécessite un clivage pour être active dans l'organisme et agit donc plutôt dans la réponse immunitaire tardive (Rider *et al.* 2011). Elle est sécrétée par les diverses cellules hématopoïétiques (Garlanda *et al.* 2013).

Les rôles de l'IL-1 dans la réponse immunitaire sont nombreux. D'abord, il s'agit d'un pyrogène, ce qui signifie que l'IL-1 contribue à l'activation de l'hypothalamus pour générer une augmentation de la température corporelle suite à l'introduction de pathogènes (Roitt 2007). Elle induit également la différenciation des lymphocytes T_{H0} en T_{H1}, T_{H2} et T_{H17} par le biais de l'activation des voies biologiques des protéines kinases mentionnées précédemment (Aymeric et Lefranc 2009). Ainsi, l'IL-1 est classée parmi les cytokines pro-inflammatoires, notamment parce qu'elle augmente la perméabilité vasculaire, ce qui crée la tuméfaction et la rougeur caractérisant le processus d'inflammation (Coico et Sunshine 2009).

Les études d'associations génétiques ont d'ailleurs permis de démontrer l'importance de mieux comprendre l'implication de l'IL-1 dans le développement et la persistance de l'asthme. En effet, le *locus* 2q12-14 qui comprend les gènes codant pour les membres de la famille de l'IL-1 (figure 4) a été associé à l'asthme dans plusieurs études d'association (Torgerson *et al.* 2011; Daley *et al.* 2012; Wan *et al.* 2012). De plus, l'IL-1 elle-même a été associée à plusieurs maladies auto-immunes incluant le diabète et l'asthme (Dinarello 2002). Des SNP situés à l'intérieur des gènes IL-1 α et IL-1 β ont également été associés à des maladies inflammatoires et ce, à l'intérieur même d'un échantillon de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean (figure 4) (Pociot *et al.* 1992; Daley *et al.* 2009; Manica-Cattani *et al.* 2009; Han *et al.* 2010; Mfunam Endam *et al.* 2010).

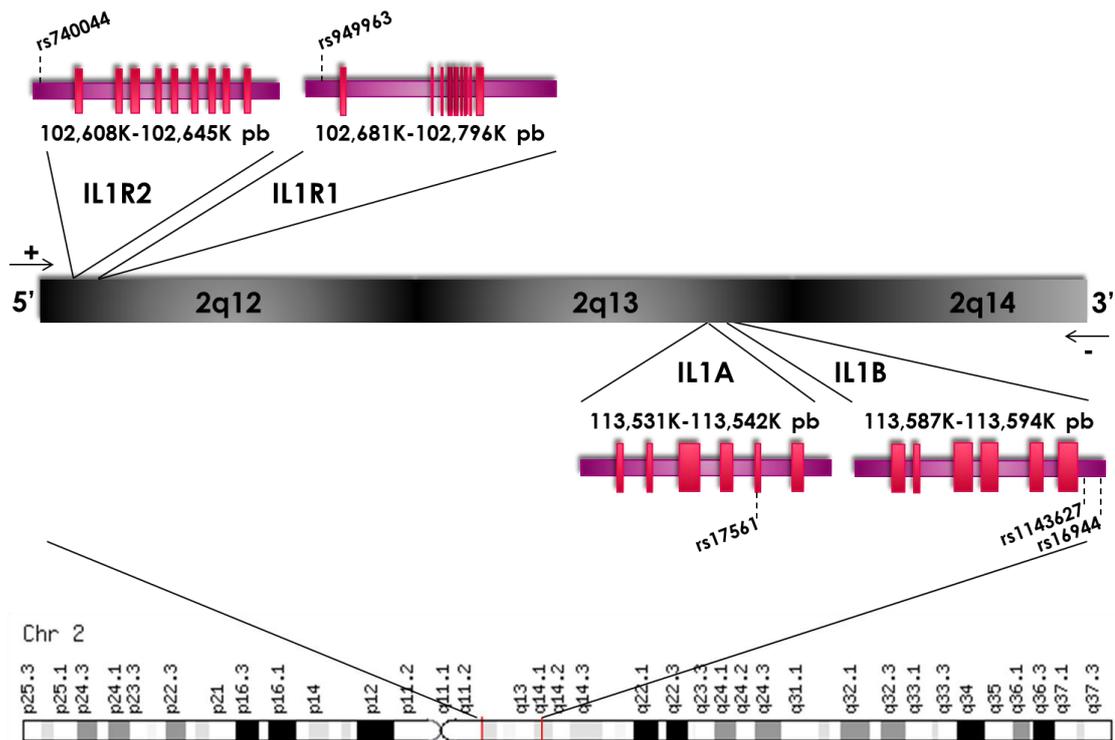


Figure 4. Représentation simplifiée de certains gènes de la famille de l'interleukine 1 localisés sur le locus 2q12-14. Les sous-unités α et β de l'IL-1 ainsi que les deux récepteurs principaux (type I et 2) sont codés par des gènes localisés dans le bras long du chromosome 2 dans la région 12 à 14. Les gènes codant pour les récepteurs sont lus sur la bande positive alors que les gènes des sous-unités de l'IL-1 sont lus sur la bande négative. La position chromosomique est indiquée en paires de bases et le gène est représenté avec le gène complet en violet et les exons en rouge. Les polymorphismes (SNP) associés à l'asthme et aux phénotypes reliés à l'asthme sont identifiés pour chaque gène utilisant la nomenclature usuelle, soit rs# (Karjalainen *et al.* 2002; Adjers *et al.* 2004; Daley *et al.* 2009; Sekigawa *et al.* 2009; Daley *et al.* 2012; Padron-Morales *et al.* 2013).

Pour être active, l'IL-1 doit se fixer à un récepteur qui lui est spécifique. Parmi les neuf récepteurs de l'IL-1, deux ont été sélectionnés pour l'étude (Dinarello 2002). Il s'agit en fait des deux récepteurs glycoprotéiques membranaires principaux soit les récepteurs de type 1 (IL1R1) et de type 2 (IL1R2) qui sont codés par les gènes portant les mêmes noms.

1.2.2.1. Récepteur de type 1 de l'interleukine 1

IL1R1 a été démontré comme impliqué dans des maladies à composante inflammatoire, notamment le psoriasis (Hebert *et al.* 2015), le diabète de type 1 (Pociot *et al.* 1994) ainsi que l'asthme et les phénotypes reliés (allergies, hyperréactivité bronchique, etc.) (Daley *et al.* 2012). Ces études confirment l'importance de mieux documenter le récepteur actif de l'IL-1 dans le contexte des maladies allergiques incluant l'asthme.

Le récepteur IL1R1 a un poids moléculaire de 80 kDa (Dinarello 1996). Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires dont les cellules épithéliales et hématopoïétiques incluant les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Sims *et al.* 1989; Dinarello 1996). IL1R1 est caractérisé par le domaine intracellulaire TIR de la famille de l'IL-1 (Subramaniam *et al.* 2004). Ce domaine est séparé en trois parties appelées *Box* 1, 2 et 3 (voir figure 5). *Box* 1 et 2 permettraient la fixation des molécules nécessaires au processus d'activation signalétique (dont l'adaptateur MyD88) et *Box* 3 permettrait plutôt les interactions avec les protéines du cytosquelette (Slack *et al.* 2000).

IL1R1 possède une grande affinité pour IL-1 α et IL-1 β (Dinarello 1996). Grâce à sa plus grande affinité pour IL-1, les cellules peuvent contenir 10 fois moins d'IL1R1 comparativement aux autres récepteurs d'IL-1, ce qui explique pourquoi il se retrouve en moins grande quantité à la surface des cellules immunitaires (Dinarello 1996; Auron 1998; Vasilyev *et al.* 2015). Or, la formation du complexe IL-1-IL1R1 ne permet pas la transmission du signal. L'ajout de la protéine accessoire du récepteur d'IL-1 (IL1RAcP) ubiquitaire permet de compléter la formation du complexe, d'induire et par le fait même d'activer IL-1 ainsi que les tyrosines kinases (Greenfeder *et al.* 1995).

1.2.2.2. Récepteur de type 2 de l'interleukine 1

IL1R2 pourrait également contribuer à la physiopathologie de l'asthme. D'abord, des associations génétiques ont permis de faire le lien entre ce récepteur et plusieurs maladies inflammatoires (Sekigawa *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2015). De plus, Daley et ses collègues ont associé le gène *IL1R2* à l'asthme allergique (Daley *et al.* 2009). Cette association a d'ailleurs été validée dans une étude subséquente (Daley *et al.* 2012). Il a

également été démontré que le niveau d'ARNm d'*IL1R2* était plus élevé dans des biopsies bronchiques d'individus atteints d'asthme allergique comparativement à des individus sains (Laprise *et al.* 2004). De plus, cette signature d'expression d'*IL1R2* en lien avec l'asthme a été validée (Chamberland *et al.* 2009). Un SNP (rs740044) localisé en amont du gène *IL1R2* a également été associé à l'allergie (Chamberland *et al.* 2009). Des travaux non-publiés réalisés précédemment auprès de cette même collection familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean ont également permis d'identifier une modulation du niveau d'ARNm d'*IL1R1* et *IL1R2* par ce même variant génétique rs740044 dans le sang d'individus asthmatiques. Ces études justifient l'importance de mieux comprendre les mécanismes qui régulent la transcription de ce gène.

Le récepteur *IL1R2* a un poids moléculaire de 60 kDa. Il peut être présent sous forme soluble ou membranaire (Liu *et al.* 1996; Chang *et al.* 2009). Dans le cadre de ce projet, la forme membranaire a été sélectionnée. Le récepteur de type 2 transmembranaire est exprimé sur un nombre limité de cellules incluant les cellules épithéliales et certaines cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes B et T, les monocytes, les neutrophiles et les macrophages (Sims *et al.* 1989; McMahan *et al.* 1991). Puisque les principales cellules exprimant *IL1R2* sont des cellules sanguines circulantes, la partie de l'étude concernant les récepteurs de l'IL-1 a été réalisée à partir de l'ADN et de l'ARN isolés dans du sang complet. La régulation d'*IL1R2* se fait grâce à la modulation des ligands disponibles pour ce récepteur (Bristulf *et al.* 1994). Des médiateurs chimiques peuvent également avoir un impact sur le niveau d'*IL1R2* transmembranaire. Ces cytokines régulatrices comprennent l' $\text{IFN}\gamma$ (Kitaya *et al.* 2007), l'IL-4 (Colotta *et al.* 1993a) et IL-13 (Colotta *et al.* 1994b) et la $\text{TNF}\alpha$ (Orlando *et al.* 1997). Contrairement à *IL1R1*, *IL1R2* ne possède pas de domaine TIR nécessaire à l'activation de son ligand bien qu'il possède une structure extracellulaire homologue au récepteur actif constitué de trois domaines immunoglobulines (voir figure 5).

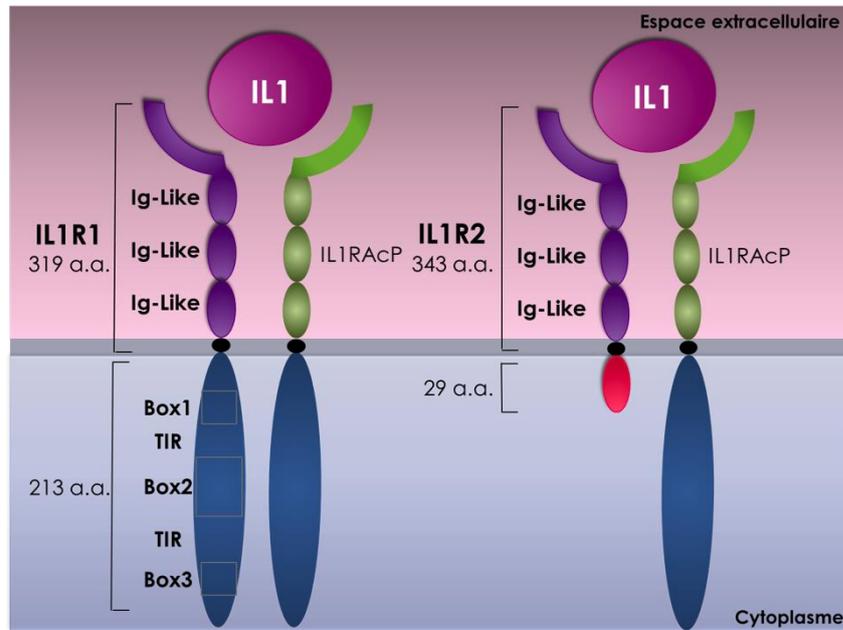


Figure 5. Schématisation de la structure moléculaire des récepteurs de types 1 et 2 de l'interleukine 1. La structure moléculaire des deux récepteurs est similaire sur leur côté extracellulaire. Cependant, le récepteur de type 1 (IL1R1) possède un domaine intracytoplasmique composé de *Box 1*, *2* et *3*, absent chez le récepteur de type 2 (IL1R2). C'est ce domaine qui permet une cascade de signalisation intracellulaire. Le récepteur IL1R2 agit donc comme un leurre en n'occasionnant aucune transmission de signal. Cette figure illustre également la protéine accessoire (IL1RAcP) nécessaire pour compléter le complexe et permettre la transmission intracellulaire du signal (Subramaniam *et al.* 2004; Slack *et al.* 2000; Dinarello 1996).

L'importance de ces différences dans la structure moléculaire de ces deux récepteurs a un impact sur l'activation cellulaire. En effet, IL1R2, malgré l'ajout d'IL1RAcP, n'entraîne aucun signal (Colotta *et al.* 1996). Il agit à titre de compétiteur avec IL1R1 en diminuant la quantité disponible de ligands pour le récepteur actif (Garlanda *et al.* 2013). Comme la formation du complexe IL-1-IL1R1-IL1RAcP contribue à l'inflammation par la différenciation des lymphocytes T vers la voie T_H1 , il est possible qu'IL1R2, en diminuant la formation de ces complexes actifs, permet plutôt l'activation de la voie T_H2 (voir figure 6) (Colotta *et al.* 1993; Lewis *et al.* 1995; Fraga *et al.* 2005). Le lien direct entre IL1R2 et la voie T_H2 n'a toutefois pas été démontré.

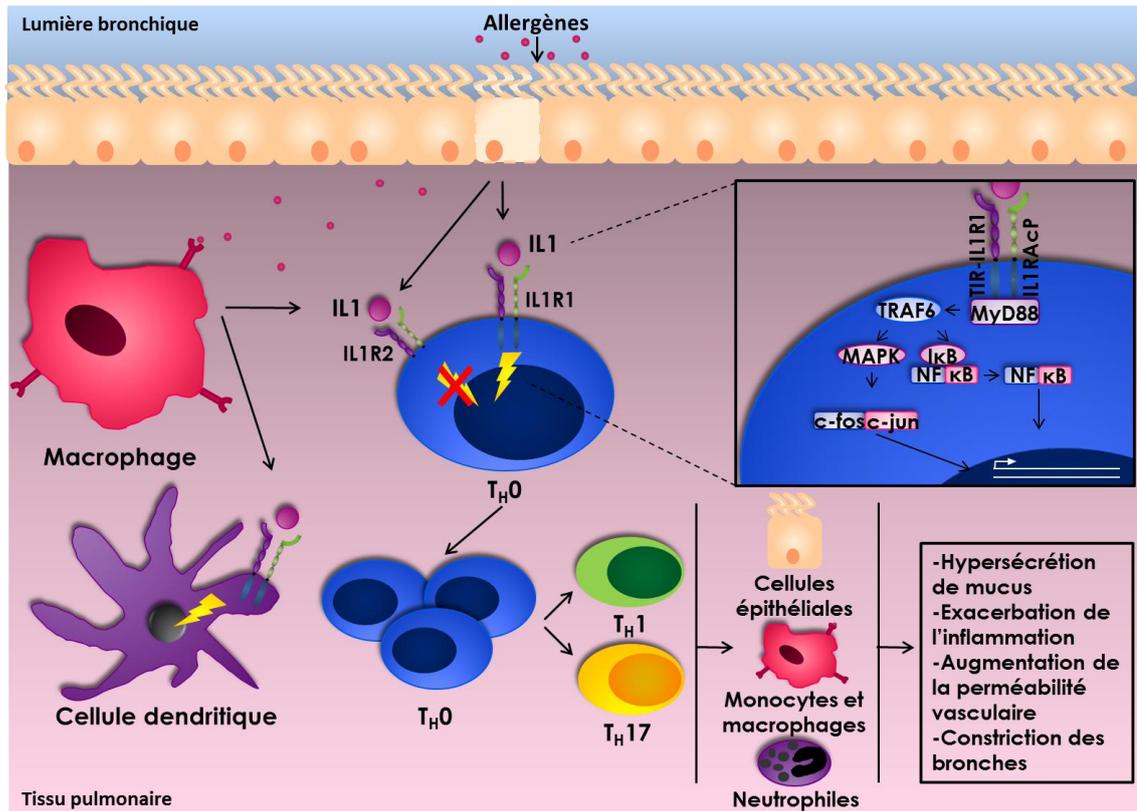


Figure 6. Cascade de signalisation intracellulaire lors de la formation du complexe de l'interleukine 1 et son récepteur actif. L'introduction d'allergènes induit la sécrétion d'interleukine (IL) -1 par les cellules épithéliales bronchiques, et les macrophages. L'IL-1 peut alors se fixer à deux récepteurs dont le récepteur actif (IL1R1) et le récepteur leurre (IL1R2), localisés sur plusieurs types de cellules immunitaires incluant les lymphocytes T naïfs. Chaque récepteur est également conjugué à la protéine accessoire IL1RAcP. La formation du complexe IL-1-IL1R1-IL1RAcP permet la signalisation intracellulaire grâce au domaine intracytoplasmique *Toll-IL1-receptor* (TIR). La cascade de signalisation active d'abord le *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) qui à son tour active la protéine *mitogen activated kinase-like* (MAPK) et le *nuclear factor kappa B* (NFκB). Ils sont alors transloqués dans le noyau pour permettre la transcription de gènes pro-inflammatoires. La sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires favorisera la prolifération des lymphocytes T auxiliaires naïfs (T_H0) qui pourront se différencier en T_H1 ou T_H17 grâce à la rétroaction d'IL-1 et les autres cytokines sécrétées. Les T_H1 et les T_H17 sont impliqués dans l'hypersécrétion de mucus, l'augmentation de l'inflammation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la bronchoconstriction par le biais des cellules épithéliales, des macrophages, des monocytes et des neutrophiles (Colotta *et al.* 1996; Garlanda *et al.* 2013; Colotta *et al.* 1993; Lewis *et al.* 1995; Fraga *et al.* 2005).

1.2.3. Interleukine 33

L'importance d'étudier l'IL-33 dans le contexte de l'asthme allergique se justifie par les évidences dans la littérature scientifique ayant démontré une association entre cette cytokine et la maladie. En effet, les associations génétiques entre le gène *IL33* et l'asthme ont été validées dans de nombreuses études. Moffatt et ses collègues ont d'ailleurs mis en lumière l'importance génétique d'*IL33* et de son récepteur actif *ST2* grâce à une méta-analyse qui comprenait alors 23 cohortes d'asthmatiques (Moffatt *et al.* 2010). Une étude d'association pangénomique subséquente a ensuite validé cette association génétique et a démontré qu'*IL33* était en tête de liste des gènes impliqués dans la pathogénèse de l'asthme (Li *et al.* 2012). Il a également été démontré que l'expression d'*IL33* au niveau génétique et protéique était augmentée dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les cellules épithéliales issues de biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Prefontaine *et al.* 2010). D'autres études ont également permis d'identifier une augmentation du niveau d'IL-33 sécrété dans le sérum et les expectorations induites d'individus asthmatiques en comparaison avec des individus témoins (Hamzaoui *et al.* 2013; Guo *et al.* 2014). Toutes ces évidences justifient l'importance d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes de régulation de l'expression d'*IL33*.

L'IL-33 appartient à la superfamille de l'IL-1. Le gène codant pour cette cytokine est situé sur le *locus* 9p24,1 (figure 7) (Wu *et al.* 2012). La protéine résultante pèse environ 30 kDa (Cayrol et Girard 2009). Cette cytokine constitue, au même titre qu'IL-1 α , une alarmine. Elle agit donc en émettant un signal d'alarme endogène en cas d'anormalité cellulaire. Ainsi, en cas de mort nécrotique cellulaire ou de stress mécanique, l'IL-33 est libérée dans l'organisme (Lefrançais *et al.* 2012). L'introduction de pathogène ou d'agression par des allergènes ou autres agents irritants environnementaux peuvent également déclencher la libération d'IL-33 (Lloyd 2010). Elle peut être sécrétée par de nombreux types cellulaires incluant des cellules stromales, parenchymales, hématopoïétiques et épidermiques (Garlanda *et al.* 2013). Considérant le fait que les cellules épithéliales des voies respiratoires sont les principales sources d'IL-33 dans les poumons (Cayrol et Girard 2014) et que les études précédentes ont démontré une signature d'expression d'IL-33 en lien avec l'asthme dans ce type

cellulaire (Prefontaine *et al.* 2010), la partie de l'étude concernant IL-33 a été réalisée dans des cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques.

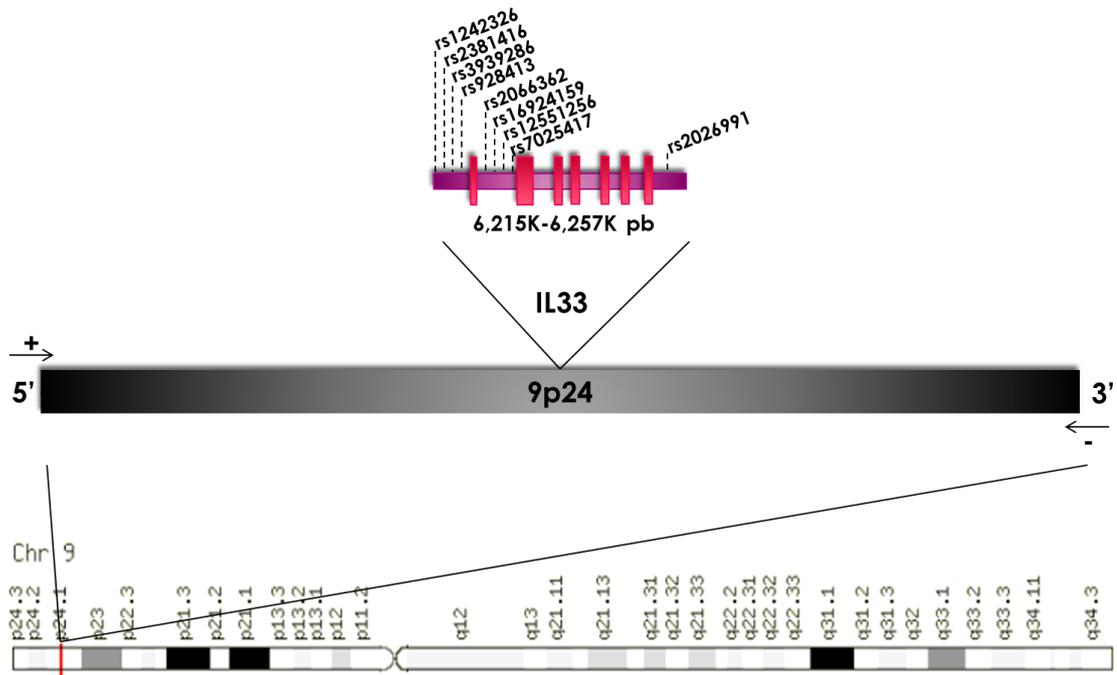


Figure 7. Schématisation du gène de l'interleukine 33 codé par le locus 9p24,1. L'interleukine 33 est codée par un gène localisé dans le bras court du chromosome 9 dans la région 24,1. Le gène est lu sur la bande positive. La position chromosomique est indiquée en paires de bases et le gène est représenté avec le gène complet en violet et les exons en rouge. Les polymorphismes (SNP) associés à l'asthme et aux phénotypes liés sont identifiés dans la figure utilisant la nomenclature usuelle, soit rs# (Gudbjartsson *et al.* 2009; Melen *et al.* 2010; Moffatt *et al.* 2010; Belpinati *et al.* 2011; Torgerson, *et al.* 2011).

L'activation d'IL-33 se fait par le biais de la formation d'un complexe avec son récepteur ST2 qui a une structure moléculaire similaire à 38% à IL1R1, comprenant donc également un domaine T1R (Kitaya *et al.* 2007). C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il est également reconnu comme le récepteur IL1R-like-1 (IL1RL1). Le gène codant pour ce récepteur est localisé sur le même locus que les récepteurs de l'IL-1 (2q12) (Shimizu *et al.* 2005). Le récepteur ST2 est exprimé à la surface de nombreux types de cellules immunitaires dont les lymphocytes T, les macrophages, les mastocytes, et les cellules *Natural Killers* (cellules NK) impliquées à la fois dans les réponses innée et adaptative. Cela justifie la contribution d'IL-33 dans ces deux types de réponse immunitaire (Lloyd 2010). La protéine accessoire IL1RAcP est également nécessaire pour permettre

l'activation des voies de signalisations intracellulaires dépendantes de l'adaptateur MyD88 (Garlanda *et al.* 2013). La formation du complexe IL-33-ST2-IL1RAcP induit l'activation de voies de signalisations similaires à l'IL-1 (NFκB et MAPK) (voir figure 8) (Smith 2010).

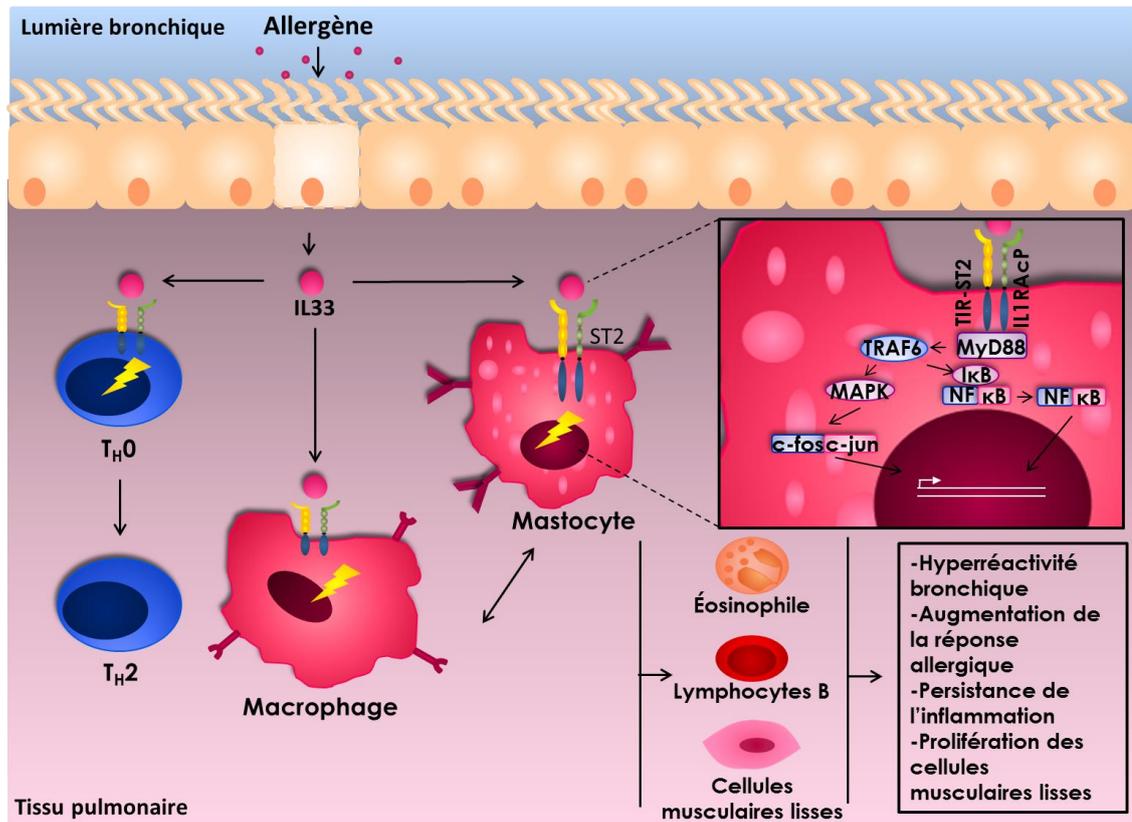


Figure 8. Signalisation intracellulaire induite par la libération de l'interleukine 33 suite à la stimulation par un allergène. L'agression de l'épithélium bronchique par un allergène entraîne la libération de l'interleukine (IL) -33 par les cellules épithéliales. Le récepteur d'IL-33 (ST2) est exprimé principalement à la surface des lymphocytes T naïfs (T_{H0}), des mastocytes et des macrophages. Le ligand se fixe à son récepteur actif ST2 et à la protéine accessoire de l'IL-1 (IL1RAcP), couplé à un domaine *Toll-IL1-receptor* (TIR) et à l'adaptateur *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) ce qui permet la signalisation intracellulaire par les voies des *tyrosines kinases mitogen-activated* (MAPK) et du facteur de transcription *nuclear factor-kappa B* (NFκB). Une fois activées, ces voies ont plusieurs rôles dans l'asthme notamment l'augmentation de l'hyperréactivité bronchique, l'augmentation de la réponse allergique, la persistance de l'inflammation et la prolifération du muscle lisse des voies respiratoires (Kitaya *et al.* 2007; Garlanda *et al.* 2013; Smith 2010; Zhiguang *et al.* 2010).

Les voies de signalisations MAPK et NFκB sont généralement associées à la voie T_{H1} , ce qui constitue une particularité intéressante dans le cas d'IL-33 puisqu'elle est

comprise parmi les cytokines pro-T_H2 (Lloyd 2010). En effet, contrairement aux autres cytokines de la superfamille de l'IL-1 qui entraînent une favorisation de la voie T_H1, IL-33 favorise plutôt la voie T_H2 par l'augmentation de l'une ou l'autre des cytokines de cette voie, notamment l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5 (Kurowska-Stolarska *et al.* 2008; Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Liu *et al.* 2009). Toutefois, contrairement à IL-13 et IL-5, la sécrétion d'IL-4 n'est pas essentielle pour induire la voie T_H2. L'étude de Kurowska-Stolarska, Kewin et leurs collègues démontre qu'IL-33 peut contribuer à l'inflammation sans nécessairement augmenter la sécrétion d'IL-4 et activer les lymphocytes B et T (Kurowska-Stolarska *et al.* 2008). Or ce type de réponse immunitaire est encore peu connu. Elle mettrait en jeu des cellules immunitaires peu documentées, décrites précédemment, les ILC2 (Neill *et al.* 2010; Barlow *et al.* 2013). Ces cellules, activées par la sécrétion d'IL-33 par les cellules épithéliales, permettraient de dresser un portrait de l'implication de l'épithélium dans la réponse innée (Lloyd 2010). IL-33 a également été associée à une augmentation de l'hyperréactivité bronchique et à l'hyperplasie des cellules à gobelet dans une étude fonctionnelle (Kondo *et al.* 2008). Cette cytokine joue également un rôle dans l'activation et le recrutement des cellules inflammatoires dont les éosinophiles (Zhiguang *et al.* 2010). Il s'agit donc de cellules clé dans la pathologie de l'asthme.

Composante environnementale de l'asthme

L'environnement est également impliqué dans le développement et la persistance de l'asthme (Mathias 2014). Des études de jumeaux monozygotes ont permis de déterminer l'importance de considérer l'aspect environnemental dans le développement de l'asthme (Koppelman *et al.* 1999). En effet, ces études démontraient que deux individus ayant un code génétique identique pouvaient présenter des niveaux de sévérité d'asthme différents. Ils avaient donc été exposés à des facteurs extrinsèques différents.

Ces facteurs environnementaux, considérés comme impliqués dans la pathogénèse, sont plus communément appelés des facteurs de risque (figure 9). Ils peuvent influencer la santé de l'individu à tous les stades du développement (Miller et Peden 2014). Lors du développement fœtal, l'environnement intra-utérin peut engendrer une adaptation du fœtus (Tedner *et al.* 2012). Cette adaptation peut perdurer tout au long de la vie de l'individu et prédisposer ce dernier à développer certaines pathologies. Ce

concept s'appelle la programmation fœtale (Tedner *et al.* 2012). De plus, l'exposition à divers facteurs de risque durant l'enfance et même après cette période peut contribuer à la pathogénèse ou à la persistance de l'asthme. Parmi ces facteurs, il existe entre autres de nombreux irritants bronchiques sous forme d'aérosols dont la pollution (Chen *et al.* 2006), les pesticides (Yang *et al.* 2014b) et la fumée de cigarette (Stapleton *et al.* 2011). L'exposition à diverses bactéries en bas âge pourrait moduler le risque de développer de l'asthme (Schaub *et al.* 2009). Les recherches visent encore à identifier par quels mécanismes ces facteurs environnementaux contribuent à l'asthme et si les mécanismes épigénétiques peuvent expliquer, du moins en partie, le phénomène de programmation fœtale.

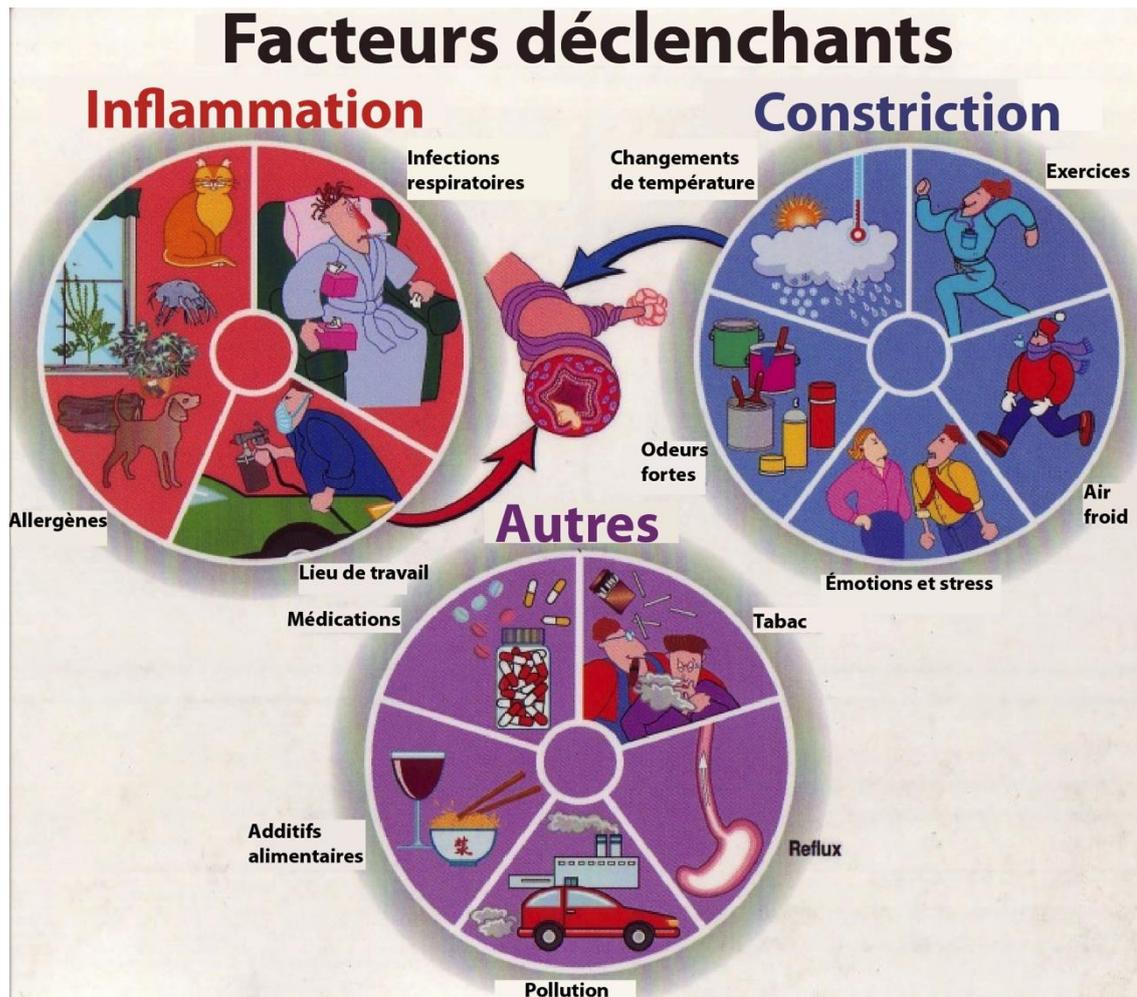


Figure 9. Facteurs déclenchants de l'asthme. L'inflammation peut être engendrée par divers facteurs exogènes dont les allergènes, les infections respiratoires et les irritants inhalés du lieu de travail. La constriction des voies respiratoires peut être déclenchée par des variations de température, par des exercices trop intenses, par les émotions et le stress et par la température trop basse de l'air. Finalement, les autres mécanismes de l'asthme peuvent être provoqués par la prise de certains médicaments, le tabac, les reflux gastriques, la pollution atmosphérique et certains additifs alimentaires (figure modifiée, traduite à partir de <http://www.ucalgary.ca/asthma/asthma5>).

1.3.1. Épigénétique

L'épigénétique se résume à une modification au niveau moléculaire de l'ADN sans changer la séquence des nucléotides. Les mécanismes épigénétiques comprennent les modifications d'histones, les micro-ARN (miARN) et, le plus étudié actuellement, la méthylation de l'ADN (voir figure 10) (Renaudineau et Youinou 2011). C'est donc ce signal qui sera détaillé ici et utilisé dans le présent mémoire. Ces modifications sont

induites par l'environnement et peuvent avoir un impact direct sur l'expression des gènes en bloquant l'accès des facteurs de transcription à leur site de fixation sur l'ADN ou encore en recrutant des répresseurs de transcription (Renaudineau et Youinou 2011). Ces modifications sont réversibles et peuvent survenir à différents stades de vie puisqu'elles peuvent être héritées ou spontanées (Varriale 2014). L'importance de ce type d'études se justifie par le manque d'informations sur l'héritabilité de la maladie. En effet, la majorité des SNP associés à l'asthme n'expliquent que 60% de l'héritabilité de la maladie (Thomsen *et al.* 2010; Gibson 2011; Bernstein *et al.* 2012). Ainsi, il est probable que l'épigénétique puisse contribuer à expliquer, du moins en partie, la portion héréditaire encore non déterminée de l'asthme et permettrait de dresser un portrait plus complet de la pathogénèse. Dans le cadre de ce mémoire, tel qu'indiqué dans les sections précédentes, les cibles génétiques ont déjà été définies lors d'études d'association et d'expression antérieures. Or, une pièce manquante du casse-tête repose dans l'identification du ou des mécanismes responsables de la régulation de l'expression des gènes précédemment associés avec l'asthme.

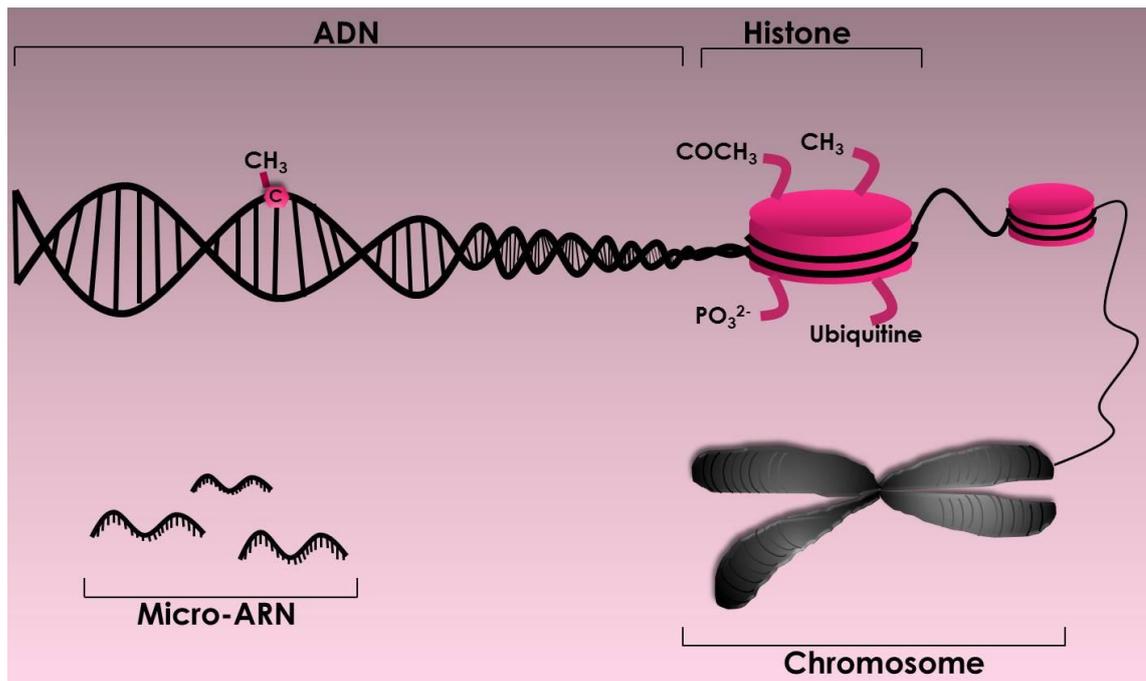


Figure 10. Mécanismes épigénétiques du chromosome à l'ADN. Le double brin d'ADN est enroulé autour des protéines d'histones pour ensuite former les chromosomes. La méthylation de l'ADN est représentée par l'ajout du groupement méthyle (CH_3) sur une cytosine et les modifications des queues d'histones (acétylation : COCH_3 , méthylation : CH_3 , phosphorylation : PO_3^{2-} et ubiquitination) déterminent le niveau d'enroulement de l'ADN autour de l'histone. Ces modifications épigénétiques modulent la transcription des gènes. Les miARN sont des simples brins de nucléotides se fixant à l'ARN pour en réguler la traduction en protéine (Renaudineau et Youinou 2011).

1.3.2. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est le mécanisme qui a été retenu pour le présent mémoire puisqu'il s'agit de la marque épigénétique la mieux documentée à ce jour (Huang 2015). Elle consiste en l'ajout covalent d'un groupement méthyle sur le 5^e carbone d'une cytosine (C), et cela se produit plus fréquemment si celle-ci est placée devant une guanine (G) (i.e. CpG : Cytosine-phosphate-Guanine). Les zones riches en CG, qui contiennent entre 200 et 2000 paires de bases, s'appellent des îlots CpG et constituent jusqu'à 2% du génome des mammifères (Bogdanovic et Veenstra 2009). Déjà en 1977, il était documenté que la méthylation était corrélée avec l'activité de la

chromatine, ce qui impliquait que les CpG méthylés ne se retrouvent pas au hasard dans le génome (Razin et Cedar 1977). En effet, les promoteurs contiennent plus souvent des îlots CpG et sont donc plus propices à être méthylés (Schubeler 2015). Cela est cohérent avec la littérature puisque le promoteur se retrouve en amont du gène et sert à l'initiation de la transcription et la méthylation permet de réguler ce mécanisme (Cheung et Lau 2005). La transcription des gènes s'effectue grâce à la fixation de facteurs de transcription en amont du site d'initiation (*transcription start site* ou TSS) permettant la production des ARNm (Huang 2015). Dans le promoteur, la méthylation de l'ADN et l'expression des gènes sont généralement inversement proportionnelles. Ainsi, une plus grande méthylation du promoteur d'un gène diminuera généralement l'expression de son ARN messager (ARNm) et vice versa (Varriale 2014). Or, il y a eu de nombreuses avancées sur la structure du génome et il est reconnu que les promoteurs ne sont pas les seuls impliqués dans la régulation de l'expression par le biais de la méthylation de l'ADN. En effet, les régions régulatrices ont été démontrées comme impliquées dans la répression de l'expression lorsque méthylées (Huang 2015). Dans le corps du gène, la méthylation permet de maintenir la transcription des gènes (Shenker *et al.* 2015). Des interactions entre des SNP et des marques de méthylation ont également été associées à une augmentation de la régulation de la transcription des gènes (voir figure 11) (Heyn 2014). La régulation de la transcription par la méthylation de l'ADN a d'ailleurs été associée à diverses pathologies respiratoires dont l'asthme (Perera et Herbstman 2011; Morales *et al.* 2012; Acevedo *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015).

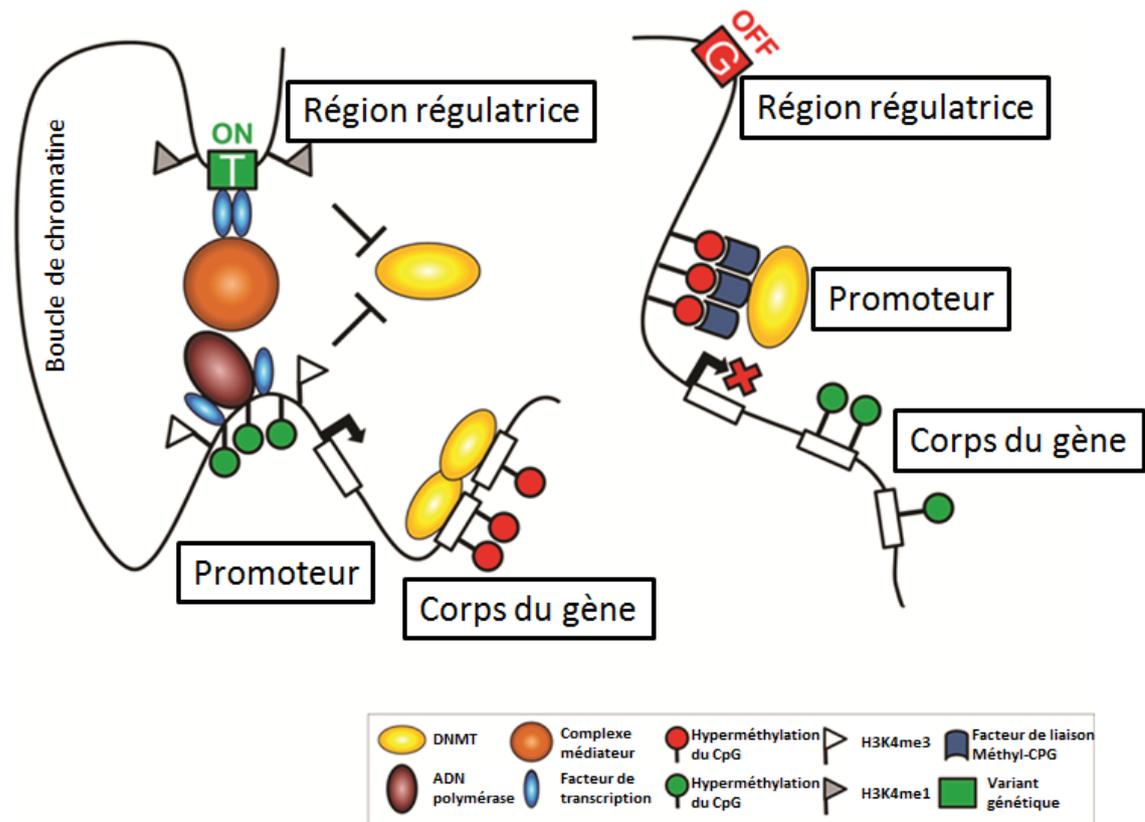


Figure 11. Régulation de la transcription par la méthylation de l'ADN. Cette figure démontre la régulation de l'expression d'un gène par une interaction entre un polymorphisme (SNP) et la méthylation de l'ADN. Dans la figure de gauche, l'allèle T du SNP, indiqué par le carré vert, permet la fixation des facteurs de transcription sur le site régulateur qui est marqué par la H3 lysine 4 monométhylation (H3K4me1). Le niveau de méthylation bas du promoteur permet la fixation des facteurs de transcription et de l'ADN polymérase, et l'interaction avec le complexe médiateur. L'hyperméthylation du corps du gène permet également l'activation des gènes. La portion à droite de la figure représente la répression de l'expression de ce même gène. Lorsque l'allèle du SNP est G, les facteurs de transcription ne peuvent se fixer sur la région régulatrice, cela limite l'accès à l'ADN des facteurs de transcription, du complexe médiateur et de l'ADN polymérase. L'hyperméthylation du promoteur et l'hypométhylation du corps du gène sont également associés à la répression de la transcription du gène (figure modifiée, traduite à partir de Heyn 2014).

L'importance de considérer la méthylation de l'ADN dans les études de cohortes asthmatiques a été soulignée dans de nombreuses études. Hollingsworth, Maruoka et leurs collègues ont démontré qu'il existait un lien entre le développement de maladies respiratoires allergiques et la méthylation de l'ADN (Hollingsworth *et al.* 2008). En effet, de nombreux gènes impliqués dans la balance T_H1/T_H2 ont démontré une signature de

méthylation en lien avec l'asthme et les phénotypes reliés (Schieck *et al.* 2014; Seumois *et al.* 2014; Song *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014; Berni Canani *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015). Ces études permettent d'expliquer en partie la régulation de l'expression de plusieurs gènes de la voie T_H2 par la méthylation de l'ADN et par des interactions GxE. Comme ces modifications sont dynamiques (Christensen *et al.* 2009), elles pourraient servir de cibles thérapeutiques lorsque dirigées vers les bons gènes. Par contre, les mécanismes responsables de la réversibilité de l'ADN ne sont pas encore documentés et cela devra être le sujet des études ultérieures avant de compter sur la méthylation de l'ADN comme avenue thérapeutique (Christensen *et al.* 2009).

1.3.3. Facteurs intrinsèques

1.3.3.1. Âge et sexe

L'influence de l'âge et du sexe sur la pathogénèse de l'asthme a été démontré dans des études précédentes (Bjornson et Mitchell 2000; Meurer *et al.* 2000; Chen *et al.* 2003). Des différences en lien avec le sexe ont été démontrées dans les études d'associations génétiques avec certains *loci* de susceptibilité (Aschard *et al.* 2009; Hunninghake *et al.* 2010; Hrdlickova et Holla 2011; Loisel *et al.* 2011). Enfin, quelques équipes de chercheurs ont également publié des résultats qui attestent que l'âge et le sexe peuvent influencer les facteurs épigénétiques (Madrigano *et al.* 2012; Naumova *et al.* 2013; Binder *et al.* 2015; Chase *et al.* 2015). Une de ces études a d'ailleurs été réalisée dans un échantillon de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean en collaboration avec l'équipe de la Dre Anna Naumova (Naumova *et al.* 2013). En fait, ces résultats démontrent que la méthylation de l'ADN pourrait modifier les associations génétiques en lien avec l'âge et le sexe des individus de l'échantillon pour l'une des régions génétiques les plus associées à l'asthme par GWAS, soit la région 17q12-q21. En résumé, la méthylation de l'ADN, qui varie selon l'âge et le sexe des patients, pourrait interagir avec des SNP localisés dans les régions régulatrices de certains gènes ce qui viendrait moduler l'expression de certains gènes de susceptibilité de l'asthme en fonction de l'âge et du sexe des individus (Kauffmann et Demenais 2012). Ceci pourrait permettre d'expliquer, du moins en partie, les différences de la prévalence de l'asthme en lien avec l'âge et le sexe des individus (Kynyk *et al.* 2011).

1.3.3.2. Type cellulaire

L'étude des marques épigénétiques dans les types cellulaires impliqués dans la pathogénèse et la persistance de l'asthme permet de documenter l'importance de la composante environnementale (Barros et Offenbacher 2009). Or, les patrons de méthylation de l'ADN peuvent varier en fonction du type cellulaire étudié. Une étude réalisée par Lokk et ses collègues démontre la spécificité tissulaire de la méthylation de l'ADN parmi 17 types de tissus somatiques. Leurs résultats permettent de constater que la grande majorité des sites CpG sont différemment méthylés entre les différents tissus étudiés et que les patrons de méthylation reflètent les fonctions spécifiques de ces tissus (Lokk *et al.* 2014). Il est donc important de choisir le bon tissu en lien avec la fonction qu'il exerce dans la pathologie lors du développement de devis de recherche (*study design*) en épigénétique. Idéalement, pour étudier l'asthme, ce tissu devrait solliciter l'implication et l'activation de plusieurs types cellulaires à la fois quant aux cellules résidentes dans le poumon qu'aux cellules circulantes dans le sang et aussi en lien avec sa composante immune et inflammatoire (Locksley 2010). Pour bien documenter l'influence de la méthylation de l'ADN sur la régulation de la transcription de certains gènes candidats, il faut cibler le tissu ou la cellule associé à la fonction de ce gène dans le contexte de la maladie à documenter (Lokk *et al.* 2014).

1.3.4. Facteurs extrinsèques

Les modifications épigénétiques peuvent être héritées ou induites au stade prénatal par divers facteurs extrinsèques (Bird 2002). Elles peuvent également survenir spontanément (*de novo*) suite à l'influence de l'environnement durant le stade néonatal ou même durant les autres stades de la vie (Zhou 2012). Ces modifications peuvent favoriser le développement de diverses pathologies mêmes lorsqu'elles surviennent tôt dans le développement des individus puisqu'elles sont maintenues lors de la division mitotique (Bird 2002; Tang et Ho 2007). Durant la grossesse, les habitudes de vie de la mère et ses facteurs métaboliques peuvent avoir un impact sur le profil épigénétique. Les facteurs d'influence intra-utérins associés à des changements de méthylation comprennent le niveau de stress maternel (Xu *et al.* 2014), la nutrition (Dominguez-Salas *et al.* 2013) et le tabagisme (Knopik *et al.* 2012) pour ne citer que ceux-ci. Ces mêmes facteurs peuvent également avoir un effet lors du développement de l'enfant (Ahluwalia et Matsui 2011; Blaze *et al.* 2013; Lee et Pausova 2013). Comme ces facteurs

environnementaux constituent également des facteurs aggravants de l'asthme (Noutsios et Floros 2014), l'étude des marques épigénétiques pourraient permettre de documenter les mécanismes par lesquels ces facteurs influencent le développement et la persistance de l'asthme. D'autres facteurs extrinsèques peuvent également contribuer à des modifications épigénétiques. Toutefois, ce projet de recherche visait à caractériser le mécanisme de régulation de la transcription par la méthylation de l'ADN et non pas à déterminer quel facteur environnemental était causal à ce processus.

Problématique et hypothèses

L'asthme est une maladie respiratoire chronique qui affecte une proportion importante de la population mondiale et celle du Canada ne fait pas exception. Sa prévalence a considérablement augmenté depuis les trois dernières décennies, ce qui en fait une préoccupation mondiale (Subbarao *et al.* 2009). À l'heure actuelle, plus de 300 gènes de susceptibilité ont été validés dans l'asthme (Lee *et al.* 2011). Les « *gold standards* » de l'asthme, i.e. les gènes associés à l'asthme dans plus de 15 études indépendantes, comprennent les interleukines de la superfamille de l'IL-1: *IL1* et *IL33* (Moffatt *et al.* 2010). Ces gènes sont impliqués dans la régulation de la différenciation des lymphocytes T en favorisant de manière directe ou indirecte la voie T_H2 qui est une voie favorisée dans les cellules circulantes (sang) et dans le tissu (poumon) chez les personnes asthmatiques (Dinarello 2002; Lloyd 2010). Les voies biologiques qui incluent ces ligands et leurs récepteurs ont également été validées dans des études d'associations génétiques (Daley *et al.* 2009; Daley *et al.* 2012; Li *et al.* 2012). Une signature d'expression pour le récepteur leurre d'IL-1, *IL1R2*, et pour *IL33* a également été démontrée et validée dans l'asthme (Laprise *et al.* 2004; Chamberland *et al.* 2009; Prefontaine *et al.* 2010). Une augmentation de l'expression d'IL-33 a également été démontrée en lien avec l'augmentation de la sévérité de la maladie ce qui en fait un biomarqueur de sévérité (Guo *et al.* 2014). Or, l'asthme est un trait complexe, ce qui implique qu'elle résulte en partie d'interactions gène-environnement, incluant les modifications épigénétiques (Barros et Offenbacher 2009). Il importe ainsi d'intégrer la composante environnementale dans le but de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes de susceptibilité. La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le mieux documenté (Huang 2015). Son importance dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la balance T_H1/T_H2 a été démontrée

à maintes reprises (Schieck *et al.* 2014; Seumois *et al.* 2014; Song *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014; Berni Canani *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015). L'hypothèse générale de ce projet était donc que la méthylation de l'ADN pourrait réguler l'expression des gènes *IL1R1*, *IL1R2* et *IL33* dans l'asthme puisque ceux-ci sont impliqués dans la régulation de la différenciation des lymphocytes T auxiliaires et contribuent à l'inflammation (Dinarello 2002; Lloyd 2010). Considérant le dynamisme de la méthylation de l'ADN (Christensen *et al.* 2009), ces études pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Les objectifs de la présente étude étaient donc de :

- 1- documenter le patron de méthylation des récepteurs de l'IL-1 (*IL1R1* et *IL1R2*) dans des échantillons sanguins de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean et déterminer si la méthylation régule l'expression de ces gènes dans un modèle d'asthme;
- 2- documenter le patron de méthylation de l'IL-33 selon la sévérité de l'asthme dans des cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques issues de la banque de cellules primaires développée par la Dre Chakir et déterminer si la méthylation régule l'expression de ce gène.

Chapitre 2 - Signature de méthylation de l'ADN des récepteurs de l'interleukine 1 dans l'asthme et l'allergie / DNA methylation signature of interleukin 1 receptors in asthma and atopy

Article accepté par *Clinical Epigenetics*.

DiCours.com

2.1. Avant-propos

Ce chapitre met l'emphase sur les principaux résultats obtenus dans la première partie de ce projet de recherche visant à caractériser le patron de méthylation des gènes *ILIR1* et *ILIR2* dans des échantillons sanguins de patients asthmatiques et allergiques issus de la collection familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean.

Les analyses ont permis d'identifier pour une première fois la signature de méthylation de l'ADN pour le gène *ILIR2* dans l'asthme et l'allergie. Ces épivariations ont été corrélées avec une différence d'expression du gène ce qui démontre le potentiel régulateur de l'expression d'*ILIR2* par les épivariations identifiées dans le promoteur du gène.

Dre Catherine Laprise est titulaire de la Chaire de recherche du Canada en Environnement et génétique des troubles respiratoires et de l'allergie située à l'UQAC. Elle a conçu et construit la collection familiale qui comprend plus de 1250 échantillons sanguins de familles où se trouve un proband asthmatique et les membres de sa famille. La description de cette collection familiale a été publiée en 2014 (Laprise 2014). Ce projet de maîtrise a été fait à partir d'un sous-échantillon de cette collection. La Dre Laprise a établi le devis méthodologique de l'étude et obtenu une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada pour permettre la réalisation de l'étude. Elle a dirigé toutes les étapes du projet incluant la rédaction de l'article scientifique. Le Dr Luigi Bouchard de l'Équipe de recherche sur la régulation épigénétique de la santé métabolique (ÉPIMET) au Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) du Saguenay–Lac-Saint-Jean affilié à l'Université Sherbrooke a contribué au design de l'étude et a révisé le manuscrit. Dr Simon-Pierre Guay a réalisé le design des amorces pour les gènes sélectionnés et assuré le soutien à la technique du pyroséquençage. J'ai ensuite réalisé les diverses étapes de manipulation (extraction d'ADN, conversion au bisulfite de sodium, amplification PCR, pyroséquençage, qRT-PCR et analyses). Anne-Marie Boucher Lafleur a participé à l'amplification PCR et au pyroséquençage. Au terme des manipulations, j'ai pu rédiger l'article sous forme de lettre à l'éditeur. Suite aux révisions, l'article a été accepté par le journal *Clinical Epigenetics* (facteur d'impact de 4,54).

Title: DNA methylation signature of interleukin 1 receptor type II in asthma

Authors: Gagné-Ouellet V¹, Guay SP^{2,3}, Boucher-Lafleur AM¹, Bouchard L^{2,3} and Laprise C¹

Affiliations: ¹Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, QC, Canada; ²Department of Biochemistry, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada; ³ECOGENE-21 and Lipid Clinic, Hôpital de Chicoutimi, Chicoutimi, QC, Canada

Address for correspondence:

Dr. Catherine Laprise
Université du Québec à Chicoutimi
555 boulevard de l'Université
Chicoutimi, Qc, Canada, G7H 2B1
Tel.: 418-545-5011 #5659
Email: catherine.laprise@uqac.ca

Key words : Epigenetic, methylation, IL-1, IL1R1, IL1R2, asthma, atopy

Clicours.COM

2.2. Résumé

L'interleukine 1 et ses récepteurs ont été associés avec les maladies allergiques incluant l'asthme. Dans cette étude, le niveau de méthylation de l'ADN dans les *loci* *IL1R1* et *IL1R2* a été mesuré et le niveau d'association entre ce paramètre, les phénotypes reliés à l'asthme, et le niveau d'expression de ces mêmes gènes a été déterminé. Cette étude démontre que les individus asthmatiques et allergiques ont un niveau de méthylation plus élevé dans le promoteur du gène *IL1R2* en comparaison avec des individus témoins (sans asthme ni allergie). Une corrélation négative entre la méthylation de l'ADN et la quantité relative d'ARNm d'*IL1R2* a également été observée. Ces résultats suggèrent que la méthylation du promoteur d'*IL1R2* est associée à une répression de la transcription du gène dans les maladies allergiques incluant l'asthme.

2.3. Abstract

Interleukin 1 and its receptors are associated with allergic diseases such as asthma. In the present study, we measured DNA methylation at the *IL1R1* and *IL1R2* gene loci and assessed for associations with asthma-related phenotypes and gene expressions. We found that asthmatic and atopic individuals have higher *IL1R2* promoter DNA methylation than control subjects. Additionally, we observed a negative correlation between DNA methylation at the *IL1R2* promoter and *IL1R2* mRNA expression. These results suggest for the first time that *IL1R2* promoter DNA methylation is associated with its gene repression in allergic diseases such as asthma.

2.4. Introduction

Interleukin 1 (IL-1) plays a key role in the inflammatory process of asthma (Dinarello 1996). We reported the association of polymorphisms within the IL-1 receptors type I (*IL1R1*) and type II (*IL1R2*) gene *loci* with asthma and atopy in the French Canadian Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) asthma study (Daley *et al.* 2009; Daley *et al.* 2012). The *IL1R2* gene expression signature in allergic asthma has also been described (Pociot *et al.* 1992; Laprise *et al.* 2004; Chamberland *et al.* 2009). Epigenetics has received tremendous attention and variations in DNA methylation (DNA-Me) in candidate genes have been reported associated with asthma and allergic related disorders (Morales *et al.* 2012; Naumova *et al.* 2013; Reinius *et al.* 2013; Seumois *et al.* 2014; Wang *et al.* 2015b; Yang *et al.* 2015). These findings underline the relevance of genetic and epigenetic profiling to identify pathways associated with allergic diseases. Such a combined

approach will facilitate the understanding of the functional impacts of genetic and epigenetic variations on transcription and molecular mechanisms involved in allergic diseases. In this study we hypothesized that DNA-Me in the promoters of *IL1R1* and *IL1R2* are associated with asthma and/or atopy.

2.5. *Clinical characteristics and methods*

Clinical characteristics of the 93 individuals (21 non-atopic asthmatic, 26 atopic asthmatic and 21 atopic individuals, and 25 non-atopic non-atopic controls) from the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial collection (Laprise 2014) and included in the analysis are shown in Table 1. Ethics committee approved the study and all subjects gave informed consent. Based on previous genetic (Smith *et al.* 2004) and epigenetic analyses (Lin *et al.* 2012), methylation at 1 CpG in promoter and 3 CpGs in exon 1 of *IL1R1* (Supplementary Figure 1) and 5 CpGs in promoter of *IL1R2* (Figure 12A) were measured. DNA-Me differences ($\Delta\beta$) between affected (individuals with asthma, atopy, or both) and non-affected individuals were assessed and DNA-Me was correlated with gene expression for each CpG. DNA-Me was measured on DNA extracted from blood (Blood & Cell Culture Midi Kit, Qiagen, Canada) using bis-pyrosequencing (EpiTech Bisulfite Kits, Pyromark PCR Kit, Pyromark Gold Q24 Reagents, Qiagen, Canada). PCR primers were designed using PyroMark Assay Design software (v2.0.1.15) (Qiagen, Canada). Total RNA was extracted from whole-blood (RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Canada) using a subset of affected and non-affected individuals (n=30). For each sample, RNA was converted into cDNA (qScript™ cDNA SuperMix, Quanta Biosciences, USA) and mRNA quantification was determined (PerfeCTa® qPCR FastMix®, Quanta Biosciences, USA) using the two standard curves method with *RPLP0* as a reference gene (Wang *et al.* 2012).

The association between *IL1R1* and *IL1R2* DNA-Me levels and asthma and/or atopy at each CpG was analyzed by logistic regression considering age and sex as covariates (Naumova *et al.* 2013). Gene expression analysis by phenotype was not performed as control group sample size was insufficient (n=4). The association between DNA-Me and mRNA levels was assessed by Spearman correlation. CpG dinucleotides with $r > 0.6$ were combined before they were tested for associations with asthma and/or atopy and for correlation with gene expressions. $\Delta\beta$ with p-value < 0.05 was considered statistically

significant. Statistical analyses were conducted using the statistical software SPSS (v11.5.0, IBM, USA).

2.6. Results

In this study we detected higher levels of DNA-Me at *IL1R2* among affected (i.e. asthmatic and/or allergic) individuals as compared to non-affected controls ($\Delta\beta=8.02\%$, $p\text{-value}=0.013$ and $\Delta\beta=3.72\%$, $p\text{-value}=0.012$ for *IL1R2*-CpG2 and the mean for CpG3 and CpG4, respectively (Table 2, Figure 12B)). Atopic and non-atopic asthma were associated with DNA-Me at *IL1R2* but not atopy alone (data not shown). We also observed that DNA-Me at *IL1R2*-CpG2 was negatively correlated with its mRNA levels ($r=-0.511$, $p\text{-value}=0.004$) (Figure 12C) but it was not correlated for CpG3 and CpG4 (Figure 12D).

2.7. Discussion

An epigenetic signature has also been identified for *IL1R2* promoter in systemic lupus erythematosus (SLE) (Lin *et al.* 2012). The risk of allergic disorders was significantly increased in SLE patients, which suggest that these conditions share some common biomarkers (Shen *et al.* 2014). The negative correlation we observed between DNA-Me and gene expression levels for *IL1R2* may be due to stoichiometry. Methylation may limit access of a transcription factor to DNA and hinders transcriptions (Blattler et Farnham 2013). We identified potential binding sites for transcription factors relevant to asthma near the CpG dinucleotide sites of *IL1R2* analyzed (Supplementary Figure 2) which could explain the inverse correlation between methylation and gene expression (Turker 2002). Noteworthy is the potential binding site for nuclear factor kappa B/c-rel (NFKB) at the *IL1R2* promoter; it is involved in inflammation through several pathways, including IL-1 signalization (Acuner Ozbabacan *et al.* 2014). Given that *IL1R2* acts as a decoy receptor to antagonize the bound ligand (Colotta *et al.* 1993), our data prompted the speculation that hypermethylation of *IL1R2* in asthma and atopy negatively regulates *IL1R2* expression and less decoy receptors are available to reduce the downstream pro-inflammatory response of IL-1 in the presence of unchanged *IL1R1* level (Colotta *et al.* 1994a; Garlanda *et al.* 2013b). Unlike *IL1R1*, *IL1R2* does not have an intracellular domain and the formation of IL-1-*IL1R2* complex inactivates the IL-1 downstream signaling cascade; hence, silences the role of IL-1 in inflammation. Functional study will be needed to investigate the impact of observed epi-variations on

the production of expressed receptors. This hypothesis could be attributed to both asthma and atopy as IL1R2 non-signalling receptor is suspected to influence T_H2 imbalance (Sims *et al.* 1993) and both disorders are driven by T_H2 allergic lung inflammation (Islam et Luster 2012; Paul 2015).

2.8. Conclusions

To our knowledge this is the first report of (1) a hypermethylation signature of *IL1R2* promoter in asthma with or without atopy and (2) inverse correlation between methylation at *IL1R2* promoter and its gene expression. Together they underline the relevance of IL1R2 as a potential biomarker of asthma and atopy. Further work is needed to understand the interactions between environmental exposures and epigenetic modifications like the ones identified in this study. Such understanding will aid the discovery of disease mechanisms associated and development of more effective therapies.

2.9. Acknowledgements

The authors thank all families for their valuable participation and all funding organizations. This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Catalyst Grant: Environments, Genes and Chronic Disease. Catherine Laprise is the chairholder of the Canada Research Chair in Environment and Genetics of Respiratory Disorders and Allergy and Director of the Asthma Strategic Group of the Respiratory Health Network (RHN) of Fonds de recherche du Québec - santé (FRQS) and researcher of the AllerGen NCE. Valérie Gagné-Ouellet received a Summer Student Research Training Award from AllerGen NCE Inc. and a master degree studentship award from the RHN. Anne-Marie Boucher-Lafleur received a Summer Student Research Training Award from AllerGen NCE Inc. Simon-Pierre Guay is the recipient of a Doctoral Research Award from the CIHR. Luigi Bouchard is a Junior Research Scholar from the FRQS and member of the FRQS-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel (affiliated with Centre hospitalier de l'Université de Sherbrooke).

Table 1. Clinical characteristics of individuals from the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial collection

Characteristics	All individuals (n=93)	Controls (n=25)	Asthmatics [§] and/or atopic (n=68)
Sex ratio (M:F)	1:1.2	1:1.8	1:1
Mean age, yr (range)	15 (3-46)	14 (3-44)	15 (4-46)
<16 years old, n (%)	64 (68.8)	18 (72)	46 (67.6)
FEV ₁ , % predicted (SD)*	62 (40)	63 (40)	62 (40)
PC ₂₀ , mg/ml (SD) [†]	8.2 (4.3)	15.3 (3.4)	6.8 (4.4)
Serum IgE, µg/l (SD) [‡]	109 (4.6)	36 (3.6)	157 (4.1)
Asthma, n (%) [§]	47 (51)	NA	47 (69)
Atopy, n (%)	47 (51)	NA	47 (69)
With asthma, n (%) [§]	26 (28)	NA	26 (38)

*FEV₁ = Mean and standard deviation (SD) calculated for forced expiratory volume in 1 second for 67 individuals (16 controls, 51 asthmatic and/or atopic individuals).

[†]PC₂₀ = Geometric mean and SD of provocative methacholine concentration inducing 20% decline in FEV₁ calculated for 58 individuals (14 controls, 44 asthmatic and/or atopic individuals).

[‡]IgE = Geometric mean and SD of serum immunoglobulin (Ig) E level concentration calculated for 80 individuals (20 controls, 60 asthmatic and/or atopic individuals).

[§]Present asthma or past documented clinical history of asthma. Data available for all individuals.

^{||}Defined as having at least 1 positive response on the skin prick test (wheal diameter ≥3 mm at 10 minutes). Data available for all individuals.

Table 2. Summary of DNA methylation analysis on promoter of two interleukin 1 receptors in whole blood samples from Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial collection

Gene	CpG	$\Delta\beta^{\text{¥}}$	p value
<i>IL1R1</i>	1	1.19	0.113
promoter and exon 1	2-4	0.22	0.892
	1	-0.59	0.569
<i>IL1R2</i>	2	8.02	0.013
promoter	3-4	3.72	0.012
	5	-0.50	0.564

$^{\text{¥}}\Delta\beta$ are calculated with mean methylation ratio for asthmatic and/or atopic individuals on control individuals. Significant p-values are shown in bold.

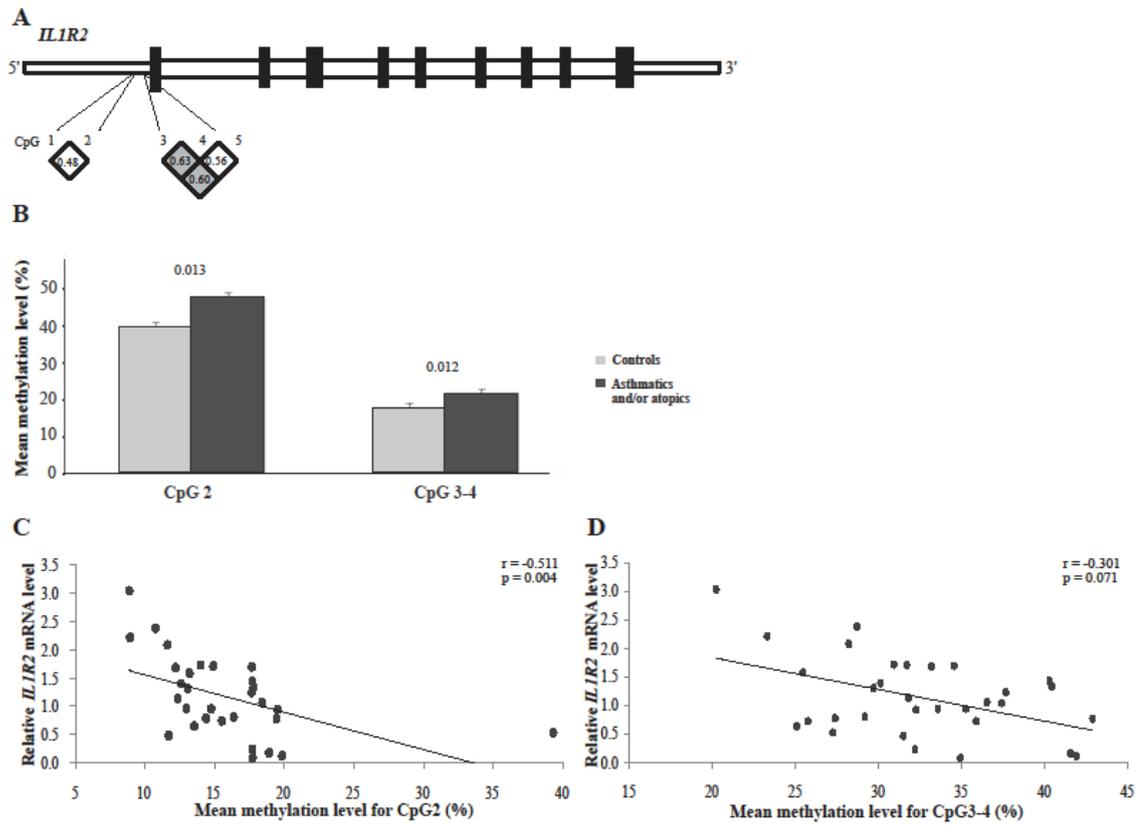
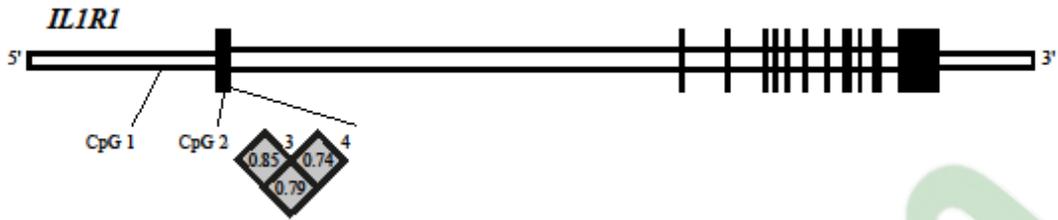


Figure 12. Association between CpGs' DNA methylation levels for *IL1R2* and gene expression in asthma and atopy. A. Schematic representation of *IL1R2*, location of epigenotyped CpG sites and pairwise correlations between CpG sites. B. Mean DNA-Me levels for CpG2 and CpG3-4 of *IL1R2* in control and affected subjects (individuals with asthma, atopy or both). C. Correlation between DNA-Me level of *IL1R2*-CpG2 and mRNA level; and D. Correlation between mean DNA-Me level of *IL1R2*-CpG3 and 4 and mRNA level.



Supplementary figure 1. Schematic representation of *IL1R1* and location of epigenotyped CpG sites.

This figure illustrates a simplified schematic representation of *IL1R1* and location of selected CpG dinucleotide sites and pairwise correlations between each CpG.

IL1R1 - CpG1-4

CCCTCCAGCTCACAGGTATCTGGCCAGGGTGGGGGCACCGCTGTGTTGTAGAC
ATGCTCCTTAAAGAGTGCTTTGTTCCCCTTGGAGTAGGGGACCCCTCCCTCATA
GGGCTGTGGCCTCTCTGCCAGCCAGGAAGGGCCTGAAGTCTGATGGAGGAGG
GCATCTGAGGACAGGGTCTGAGAGTACAC¹CGGTGTGCTGGCCTGCTCTGTGGCT
GGGGTCCTTGGGCGACTGCAGGCTGAGGCTGCTCAGCAGTGAGGAATGCTGA
GTCAAGAGGATGAACAGCTTCTTTCTGAGAAGCCAGGGTGATCGCTGAGTCAT
GCCACTCTTGGCTAACACATGTGCAGCCTGCCCCGGGGCTTTAGGGCTGAGCAT
AACCAGTCCTGCTTTTTATCTTCTTTCTCAACCCCATCTCTTCTTCAGGAAAC
ATTACCAGATGTGTGGCTT²GAGTGTCCATTCC²CGCAACAAAAAC³CGCTCTGCAG
TAAAGCTC⁴CGAGATGGCTGTGTTTGTGTTGGACTGCTCTAGATG

IL1R2 - CpG1-5

TAACAGTTAAAAATCATACAGGACTCTGAAAACAAAACAAAACAAAACAACTT
AACCTTTCTTAGATCCTAAAAGCGTTCCTTGGATGGAAAACCAACTCTTCCAC
TGGCTAAAGATCAAAGCATCTTTTTCTCTTCAATGGGGCCACAGTTGGGCAA
AA¹CGCCCATCACTTTAAAACCACCTCT²CGGCTGGAAGTACGTAATTTTTAG³CG
AGTCACAGAAAAATAGGGAAACTTAT⁴CGG⁵CGTTTCCTTGGCCACTTCCCCA
TCTGGGTGATCATGTACTCAGACCCAGCACTGCAGCCTGGGGGTGCTCCCCG
TGAGGAGGAAAAGGTGTGTCGCTGCCACCCAGTGTGAGCAGGTGACACCAC

Supplementary Figure 2. Potential binding sites for transcription factors in *IL1R1* and *IL1R2*.

This figure shows a segment of the primary sequences of *IL1R1* and *IL1R2*. Both sequences lie in the respective gene promoter (UCSC Genome Browser assembly GRCh38/hg38). Epigenotyped CpG sites are shown in blue and are numbered from the distal part of the promoter. Exons are shown in red. Potential binding sites for transcription factors in differentially methylated *loci* are shown by underlined sequences and the name of the transcription factors are indicated underneath.

2.10. References

Acuner Ozbabacan, S.E., Gursay, A., Nussinov, R., and Keskin, O. (2014). The structural pathway of interleukin 1 (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer. *PLoS computational biology* 10, e1003470.

Blattler, A., and Farnham, P.J. (2013). Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *The Journal of biological chemistry* 288, 34287-34294.

Chamberland, A., Madore, A.-M., Tremblay, K., Laviolette, M., and Laprise, C. (2009). A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Experimental Lung Research* 35, 399-410.

Colotta, F., Dower, S.K., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 15, 562-566.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.

Daley, D., Lemire, M., Akhbir, L., Chan-Yeung, M., He, J.Q., McDonald, T., Sandford, A., Stefanowicz, D., Tripp, B., Zamar, D., *et al.* (2009). Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human genetics* 125, 445-459.

Daley, D., Park, J.E., He, J.Q., Yan, J., Akhbir, L., Stefanowicz, D., Becker, A.B., Chan-Yeung, M., Bosse, Y., Kozyrskyj, A.L., *et al.* (2012). Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1284-1293.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39, 1003-1018.

Islam, S.A., and Luster, A.D. (2012). T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 18, 705-715.

Laprise, C. (2014). The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes Immun* 15, 247-255.

Laprise, C., Sladek, R., Ponton, A., Bernier, M.C., Hudson, T.J., and Laviolette, M. (2004). Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* 5, 21.

Lin, S.Y., Hsieh, S.C., Lin, Y.C., Lee, C.N., Tsai, M.H., Lai, L.C., Chuang, E.Y., Chen, P.C., Hung, C.C., Chen, L.Y., *et al.* (2012). A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun* 13, 214-220.

Morales, E., Bustamante, M., Vilahur, N., Escaramis, G., Montfort, M., de Cid, R., Garcia-Esteban, R., Torrent, M., Estivill, X., Grimalt, J.O., *et al.* (2012). DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 937-943.

Naumova, A.K., Al Tuwaijri, A., Morin, A., Vaillancourt, V.T., Madore, A.M., Berlivet, S., Kohan-Ghadr, H.R., Moussette, S., and Laprise, C. (2013a). Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Human genetics* 132, 811-822.

Naumova, A.K., Al Tuwaijri, A., Morin, A., Vaillancourt, V.T., Madore, A.M., Berlivet, S., Kohan-Ghadr, H.R., Moussette, S., and Laprise, C. (2013b). Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Hum Genet* 132, 811-822.

Paul, W.E. (2015). History of interleukin-4. *Cytokine*.

Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., and Nerup, J. (1992). A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 22, 396-402.

Reinius, L.E., Gref, A., Saaf, A., Acevedo, N., Joerink, M., Kupczyk, M., D'Amato, M., Bergstrom, A., Melen, E., Scheynius, A., *et al.* (2013). DNA methylation in the Neuropeptide S Receptor 1 (NPSR1) promoter in relation to asthma and environmental factors. *PLoS One* 8, e53877.

Seumois, G., Chavez, L., Gerasimova, A., Lienhard, M., Omran, N., Kalinke, L., Vedanayagam, M., Ganesan, A.P., Chawla, A., Djukanovic, R., *et al.* (2014). Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with TH2 memory cell differentiation and asthma susceptibility. *Nat Immunol* *15*, 777-788.

Shen, T.C., Tu, C.Y., Lin, C.L., Wei, C.C., and Li, Y.F. (2014). Increased risk of asthma in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Respir Crit Care Med* *189*, 496-499.

Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., *et al.* (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 6155-6159.

Smith, A.J., Keen, L.J., Billingham, M.J., Perry, M.J., Elson, C.J., Kirwan, J.R., Sims, J.E., Doherty, M., Spector, T.D., and Bidwell, J.L. (2004). Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* *5*, 451-460.

Turker, M.S. (2002). Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* *21*, 5388-5393.

Wang, I.J., Karmaus, W.J., Chen, S.L., Holloway, J.W., and Ewart, S. (2015). Effects of phthalate exposure on asthma may be mediated through alterations in DNA methylation. *Clin Epigenetics* *7*, 27.

Wang, T., Liang, Z.A., Sandford, A.J., Xiong, X.Y., Yang, Y.Y., Ji, Y.L., and He, J.Q. (2012). Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression. *PLoS One* *7*, e48367.

Yang, I.V., Pedersen, B.S., Liu, A., O'Connor, G.T., Teach, S.J., Kattan, M., Misiak, R.T., Gruchalla, R., Steinbach, S.F., Szeffler, S.J., *et al.* (2015). DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol* *136*, 69-80.

**Chapitre 3 – Signature de méthylation du gène de
l’interleukine 33 dans des cellules épithéliales
bronchiques d’individus asthmatiques / Asthma-
induced regulation of IL33 gene expression by DNA
methylation in airway epithelium**

Article soumis au *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

3.1. Avant-propos

Ce troisième chapitre présente les résultats obtenus dans la seconde partie de ce projet de recherche et visait alors à caractériser le patron de méthylation d'IL33 dans des cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques de patients asthmatiques, présentant une sévérité de l'atteinte variable, et de témoins sans asthme ni allergie.

Les diverses analyses de ce volet ont permis de mettre en évidence la signature de méthylation de l'ADN pour le gène *IL33* en lien avec la sévérité de l'asthme. Ces modifications épigénétiques dans le promoteur du gène semblent réguler la transcription en ARNm.

Dre Catherine Laprise a élaboré le profil méthodologique de ce projet, assuré la direction de toutes les étapes incluant la rédaction de l'article en plus de permettre son financement par le biais de ses fonds de recherche des Instituts de recherche en santé du Canada. La Dre Jamila Chakir, principale collaboratrice dans ce projet, est professeure à l'Université Laval et chercheure au Centre de Recherche Université de l'Institut de Cardiologie et de Pneumologie de Québec et a élaboré le profil méthodologique pour la culture cellulaire. Elle a également corrigé l'article. Le Dr Michel Laviolette, pneumologue de l'Institut universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec a réalisé les bronchoscopies et la Dre Chakir a isolé et produit les lignées de cellules épithéliales pour chaque individu ayant participé à l'étude. Elle m'a également permis de séjourner dans son laboratoire pour acquérir les notions en matière de culture de cellules épithéliales. J'ai réalisé le design des amorces, la culture cellulaire, l'extraction d'ADN, la conversion au bisulfite de sodium, l'amplification PCR, le pyroséquençage et les analyses. L'extraction d'ARN et le qRT-PCR ont été fait par Eric Jacques et Sophie Plante du laboratoire de la Dre Jamila Chakir. Anne-Marie Boucher Lafleur, étudiante à la maîtrise en médecine expérimentale sous la direction de Dre Laprise, a aidé considérablement à la réalisation du pyroséquençage. J'ai rédigé l'article sous forme de lettre à l'éditeur qui est actuellement soumis au *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (JACI, facteur d'impact = 11,48).

Title : Asthma-induced regulation of IL33 gene expression by DNA methylation in airway epithelium

Authors : Valérie Gagné-Ouellet¹, BSc, Éric Jacques², MSc, Anne-Marie Boucher-Lafleur¹, BSc, Sophie Plante², MSc, Jamila Chakir², PhD, and Catherine Laprise¹, PhD.

Affiliations : ¹Department of fundamental sciences, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada; ²Centre de recherche, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Quebec City, QC, Canada.

Address for correspondence :

Dr. Catherine Laprise
Université du Québec à Chicoutimi
555 boulevard de l'Université
Saguenay, Qc, Canada, G7H 2B1
Tel.: 418-545-5011 #5659
Email: catherine.laprise@uqac.ca

Key words : *IL33*, methylation, inflammation, T_H2, bronchial epithelial cells, gene expression

Abbreviations:

BECs : Bronchial epithelial cells

CpG : Cytosine-phosphate-guanine dinucleotide site

CTCF : CCCTC binding factor

DNA-me : DNA methylation

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GATA1 : GATA binding protein-1

IL-4 : Interleukin 4

IL-5 : Interleukin 5

IL-13 : Interleukin 13

IL-25 : Interleukin 25

IL-33 : Interleukin 33

IL33 : Interleukin 33 gene

NF κ B : Nuclear factor kappa B/c-rel

TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

$\Delta\beta$: Difference of methylation levels

Declaration of all sources of funding for the research : This work was supported by CL catalyst grant on Environments, Genes and Chronic Disease from Canadian Institutes of Health Research (CIHR). CL holds the Canada Research Chair in Environment and Genetics of Respiratory Disorders and Allergy, and direct the Asthma Strategic Group of the Respiratory Health Network (RHN) of Fonds de la recherche du Québec - santé (FRQS) and is a member of AllerGen NCE. JL is member of the RHN of the FRQS. VGO and AMBL received a Summer Student Research Training Award from AllerGen NCE Inc. and a master degree studentship award from the RHN-CIHR.

3.2. *Résumé*

Une signature de méthylation a été identifiée pour le gène *IL33* dans l'épithélium bronchique isolé de biopsies bronchiques provenant d'individus asthmatiques allergiques. Ces résultats soulignent l'importance d'IL-33 en tant que biomarqueur de l'asthme et de son potentiel comme cible thérapeutique.

3.3. *Capsule summary*

IL-33 has been reported to be associated with allergic asthma onset. Methylation signature of genes related to T_H2 immune responses in allergic asthma has been reported in blood cells. Here we showed that *IL33* expression in bronchial epithelial cells is regulated by DNA methylation in asthma, which highlighted the potential of IL-33 as therapeutic avenue.

3.4. *Introduction*

To the Editor:

Airway epithelium constitutes the first line of host defense against pathogens. Airway epithelial remodeling in asthma includes epithelial hypertrophy, disruption of tight junctions, loss of epithelial integrity, impairment of barrier function, and cell death; features which correlate with asthma severity (Davies 2009). It is now recognized that epithelial cells are the first set of immune cells interacting with antigens such as aeroallergens in allergic individuals (Lambrecht et Hammad 2014). The allergen-epithelial cells interactions release a plethora of inflammatory mediators activating both the innate and adaptive responses; hence the epithelium is likely to play a key role in the development and persistence of inflammatory response (Lloyd et Saglani 2015). Epithelial derived cytokines include thymic stromal lymphopoietin (TSLP), interleukin (IL) -25 and -33 (Gandhi et Vliagoftis 2015) and trigger T_H2-driven inflammation, a key pathophysiological mechanism underlying the development of allergic asthma (Lloyd et Saglani 2015). In the last decade, IL-33 has been investigated for its potential role as a biomarker for asthma severity (Tsicopoulos *et al.* 2013). Genetic variants in *IL33* gene have been found to be associated with asthma in several genome-wide association studies (GWASs) (Grotenboer *et al.* 2013). Moreover, gene and protein expression of IL-33 were higher in bronchial epithelial cells (BECs) from asthmatic than non-asthmatic individuals (Prefontaine *et al.* 2010). However, how these genetic associations translate into biological impact is not totally understood. We hypothesized that epigenetic regulation

of IL-33 may contribute to asthma. We aimed to characterize the DNA methylation (DNA-me) and mRNA signatures of IL-33 in BECs from asthmatic and healthy individuals.

3.5. Results

Twenty-one BEC lines were selected from the Primary Airway Cell Biobank (Dr. Chakir, Quebec City Biobank) (4 severe asthmatics, 7 mild asthmatics, and 10 healthy lineages). The severity of asthma was ascertained based on symptomatology and medication, following the American Thoracic Society criteria (ATS 1987). Clinical characteristics are presented in Table 3. Five CpG dinucleotides were selected near the *IL33* transcription start site (Figure 13A) to evaluate DNA-me differences ($\Delta\beta$) between different groups (see the Appendix for the method).

IL33 CpG dinucleotides 2 and 3 were highly correlated together ($r>0.6$, $p<0.05$) and were analyzed together subsequently (Figure 13A). Among the five selected CpG dinucleotide sites, only CpGs 2 and 3 reached statistical significance. Student's t-test analyses shown that *IL33* CpGs 2 and 3 were less methylated in BECs from asthmatic than from control individuals ($\Delta\beta=20\%$, $p=0.002$) (Figure 13B). When stratified by asthma severity, DNA-me in mild asthmatic was significantly higher than control cells ($\Delta\beta=22\%$, $p=0.005$) and severe asthmatic were higher than control cells, though did not reach statistical significance ($\Delta\beta=17\%$, $p=0.090$) (Figure 13B).

RNA was extracted from a subset of the BEC cell lines evaluated for methylation levels, including samples from asthmatic and healthy individuals, to measure *IL33* mRNA expression. Asthmatic BECs demonstrated higher *IL33* mRNA levels than control cells (fold change=3.4, $p=0.017$) (Figure 13C). When stratified by severity, higher mRNA levels was detected in mild as compared to control cells (fold change=2.3, $p=0.047$) and a similar trend was observed for severe asthmatic cells (fold change=4.7, $p=0.060$) (Figure 13C). Moreover, promoter methylation was negatively correlated with mRNA level ($r=-0.750$, $p=0.05$) (Figure 13D).

3.6. Discussion

Our results suggest that in the airway epithelium, DNA-me modifications of cytokine genes, which are important in T_H2 responses, contribute to asthma development.

The pathological changes in the epithelium in asthma decrease the efficiency of this physical barrier against pathogens and increase antigen-epithelium interactions; subsequently trigger the innate and adaptive immune responses through T_H2 cytokines production (Lloyd et Saglani 2015). IL-33 is a good candidate to investigate since it could induce, activate, and attract innate lymphoid cells type 2 and T_H2 lymphocytes (Lloyd et Saglani 2015). These cells have been shown to release T_H2 mediators (e.g. IL-4, IL-5, and IL-13) through the activation of NFκB pathway in chronically inflamed allergic airways (Locksley 2010). It has been reported that in the nasal epithelial cells of allergic subjects, epigenetic modifications of genes in NFκB pathway occurred even in the absence of stimulus (Vroling *et al.* 2008). In this study, we observed reduced DNA-me levels in the promoter of *IL33* in unstimulated BECs from asthmatics as compared to controls. Our study showed and suggested for the first time that substantial decrease methylation in the *IL33* promoter could lead to an upregulation of IL-33 transcription in BECs from asthmatic individuals, thus highlighting the merit in considering epigenetic modification as a regulatory mechanism of gene expression in the airway epithelium. Moreover, our results imply that DNA-me of disease relevant cytokines could be therapeutic targets for asthma (Varriale 2014). Given that IL-33 is a pleiotropic alarmin released after stress and mechanical damage (Luthi *et al.* 2009), tissue-specific blockade of IL-33 in asthmatic individuals through DNA-me may be more biologically relevant and efficient than systemic blockade.

To further investigate the impact of DNA-me on gene expression, we examined the genomic region housing the 5 CpGs to identify the potential binding motifs of transcription factors, especially those relevant to immunity. Using the software MatInspector, the transcription factors with the most relevance to asthma are GATA binding protein-1 (GATA1) and CCCTC-binding factor (CTCF) (Supplementary Figure 3). GATA1 belongs to the GATA family of transcription factors, with members involved in the promotion of T_H2 cytokines expression (Finotto 2008). Hence it is plausible that the decreased methylation in *IL33* promoter in asthmatic individuals may promote the binding of GATA1 to the promoter and upregulate gene expression. CTCF is known as a chromatin insulator and generally binds to an enhancer region of a target gene (Yang *et al.* 2014a). CTCF had been found to regulate the innate immune response in murine models (Schaack *et al.* 2011). Further work is needed to investigate the interactions

between the *IL33* CpG sites with differences in methylation marks and these transcription factors.

The present results suggest that, in asthma, the increased *IL33* gene expression in the epithelium is driven by DNA-me. In addition to DNA-me, other mechanisms are likely to influence the expression of relevant genes. Our previous work has suggested that miRNA could regulate gene expression in the epithelial cells of severe asthma (Haj-Salem *et al.* 2015). Hence, the transcriptional regulation of asthma-associated genes in the epithelium is likely to be the combined actions of various epigenetic modifications (i.e. DNA-me, miRNA and histone modifications, and gene-environment interactions).

3.7. Conclusions

In summary, this study provides the first evidence of epigenetic regulation of gene expression in the epithelium of asthmatic airway. Further investigations are needed to elucidate the biological impacts of these interactions in the bronchial epithelium layer. Our results demonstrated that epithelial cells-secreted IL-33 is a plausible candidate for being a prognostic asthma biomarker. Furthermore, given the dynamic reversibility of DNA-me, therapeutic manipulation of methylation in the *IL33* promoter in the epithelium may reduce the need of systemic blockade of the cytokine.

The authors thank all volunteers for their valuable participation.

3.8. Disclosure of potential conflict of interest

None.

Table 3. Clinical data of healthy controls and asthmatic individuals

Characteristics	Healthy controls (n=10)	Mild asthmatics [§] (n=7)	Severe asthmatics [§] (n=4)
Sex ratio (M:F)	1.5:1	0:6	1:1
Mean age, yr (range)	30 (21-50)	23 (20-31)	63 (62-65)
FEV ₁ , % predicted (SD)*	100 (13)	98 (13)	65 (9)
PC ₂₀ , mg/ml (SD) [†]	96.5 (1.9)	1.2 (3.9)	n/a
ICS dose (µg/day) [‡]	-	0	1344
Atopy (%)	-	100	75

[§]Present asthma or past documented clinical history of asthma. Data available for all individuals.

*FEV₁ = Mean and standard deviation (SD) calculated for forced expiratory volume in 1 second. Data available for all individuals.

[†]PC₂₀ = Geometric mean and SD of provocative methacholine concentration inducing 20% decline in FEV₁ calculated for all individuals.

[‡]ICS dose = Mean dose of inhaled corticosteroids (ug/day). Data available for all asthmatic individuals.

^{||}Defined as having at least 1 positive response on the skin prick test (wheal diameter ≥3 mm at 10 minutes). Data available for all individuals.

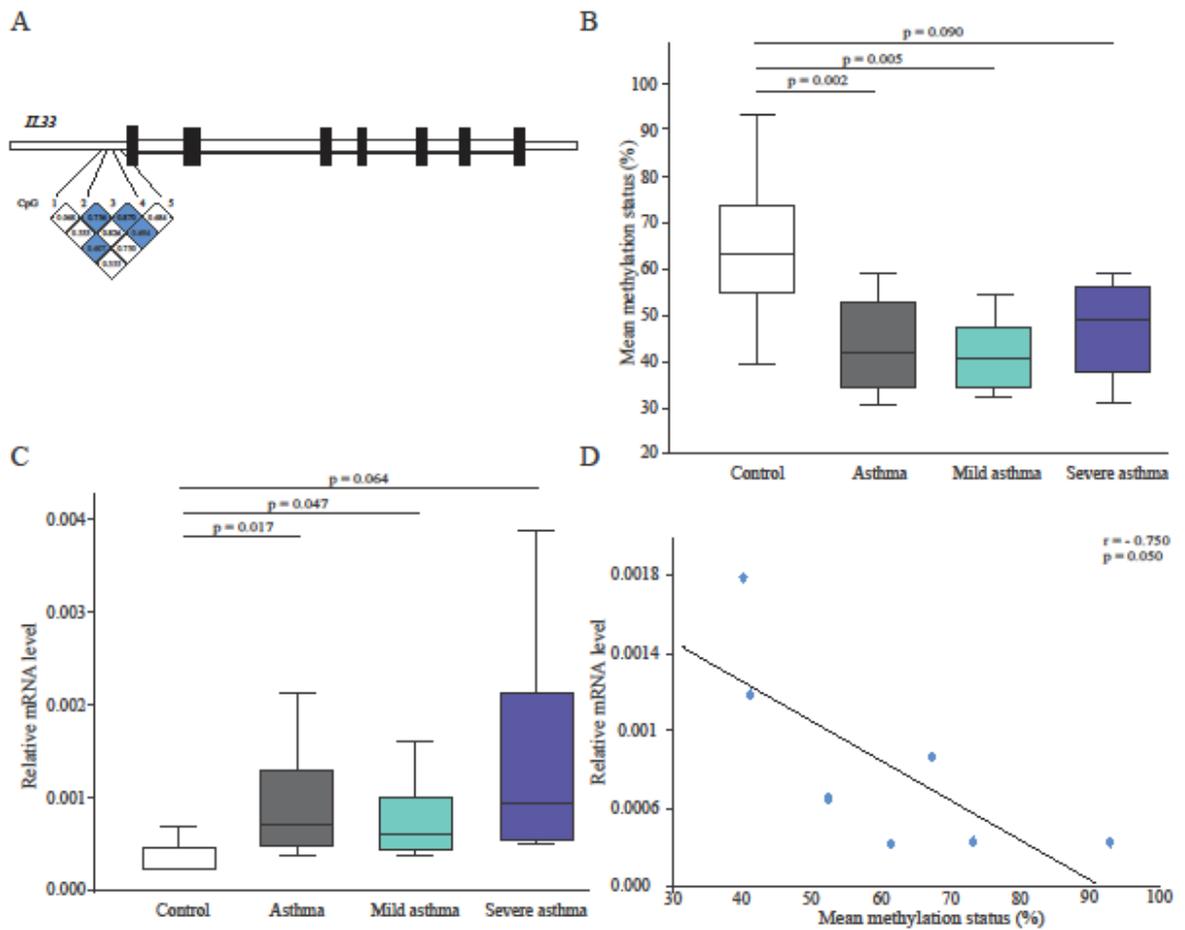


Figure 13. DNA methylation at the *IL33* promoter region and gene expression in asthma. A. Schematic representation of *IL33* demonstrating the location of selected CpG dinucleotides and pairwise correlations between each CpG. Blue squares show significant correlation between CpGs ($r > 0.6$, $p < 0.5$). B. Mean methylation level for CpG2-3 of *IL33* for control, all asthmatic and for samples from individuals with mild and severe asthma separately. C. Comparison of mRNA levels between the same selected groups. D. Correlation between DNA methylation and mRNA levels in bronchial epithelial cells (BECs).

TAGGATGTGGAATCAGTCCAAGTCTTAAAAGAGCATTACTTCATCCCT
 TTATTTTCTGSTACAGATGCCAAACCGAGATGGAGAGAGGGGTGAGTAG
 GAGCAAATTTCTCATGAGGTAAGAAGAACAACCTTSTCATGGGATCT
 ATAGTACAGGATTTGCTTTTGTGATAAAAGTATTATCTTCTGCGAGATT
 TTTGAGATGAATAGAAAGAAAAGATGAACAGTGGGGARCAGGAAAG
 CCCRTCAGATAYGTTGGAATACAGAGTATTTTCAGAGCTTTTATTTGCA
 GACGAGCTGCTTATTACTGATAGGCCAAAGGGGGTCGCAAATTTCTA
 TTATAAAGGAATTTGGAAGAATACACTGATCTCTTAATGAAGTTTGTA
 AATTAAGAAGCCAACGGCCAAAAGTGAATATATAAATGGCAAMAGA
 ATTTCAAATGKAMAGTGCTGAAGTTGAAGTTTAGGAGTTCAACTCC
 AAAGAGAGCCAAAACATAAAGTTTAGGGGCAGAAGAMGAATCATAA
 TTGCTGGYTTAAAATATTCAGATGGAGGGAGGACGCAGAAAGTAGTG
 AGCCTTAGATGTTGACAGAATTGTAACCTCTGTTGGCTCTTTACATGAG
 ATTTCAAGCCTGCTAAAATCTCACCCGCCAGATMTCCTTCTAAGGC
 AATTTGGGTCTCTGCCAAACTTTGGCTAATAAAAAGAGTCYACAGAC
 TCCTCCGAACACAGAGCTGCAGCTCTTCAGGGAAGAAATCAAAACAA
GATCACAAG

Supplementary Figure 3. Potential binding sites for transcription factors in interleukin 33 promoter gene locus. This is the primary sequence of *IL33* representing the promoter region located before transcription start site (TSS). The first exon is highlighted (UCSC Genome Browser assembly GRCh38/hg38). Epigenotyped CpG dinucleotides are numbered and colored in blue. The sequence of the potential binding sites for transcription factors GATA1 and CTCF are underlined.

3.9. References

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

Davies, D.E. (2009). The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6, 678-682.

Finotto, S. (2008). T-cell regulation in asthmatic diseases. *Chem Immunol Allergy* 94, 83-92.

Gandhi, V.D., and Vliagoftis, H. (2015). Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Front Immunol* 6, 147.

Grotenboer, N.S., Ketelaar, M.E., Koppelman, G.H., and Nawijn, M.C. (2013). Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol* 131, 856-865.

Haj-Salem, I., Fakhfakh, R., Berube, J.C., Jacques, E., Plante, S., Simard, M.J., Bosse, Y., and Chakir, J. (2015). MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGFbetaR2 gene in severe asthma. *Allergy* 70, 212-219.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 134, 499-507.

Lloyd, C.M., and Saglani, S. (2015). Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* 34C, 52-58.

Locksley, R.M. (2010). Asthma and allergic inflammation. *Cell* 140, 777-783.

Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., *et al.* (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.

Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 752-754.

Schaack, J., Qiao, L., Walkiewicz, M.P., Stonehouse, M., Engel, D.A., Vazquez-Torres, A., Nordeen, S.K., Shao, J., and Moorhead, J.W. (2011). Insertion of CTCF-binding sites into a first-generation adenovirus vector reduces the innate inflammatory response and prolongs transgene expression. *Virology* 412, 136-145.

Tsicopoulos, A., de Nadai, P., and Glineur, C. (2013). Environmental and genetic contribution in airway epithelial barrier in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13, 495-499.

Varriale, A. (2014). DNA methylation, epigenetics, and evolution in vertebrates: facts and challenges. *Int J Evol Biol* 2014, 475981.

Vroling, A.B., Jonker, M.J., Luiten, S., Breit, T.M., Fokkens, W.J., and van Drunen, C.M. (2008). Primary nasal epithelium exposed to house dust mite extract shows activated expression in allergic individuals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 293-299.

Yang, B., Wagner, J., Damaschke, N., Yao, T., Wuerzberger-Davis, S.M., Lee, M.H., Svaren, J., Miyamoto, S., and Jarrard, D.F. (2014). A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation. *PLoS One* 9, e88052.

3.10. Appendix - Methods

3.10.1. Bronchial epithelial cell lines (BECs)

A total of 21 cell lines were selected for the study. Among them, 4 were severe asthmatic individuals, 7 were mild asthmatic individuals and 10 were healthy individuals. The degree of severity of asthma was based on symptomatology and medication following American Thoracic Society criteria (ATS 1986). Atopic individuals responded positive to at least one common allergen after allergy skin prick tests. The healthy individuals had no history of asthma and atopy. BEC lineages were obtained by Dr. Michel Laviolette at the Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ). BECs were obtained by flexible bronchoscope sampling methodology as described elsewhere (McNamara, Kicic *et al.* 2008). The isolation of BECs and cell culture was performed as previously described by Dr. Jamila Chakir (Chakir, Dube *et al.* 2000). Cells were used at passage 3 maximum. This study was approved by the Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean (CIUSSS) and the IUCPQ Human Ethic Committees. All participants gave their informed consent.

3.10.2. DNA methylation level measure

Three regions from the *IL33* gene were assessed for a total of 5 CpG dinucleotides upstream (i.e. maximum of 1kb) Transcription Start Site (TSS) (GRCh38). Primers were selected using the PyroMark Assay Design Software (v2.0.1.15) (Qiagen, Canada). DNA was extracted from BECs when 90% confluence was reached according to the Blood & Cell Culture Midi Kit guidelines (Qiagen, Canada). Two micrograms of DNA were treated with sodium bisulfite using EpiTech Bisulfite Kit (Qiagen, Canada) following manufacturer's instructions. Bisulfite-treated DNA was then amplified with Pyromark PCR kit (Qiagen, Canada) and the cytosine methylation rates were assessed by bis-pyrosequencing using the PyroMark Q24 Advanced kit and PyroMark Q24 software v2.0.6 (Qiagen, Canada).

3.10.3. Expression study

Total RNA was extracted from a subset of the cultured BECs with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Canada). The mRNA was converted into cDNA with a reverse transcription using the qScript™ cDNA SuperMix (Quanta BioSciences, USA). The expression level was measured by qRT-PCR using TaqMan technology on Corbett RotorGene following the $\Delta\Delta C_t$ method with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) as a reference gene. This gene was shown to be stable in epithelial tissues in Dommisch and colleagues' study in an inflammatory context (Dommisch, Winter *et al.* 2015). The PerfeCTa® qPCR FastMix® Reaction Mixes was used (Quanta BioSciences, USA). We tested all primers for efficiency with a dilution series and all of them gave an efficiency of amplification of 100%. All samples were diluted in the middle range of the standard curve and were measured in triplicate with a negative control, and qRT-PCRs were performed two times.

3.10.4. Statistical analyses

Normal distribution of all variables was assessed using a Shapiro-Wilks test. Correlation coefficients between CpG 1 to 5 were measured using a Pearson's correlation test. When $r > 0.6$ and $p < 0.5$, CpG dinucleotides were analyzed together. The association between DNA-me or mRNA levels and asthma was assessed using Student's t-tests. Then, the association between DNA-me and mRNA levels was assessed using a Pearson's correlation test. The results were considered significant when $p < 0.05$ (two-sided). Statistical analyses were performed with SPSS software v11.5.0 (IBM, USA).

3.10.5. Identification of potential binding motifs

Potential transcription factor binding sites in promoting area of *IL33* gene were investigated using the Genomatix software (MatInspector, <http://www.genomatix.de>) (Cartharius, Frech *et al.* 2005). The Genomatix program uses a position weight matrix to identify a possible binding site for transcription factors according to the similarity of the weight matrix. Transcription factor binding sites relevant to immunity were considered if they reach the 0.85 matrix similarity threshold.

3.10.6. References

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

Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933-2942.

Chakir, J., Dube, J., Laviolette, M., Goulet, F., Germain, L., Auger, F., and Boulet, L.P. (2000). Isolation and characterization of human airway fibroblasts in culture. *Methods Mol Med* 44, 53-65.

Dommisch, H., Winter, J., Gotz, W., Miesen, J., Klein, A., Hierse, L., Deschner, J., Jager, A., Eberhard, J., and Jepsen, S. (2015). Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing. *Clin Oral Investig* 19, 209-220.

McNamara, P.S., Kicic, A., Sutanto, E.N., Stevens, P.T., and Stick, S.M. (2008). Comparison of techniques for obtaining lower airway epithelial cells from children. *Eur Respir J* 32, 763-768.

Chapitre 4 - Discussion

Cette section inclut des éléments de discussion complémentaires à ceux considérés dans les articles présentés aux chapitres 2 et 3 respectivement. Ainsi, même si certains éléments se chevauchent pour aider à la compréhension, les notions abordées seront présentées dans un contexte plus global quant à la physiopathologie de l'asthme.

4.1. Association épigénétique entre les récepteurs de type 1 et 2 de l'interleukine 1 et l'asthme

Des gènes candidats ont été identifiés grâce à des études d'associations, des études comparatives d'expression entre individus asthmatiques et témoins et des études comparatives des niveaux protéiques. La méthylation de l'ADN permet de mieux définir le lien qui existe entre les facteurs génétiques et l'expression génique. Le présent mémoire a permis dans un premier temps d'associer la signature de méthylation du gène du récepteur de type 2 de l'interleukine 1 (*ILIR2*) à l'asthme et l'allergie dans les leucocytes. Il a également permis de démontrer que cette augmentation de la méthylation chez des individus asthmatiques et allergiques en comparaison avec des témoins pouvait entraîner une diminution de la production d'ARNm pour ce gène. Ces résultats suggèrent que la transcription du gène *ILIR2* dans les leucocytes d'individus asthmatiques et allergiques pourrait être régulée, du moins en partie, par la méthylation de l'ADN dans le promoteur de ce gène. Cette régulation pourrait s'expliquer par un accès limité aux sites de fixation des facteurs de transcription par les cytosines méthylées dans le promoteur du gène (Blattler et Farnham 2013). De manière précise, l'étude de Blattler et Farnham a permis d'identifier des motifs de fixation près des sites CpG analysés pour certains facteurs de transcription ayant un rôle biologique dans l'asthme et l'allergie. Aucune différence de méthylation significative dans le promoteur du gène *ILIR1* entre les individus asthmatiques et les témoins n'a été observée.

Une différence de méthylation de 8% a été évaluée pour le gène *ILIR2* entre les individus asthmatiques et les témoins dans un sous-échantillon de la collection familiale du Saguenay–Lac-Saint-Jean. À ce jour, une revue des études de méthylation par la méthode du bis-pyroséquençage faites en lien avec l'asthme et l'allergie rapporte des résultats significatifs qui varient entre 1 et 5% (Devries et Vercelli 2013; Kabesch 2014). Cette revue témoigne de l'importance de la différence obtenue dans les présents travaux.

Bien qu'il soit évident que ces résultats n'expliquent pas à eux seuls les causes de la pathogénèse et de la persistance de l'asthme et de l'allergie (Relton et Davey Smith 2012), ils contribuent à documenter un mécanisme possible de régulation tissu-spécifique de la transcription en lien avec la voie biologique de l'IL-1 dans ce trait complexe. Il est ensuite possible de spéculer sur l'effet que peuvent avoir les modifications du niveau d'ARNm dans les tissus, mais il ne s'agit là que d'hypothèses à valider par le biais d'études fonctionnelles.

Ainsi, à partir des résultats obtenus, il est possible de concevoir que la signature épigénétique du gène *IL1R2*, indépendamment du gène *IL1R1*, entraînerait une diminution de son expression dans l'asthme et l'allergie, et que celle-ci provoquerait une réduction du nombre de récepteurs leurres à la surface des cellules immunitaires (Colotta *et al.* 1993). Tel que décrit précédemment, l'IL-1 peut se fixer à l'un ou l'autre de ses récepteurs. La formation du complexe IL-1-IL1R1 favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie T_{H1}. Le complexe IL-1-IL1R2 diminue la quantité de ligands disponibles pour la fixation avec le récepteur actif et favorise donc indirectement la voie T_{H2} en se basant sur le concept de balance (Dinarello 2002). L'IL-1 peut également engendrer des cellules T_{H17} (Aymeric et Lefranc 2009). Ainsi, en diminuant la quantité d'IL1R2, les voies T_{H1} et/ou T_{H17} pourraient être plus sollicitées par une augmentation de la fixation du ligand avec le récepteur actif (IL1R1), dont le patron de méthylation n'est pas modifié chez les individus asthmatiques (Colotta *et al.* 1994; Garlanda *et al.* 2013a). Cette hypothèse serait à vérifier et le projet en découlant serait une suite logique des présents travaux.

4.1.1. Discordance entre les résultats d'expression du récepteur 2 de l'interleukine 1 obtenus et ceux rapportés dans la littérature scientifique

L'équipe de la Dre Catherine Laprise avait déjà souligné l'importance d'approfondir les connaissances sur *IL1R2* en 2004 et en 2009. Des articles présentant une augmentation de l'expression d'*IL1R2* dans les biopsies bronchiques de personnes asthmatiques ont d'ailleurs été publiés (Laprise *et al.* 2004; Chamberland *et al.* 2009). Or, la présente étude démontre une augmentation de la méthylation de ce même gène chez les asthmatiques, ce qui entraînerait une diminution de l'expression. Cette divergence pourrait s'expliquer par le profil méthodologique différent entre ces deux études. En effet, les premières études publiées par l'équipe de Laprise (Laprise *et al.*

2004; Chamberland *et al.* 2009) présentent des résultats réalisés à l'aide de micropuces alors que l'étude d'expression réalisée dans le cadre de ce projet a été réalisée par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel. Ces techniques sont toutes les deux très utilisées et présentent des résultats valides (Wang *et al.* 2006). Un résumé publié en 2011 par Sarwal, Sigdel et Salomon souligne que la PCR est plus précise que la micropuce, ce qui s'explique entre autres par la meilleure sensibilité de la PCR à détecter les séquences comparativement à la micropuce (Sarwal *et al.* 2011). Ensuite, Wang et ses collègues ont démontré que la PCR en temps réel est plus sensible lorsque les niveaux d'ARNm sont très bas (Wang *et al.* 2006), ce qui est le cas pour les interleukines et leurs récepteurs (Bruder *et al.* 2007). Les divergences importantes obtenues entre les mesures d'expression dans les cellules sanguines totales et les biopsies bronchiques sont toutefois peu probablement engendrées par la méthodologie utilisée puisque les résultats d'expression d'*IL1R2* dans les biopsies bronchiques obtenus par l'équipe de la Dre Laprise ont été validés dans deux études indépendantes.

La source ayant servi à l'extraction de l'ARN pourrait expliquer la divergence des résultats. En effet, la spécificité de l'expression des gènes en termes de tissus et de cellules (*tissue-* et *cell-specificity*) est clairement démontrée par différentes études retrouvées dans la littérature scientifique (Stefanowicz *et al.* 2012; Gutierrez-Arcelus *et al.* 2015). Les premières études concernant ce gène ont été réalisées dans des biopsies bronchiques, alors que la présente étude a été faite dans le sang complet. Ces deux modèles tissulaires sont hétérogènes quant aux types cellulaires (Wiktorowicz et Jamaluddin 2014) et il est également important de noter qu'à la fois la composition en types cellulaires et les proportions de cellules qui composent ces modèles hétérogènes sont variables et que cette variabilité est à la fois tissu dépendante et individu dépendante. Précisément, le sang permet d'acheminer les cellules immunitaires aux tissus cibles et est composé de cellules circulantes tandis que le poumon qui constitue le site d'inflammation dans le cas de l'asthme est composé de cellules résidentes (Roitt 2007). À cette variabilité de composition cellulaire, il faut ajouter les différentes proportions de ces dites cellules qui composent l'échantillon d'un individu à un autre (variabilité interindividuelle). De plus, il faut considérer l'environnement de ces cellules qui est aussi différent d'un individu à l'autre (Stefanowicz *et al.* 2012). Ainsi, dans un modèle hétérogène composé en partie de cellules inflammatoires, la variabilité de composition de l'environnement cellulaire (par exemple de cytokines) peut être la cause de

modifications épigénétiques (Stoyanov *et al.* 2015). Il est donc possible que le niveau d'expression et que le profil épigénétique d'*IL1R2* soient différents entre les personnes asthmatiques et les témoins mais que ces différences soient inversées dans ces deux tissus de nature différente. Des études fonctionnelles pourraient permettre de faire le lien conceptuel entre ces observations et la fonction de ces complexes biologiques, IL-1-IL1R1 et IL-1-IL1R2, dans la physiopathologie de l'asthme.

4.1.2. Signature de méthylation pour le récepteur de type 2 de l'interleukine 1 dans l'asthme et le lupus systémique érythémateux, deux pathologies à composantes inflammatoire

Une signature épigénétique dans le promoteur d'*IL1R2* a été rapportée dans la littérature en lien avec le lupus systémique érythémateux (SLE) (Lin *et al.* 2012). De plus, une étude publiée par Shen et ses collègues a permis de démontrer que le risque de développer de l'asthme était plus élevé chez les patients atteints de SLE (Shen *et al.* 2014). Cette étude suggère que les deux pathologies partagent plusieurs biomarqueurs (Hsiao et al. 2014). Il est possible d'envisager que l'*IL1R2* soit l'un de ces biomarqueurs. En effet, ces signatures de méthylation de l'*IL1R2* identifiées dans les deux pathologies témoignent du rôle que peut jouer ce gène dans le processus inflammatoire. Toutefois, dans l'étude de Lin, le promoteur du gène était moins méthylé dans des leucocytes provenant d'individus atteints de SLE en comparaison avec des individus sains, tandis que dans l'asthme, le promoteur d'*IL1R2* est plus méthylé dans les échantillons sanguins d'individus atteints. Cela suggère que pour ces deux maladies à composante inflammatoire (Shen et al. 2014), les voies biologiques impliquées comportent des spécificités propres à la pathologie. L'asthme, l'allergie et la SLE sont des maladies multicellulaires pour lesquelles l'importance des lymphocytes T a été démontrée dans la pathogénèse et la persistance de chacune de ces pathologies (Kobayashi et al. 2013; Dema et Charles 2014) et pour lesquelles les voies impliquées sont principalement de types T_{H1}, T_{H2} et T_{H17} (Choi et al. 2012; Kobayashi et al. 2013). Toutefois, l'importance de chacune de ces voies de différenciation dans l'inflammation peut varier selon le phénotype. La SLE résulte en majeure partie d'une infiltration de neutrophiles (Wan et al. 2012). Ces cellules sont recrutées et activées entre autres par les cellules T_{H1} et T_{H17} (Pelletier et al. 2010; Pelaia et al. 2015). Bien que certaines formes d'asthme sévère puissent être caractérisées par une abondance de neutrophiles, cette portion de personnes

asthmatiques représente une faible proportion des cas et la majorité des individus asthmatiques présente un profil inflammatoire à prédominance éosinophilique (Pelaia et al. 2015). C'est d'ailleurs le cas pour la collection familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean qui a été construite sur la base du phénotype asthme allergique léger à modéré et dont les individus ciblés dans la présente étude portant sur *IL1R2* présentent une inflammation éosinophilique. Les éosinophiles sont principalement recrutés et activés par les cellules T_H2 (Pelaia et al. 2015). Ainsi, les cascades biologiques distinctes pourraient logiquement expliquer les différences d'expression d'*IL1R2* mesurées.

4.2. Association épigénétique entre l'interleukine 33 et l'asthme

Le chapitre 3 présentait l'importance de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la libération des cytokines inflammatoires par le tissu épithélial bronchique chez les individus souffrant d'asthme. Le rôle immunitaire de l'épithélium a longtemps été limité à celui d'une barrière physique. Or, plusieurs fonctions immunitaires de l'épithélium bronchique sont désormais documentées dans la littérature et soulignent l'importance de mieux comprendre comment ces cellules interagissent entre l'environnement et le tissu pulmonaire (Gandhi et Vliagoftis 2015). Bien que l'épithélium respiratoire soit connu pour contribuer à l'inflammation dans l'asthme par les interactions environnement-épithélium, les mécanismes qui permettent le relâchement des cytokines pro-inflammatoires de type T_H2 (incluant entre autres l'interleukine 33 (IL-33)) sont peu documentés (Lloyd et Saglani 2015). Le présent mémoire visait donc, dans un second temps, à déterminer si la régulation d'IL-33 dans l'épithélium bronchique d'individus asthmatiques et témoins sans asthme ni allergie pouvait être régulée par la méthylation de l'ADN.

Ainsi, la présente étude a également permis de documenter la signature épigénétique d'*IL33* dans l'asthme au niveau des cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques. Plus précisément, la différence de méthylation entre les lignées provenant d'individus asthmatiques et témoins mesurée est de 20% ce qui constitue une différence substantielle par rapport aux différences retrouvées dans la littérature scientifique (Devries et Vercelli 2013; Kabesch 2014). Cette signature de méthylation est associée à une augmentation de l'expression du gène de l'ordre de 3,4 fois dans les lignées provenant de personnes asthmatiques indépendamment du degré de sévérité de la maladie. Ces résultats suggèrent que des niveaux de méthylation du promoteur d'*IL33*

moins élevées dans les lignées épithéliales bronchiques provenant d'individus asthmatiques entraînent une régulation à la hausse de l'expression du gène. Une plus grande fixation des facteurs de transcription due à une diminution de la méthylation pourrait expliquer l'augmentation de la production d'ARNm observée dans la présente étude (Brasier 2014). En effet, il a été possible, à partir des bases de données publiques, d'identifier deux motifs de fixation de facteurs de transcription près des sites CpG analysés. Cette observation permet d'envisager qu'en raison d'une diminution de la méthylation dans le promoteur d'*IL33*, les individus asthmatiques pourraient présenter une augmentation de l'accessibilité des motifs de fixation des facteurs de transcription, incluant le *globin transcription factor 1* (GATA1) et le *zinc finger protein* (CTCF) et de surcroît une plus grande production d'ARNm d'*IL33* qui pourrait ultérieurement être traduits en protéine.

Il est ensuite possible de spéculer sur l'impact fonctionnel de la déméthylation du gène d'IL-33 dans un contexte d'asthme allergique. La sécrétion de cette cytokine, suite à la fixation à son récepteur actif ST2, permet le recrutement et l'activation de plusieurs cellules immunitaires puisque le récepteur est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires (incluant les lymphocytes, les ILC2, etc.) (Farahani *et al.* 2014). Ainsi, les cellules lymphoïdes innées de type 2 et les cellules T_H2 peuvent être activées par l'IL-33. Une fois activées, ces cellules engendrent la libération de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (Smithgall *et al.* 2008; Kobayashi *et al.* 2013; Lund *et al.* 2013). Ces cytokines favorisent ensuite le recrutement des éosinophiles et divers aspects du remodelage des voies respiratoires (Hall et Agrawal 2014). Entre autres, ils permettront la métaplasie des cellules à gobelet, la prolifération des cellules du muscle lisse et la fibrose sous-épithéliale (Pelaia *et al.* 2015). L'IL-33 a aussi été documentée pour sa contribution à la prolifération des fibrocytes, producteurs de collagènes liés au remodelage observé dans les exacerbations des individus asthmatiques (Bianchetti *et al.* 2012). Par conséquent, une augmentation de l'expression d'*IL33* causée par une déméthylation du promoteur du gène pourrait, par les voies brièvement décrites dans les lignes précédentes, contribuer à une augmentation des mécanismes inflammatoires et du remodelage des voies respiratoires, et donc aux exacerbations de la symptomatologie et à la persistance de l'asthme.

La présente étude corrobore le fait que l'expression d'*IL33* est en lien avec la sévérité de l'atteinte asthmatique. En effet, Miller et ses collègues avaient déjà rapporté que l'augmentation de l'expression d'*IL33* était dépendante du degré de sévérité de la maladie (Miller 2011). Une étude subséquente de Guo a ensuite permis de documenter l'augmentation du niveau protéique d'*IL-33* selon le degré de sévérité dans le plasma sanguin (Guo *et al.* 2014). Dans la présente étude, la différence entre la quantité d'*IL33* entre les cellules isolées de personnes asthmatiques et les témoins s'est retrouvée deux fois plus importante dans le cas d'une atteinte sévère comparativement à la différence mesurée entre les individus asthmatiques légers et les témoins. Cette augmentation de l'expression semble en partie régulée par la méthylation de l'ADN tel que démontré par la corrélation entre ces deux paramètres. Par ailleurs, bien que la méthylation et l'expression aient été corrélées, le lien obtenu avec la sévérité pour la mesure d'expression n'a pas été retrouvé pour la méthylation. Ainsi, la différence de méthylation entre les personnes asthmatiques et les témoins n'était pas de plus en plus importante en fonction de la sévérité. Une augmentation du nombre de participants avec une atteinte sévère aurait peut-être permis d'établir un lien similaire à ce qui a été observé pour l'expression, i.e. une diminution de la méthylation de plus en plus importante avec une sévérité de l'atteinte plus importante. Il faut toutefois reconnaître que pour ce genre d'étude il est nécessaire de réaliser des biopsies bronchiques, technique invasive pour les participants et qui comportent des risques de complication (par exemple une infection respiratoire), ce qui explique la difficulté d'obtenir des groupes aussi importants que lors de ceux avec les échantillons sanguins particulièrement pour les patients dont l'atteinte est sévère.

Il est possible d'envisager que d'autres mécanismes pourraient être également impliqués dans la régulation de la transcription d'*IL33* dans les cellules épithéliales bronchiques de personnes asthmatiques. Les miARN seraient à privilégier parce que les modifications d'histones sont généralement corrélées avec la méthylation de l'ADN (Razin et Cedar 1977). D'ailleurs, les récents travaux de la Dre Jamila Chakir ont démontré l'importance de la régulation transcriptionnelle par les miARN (Haj-Salem *et al.* 2015). Leurs résultats suggèrent que le miARN 19a, relié principalement au phénotype sévère d'asthme, permettrait la prolifération des cellules épithéliales bronchiques (BEC) en réponse à une activation de la voie SMAD3 par le récepteur 2 du

TGF β . Ainsi, dans l'optique de compléter cette étude, il serait important d'évaluer le potentiel régulateur des miARN sur l'expression du gène *IL33* dans les BEC.

4.3. Limites de l'étude

4.3.1. Choix des modèles cellulaires

Le choix des modèles cellulaires dans le présent mémoire a été fait en lien avec les fonctions connues des gènes étudiés.

Le choix des échantillons sanguins pour réaliser la première étude, qui visait à déterminer la signature épigénétique d'*IL1R1* et *IL1R2*, s'explique par la disponibilité de ces récepteurs. En effet, les récepteurs de l'IL-1 se retrouvent principalement à la surface des cellules immunitaires circulantes (Sims *et al.* 1989; McMahan *et al.* 1991; Dinarello 1996). Bien que l'efficacité des modèles sanguins dans les études de méthylation soit controversée, de nombreuses publications visent à démontrer que, bien qu'hétérogène, le sang complet permet de bien documenter les signatures de méthylation de nombreux gènes (Stefanowicz *et al.* 2012; Kabesch 2014; Yang et Schwartz 2012; Slieker *et al.* 2013). De plus, des études précédentes avaient d'ailleurs utilisé des échantillons sanguins pour documenter la méthylation de l'ADN en lien avec le processus inflammatoire (Kinnally *et al.* 2011; Smith *et al.* 2011; Uddin *et al.* 2011). Enfin, il s'agit d'un prélèvement facile à obtenir et moins invasif pour les patients comparativement à une biopsie bronchique (Salam *et al.* 2012). Par conséquent, les échantillons sanguins constituaient un bon modèle cellulaire pour réaliser l'étude de méthylation des récepteurs de l'IL-1 afin de déterminer si des modifications épigénétiques dans le promoteur de ces gènes pouvaient expliquer, du moins en partie, l'augmentation de l'expression de ces récepteurs transmembranaires chez les individus asthmatiques allergiques.

Le choix de l'épithélium bronchique pour réaliser le deuxième volet de ce mémoire de recherche, qui consistait à documenter le profil de méthylation du gène *IL33*, repose sur l'activité connue de cette cellule en lien avec cette cytokine. IL-33 est une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les cellules épithéliales dans les poumons (Cayrol et Girard 2014). De plus, ce modèle cellulaire est reconnu comme étant un bon modèle pour étudier la physiopathologie de l'asthme notamment parce que les principales associations génétiques ont été associées à l'activité des BEC (Moffatt *et al.* 2010; Al-Muhsen *et al.* 2011) et elles ont également servi de modèle dans plusieurs

études épigénétiques (Loxham *et al.* 2014; Antognelli *et al.* 2015; Galvis *et al.* 2015; Haj-Salem *et al.* 2015). Ainsi, les cellules épithéliales bronchiques primaires isolées de biopsies bronchiques provenant de personnes asthmatiques et témoins, puis mises en culture, se sont avérées un choix logique pour étudier la méthylation et l'expression d'*IL33* afin de déterminer si l'augmentation de cette cytokine dans l'asthme pouvait s'expliquer, du moins en partie, par ces mécanismes moléculaires.

4.3.2. Intégration de la composante environnementale

Les groupes ont été définis selon les caractéristiques cliniques des patients pour les deux études présentées dans ce mémoire. Toutefois les études en épigénétique reposent sur des modifications induites par l'environnement (Zhou 2012). Les composantes de l'environnement pouvant affecter les marques épigénétiques sont nombreuses (notons par exemples la nutrition, le stress, le tabagisme, la pollution, l'exposition aux allergènes, la composition du microbiome et les infections en bas âge) (Bird 2002). Ainsi, puisque l'environnement des individus intra-groupes n'était contrôlé d'aucune manière, il est possible que certaines variations soient liées à ces variations de conditions environnementales. Il est toutefois important de souligner que le statut tabagique a été considéré dans les modèles d'analyse et que le fait d'avoir réalisé cette étude dans une population à effet fondateur caractérisée par une situation géographique isolée et ayant un mode de vie relativement similaire (religion, alimentation et climat) réduit l'impact des facteurs environnementaux comparativement à une population où les mélanges ethniques sont plus importants. Les niveaux de méthylation peuvent également varier entre des individus d'âge et/ou de sexe différents (Naumova *et al.* 2013). Ces paramètres ont été considérés à titre de covariables dans l'étude utilisant des échantillons sanguins puisque le nombre d'échantillons permettait de les considérer dans le modèle statistique, cependant, vu la difficulté d'obtenir des participants aux études pour obtenir des biopsies bronchiques, ces différences demeurent des limites à l'étude.

Chapitre 5 – Conclusion et perspectives

5.1. Conclusion générale de l'étude

Le présent mémoire a permis de documenter la signature de méthylation de l'ADN d'*IL1R2* dans des échantillons sanguins d'individus asthmatiques. Cette signature épigénétique a été associée à une répression de la transcription du gène possiblement en lien avec une diminution de la fixation des facteurs de transcriptions à leurs sites de liaison. Il a également permis de documenter la signature de méthylation de l'ADN d'*IL33* dans des lignées de cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques issues d'individus asthmatiques. Cette signature épigénétique a été associée à une augmentation de la transcription du gène possiblement en réponse à une augmentation de la fixation des facteurs de transcription à l'ADN. Bien que la cause environnementale responsable de ces modifications épigénétiques n'ait pas été identifiée par ces études, les résultats suggèrent l'importance de considérer *IL1R2* et *IL-33* comme biomarqueurs de l'asthme.

5.2. *Perspectives*

La présente étude a permis de déterminer qu'il existe des différences de méthylation pour certains gènes reconnus pour avoir un rôle dans l'asthme et l'allergie et que ces différences de méthylation pouvaient être responsables de la régulation de la production d'ARNm dans l'épithélium bronchique et dans les leucocytes. Ces marques épigénétiques ont été mises en évidence dans les gènes du récepteur de type 2 de l'interleukine 1 et de l'interleukine 33. Comme indiqué dans la revue de la littérature (chapitre 1), les voies biologiques qui comprennent ce récepteur et cette cytokine engendrent l'activation et la translocation du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB. Dans les cellules activées, ce facteur de transcription permettra la production et le relâchement des cytokines de type T_H1, T_H2 et T_H17.

En suite logique avec les résultats présentés dans ce mémoire, il serait donc intéressant de réaliser l'étude du méthylome et du transcriptome à la fois pour les échantillons issus du sang de même que pour les cellules significatives dans l'asthme isolées du sang, telles les lymphocytes T CD4⁺ et les éosinophiles, que pour les cellules épithéliales bronchiques pour documenter quels sont les gènes différemment méthylés et d'évaluer l'impact de cette méthylation sur l'expression des gènes dans le sang et ces types cellulaires. Idéalement, ces échantillons devraient être obtenus des mêmes personnes dans chacun des groupes de sujets et les groupes devraient être appariés pour l'âge et le sexe. L'étape suivante serait de valider les gènes ayant des différences significatives avec une méthode plus sensible (par exemple PCR à temps réel pour l'expression et pyroséquençage pour la mesure de méthylation). Enfin, puisque les données de l'étude pangénomique (GWAS) et épigénomique (EWAS) sont également disponibles pour cette population, des analyses intégrées des résultats obtenus permettraient certainement de mieux comprendre le rôle, en termes de biologie moléculaire, de ces cellules dans le contexte de l'asthme allergique.

Références

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

Abecasis, G.R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Gibbs, R.A., Hurles, M.E., and McVean, G.A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061-1073.

Aberg, N. (1993). Familial occurrence of atopic disease: genetic versus environmental factors. *Clin Exp Allergy* 23, 829-834.

Acevedo, N., Reinius, L.E., Greco, D., Gref, A., Orsmark-Pietras, C., Persson, H., Pershagen, G., Hedlin, G., Melen, E., Scheynius, A., *et al.* (2015). Risk of childhood asthma is associated with CpG-site polymorphisms, regional DNA methylation and mRNA levels at the GSDMB/ORMDL3 locus. *Hum Mol Genet* 24, 875-890.

Acuner Ozbabacan, S.E., Gursoy, A., Nussinov, R., and Keskin, O. (2014). The structural pathway of interleukin 1 (IL-1) initiated signaling reveals mechanisms of oncogenic mutations and SNPs in inflammation and cancer. *PLoS computational biology* 10, e1003470.

Adjers, K., Pessi, T., Karjalainen, J., Huhtala, H., and Hurme, M. (2004). Epistatic effect of IL1A and IL4RA genes on the risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 113, 445-447.

Ahluwalia, S.K., and Matsui, E.C. (2011). The indoor environment and its effects on childhood asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 11, 137-143.

Ahmed, S., Tamblyn, R., and Winslade, N. (2014). Using decision support for population tracking of adherence to recommended asthma guidelines. *BMJ open* 4, e003759.

Clicours.COM

Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., *et al.* (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* *127*, 701-721 e701-770.

Al-Muhsen, S., Johnson, J.R., and Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* *128*, 451-462; quiz 463-454.

Alkhoury, H., Cha, V., Tong, K., Moir, L.M., Armour, C.L., and Hughes, J.M. (2014). Human Lung Mast Cell Products Regulate Airway Smooth Muscle CXCL10 Levels. *J Allergy (Cairo)* *2014*, 875105.

Amin, K. (2012). The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med* *106*, 9-14.

Antognelli, C., Gambelunghe, A., Muzi, G., and Talesa, V.N. (2015). Peroxynitrite-mediated glyoxalase I epigenetic inhibition drives apoptosis in airway epithelial cells exposed to crystalline silica via a novel mechanism involving argpyrimidine-modified Hsp70, JNK, and NF-kappaB. *Free Radic Biol Med*.

Arima, M., and Fukuda, T. (2011). Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med* *26*, 8-18.

Aschard, H., Bouzigon, E., Corda, E., Ulgen, A., Dizier, M.H., Gormand, F., Lathrop, M., Kauffmann, F., and Demenais, F. (2009). Sex-specific effect of IL9 polymorphisms on lung function and polysensitization. *Genes Immun* *10*, 559-565.

Auron, P.E. (1998). The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews* *9*, 221-237.

Aymeric, J.-L., and Lefranc, G. (2009). *Immunologie humaine* (Bruxelles, De Boeck).

Barlow, J.L., Bellosi, A., Hardman, C.S., Drynan, L.F., Wong, S.H., Cruickshank, J.P., and McKenzie, A.N. (2012). Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 129, 191-198 e191-194.

Barlow, J.L., Peel, S., Fox, J., Panova, V., Hardman, C.S., Camelo, A., Bucks, C., Wu, X., Kane, C.M., Neill, D.R., *et al.* (2013). IL-33 is more potent than IL-25 in provoking IL-13-producing nuocytes (type 2 innate lymphoid cells) and airway contraction. *J Allergy Clin Immunol* 132, 933-941.

Barros, S.P., and Offenbacher, S. (2009). Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res* 88, 400-408.

Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300, 1524-1525.

Bauer, R.N., Manohar, M., Singh, A.M., Jay, D.C., and Nadeau, K.C. (2015). The future of biologics: applications for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 135, 312-323.

Baxi, S.N., and Phipatanakul, W. (2010). The role of allergen exposure and avoidance in asthma. *Adolesc Med State Art Rev* 21, 57-71, viii-ix.

Belpinati, F., Malerba, G., Trabetti, E., Galavotti, R., Xumerle, L., Pescollderungg, L., Boner, A.L., and Pignatti, P.F. (2011). Association of childhood allergic asthma with markers flanking the IL33 gene in Italian families. *J Allergy Clin Immunol* 128, 667-668.

Berni Canani, R., Paparo, L., Nocerino, R., Cosenza, L., Pezzella, V., Di Costanzo, M., Capasso, M., Del Monaco, V., D'Argenio, V., Greco, L., *et al.* (2015). Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin Epigenetics* 7, 38.

Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C., and Snyder, M. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57-74.

Bianchetti, L., Marini, M.A., Isgro, M., Bellini, A., Schmidt, M., and Mattoli, S. (2012). IL-33 promotes the migration and proliferation of circulating fibrocytes from patients with allergen-exacerbated asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 426, 116-121.

Binder, N.K., Beard, S.A., Kaitu'u-Lino, T.J., Tong, S., Hannan, N.J., and Gardner, D.K. (2015). Paternal obesity in a rodent model affects placental gene expression in a sex-specific manner. *Reproduction* 149, 435-444.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.

Bjornson, C.L., and Mitchell, I. (2000). Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *The journal of gender-specific medicine : JGSM : the official journal of the Partnership for Women's Health at Columbia* 3, 57-61.

Blattler, A., and Farnham, P.J. (2013). Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *The Journal of biological chemistry* 288, 34287-34294.

Blaze, J., Scheuing, L., and Roth, T.L. (2013). Differential methylation of genes in the medial prefrontal cortex of developing and adult rats following exposure to maltreatment or nurturing care during infancy. *Developmental neuroscience* 35, 306-316.

Bogaert, P., Naessens, T., De Koker, S., Hennuy, B., Hacha, J., Smet, M., Cataldo, D., Di Valentin, E., Piette, J., Tournoy, K.G., *et al.* (2011). Inflammatory signatures for eosinophilic vs. neutrophilic allergic pulmonary inflammation reveal critical regulatory checkpoints. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L679-690.

Bogdanovic, O., and Veenstra, G.J. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549-565.

Bousquet, J., Mantzouranis, E., Cruz, A.A., Ait-Khaled, N., Baena-Cagnani, C.E., Bleecker, E.R., Brightling, C.E., Burney, P., Bush, A., Busse, W.W., *et al.* (2010). Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 126, 926-938.

Bouzigon, E., Forabosco, P., Koppelman, G.H., Cookson, W.O., Dizier, M.H., Duffy, D.L., Evans, D.M., Ferreira, M.A., Kere, J., Laitinen, T., *et al.* (2010). Meta-analysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy. *Eur J Hum Genet* 18, 700-706.

Brasier, A.R. (2014). *Heterogeneity in Asthma* (New York, Springer).

Bristulf, J., Gatti, S., Malinowsky, D., Bjork, L., Sundgren, A.K., and Bartfai, T. (1994). Interleukin-1 stimulates the expression of type I and type II interleukin-1 receptors in the rat insulinoma cell line Rinn5F; sequencing a rat type II interleukin-1 receptor cDNA. *Eur Cytokine Netw* 5, 319-330.

Bruder, E.D., Lee, J.J., Widmaier, E.P., and Raff, H. (2007). Microarray and real-time PCR analysis of adrenal gland gene expression in the 7-day-old rat: effects of hypoxia from birth. *Physiol Genomics* 29, 193-200.

Bunting, M.M., Shadie, A.M., Flesher, R.P., Nikiforova, V., Garthwaite, L., Tedla, N., Herbert, C., and Kumar, R.K. (2013). Interleukin-33 drives activation of alveolar macrophages and airway inflammation in a mouse model of acute exacerbation of chronic asthma. *Biomed Res Int* 2013, 250938.

Busse, W.W., and Sedgwick, J.B. (1992). Eosinophils in asthma. *Ann Allergy* 68, 286-290.

Calhoun, W.J. (2014). The spectrum of asthma: an introduction. *Adv Exp Med Biol* 795, 1-4.

Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933-2942.

Cayrol, C., and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9021-9026.

Cayrol, C., and Girard, J.P. (2014). IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol* 31, 31-37.

Chakir, J., Dube, J., Laviolette, M., Goulet, F., Germain, L., Auger, F., and Boulet, L.P. (2000). Isolation and characterization of human airway fibroblasts in culture. *Methods Mol Med* 44, 53-65.

Chamberland, A., Madore, A.-M., Tremblay, K., Laviolette, M., and Laprise, C. (2009). A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Experimental Lung Research* 35, 399-410.

Chang, S.Y., Su, P.F., and Lee, T.C. (2009). Ectopic expression of interleukin-1 receptor type II enhances cell migration through activation of the pre-interleukin 1alpha pathway. *Cytokine* 45, 32-38.

Chapel, H., Haeney, M, Misbah, S, Snowden, N (2004). *Immunologie clinique: De la théorie à la pratique, avec cas cliniques, 4^e édition. Bruxelles De Boeck Université, 372 p.*

Chase, K.A., Rosen, C., Rubin, L.H., Feiner, B., Bodapati, A.S., Gin, H., Hu, E., and Sharma, R.P. (2015). Evidence of a sex-dependent restrictive epigenome in schizophrenia. *J Psychiatr Res.*

Chen, C.H., Xirasagar, S., and Lin, H.C. (2006). Seasonality in adult asthma admissions, air pollutant levels, and climate: a population-based study. *J Asthma* 43, 287-292.

Chen, Y., Johansen, H, Thilliaipalam, S, Sambell, C (2005). Asthma. *Health Reports 16, Statistics Canada Catalogue no. 82-003 p. 043.*

Chen, Y., Stewart, P., Johansen, H., McRae, L., and Taylor, G. (2003). Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *Journal of clinical epidemiology* 56, 180-187.

Cheung, P., and Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19, 563-573.

Choi, J., Kim, S.T., and Craft, J. (2012). The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Curr Opin Immunol* 24, 651-657.

Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Padbury, J.F., Bueno, R., *et al.* (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS genetics* 5, e1000602.

Coico, R., and Sunshine, G. (2009). *Immunology*, 6th edn (New Jersey, John Wiley & Son's Inc).

Colotta, F., Dower, S.K., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1994a). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 15, 562-566.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Polentarutti, N., Minty, A., Caput, D., Ferrara, P., and Mantovani, A. (1994b). Interleukin-13 induces expression and release of interleukin-1 decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *J Biol Chem* 269, 12403-12406.

Colotta, F., Saccani, S., Giri, J.G., Dower, S.K., Sims, J.E., Introna, M., and Mantovani, A. (1996). Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 156, 2534-2541.

Dales, R., Liu, L., Wheeler, A.J., and Gilbert, N.L. (2008). Quality of indoor residential air and health. *Cmaj* 179, 147-152.

Daley, D., Lemire, M., Akhabir, L., Chan-Yeung, M., He, J.Q., McDonald, T., Sandford, A., Stefanowicz, D., Tripp, B., Zamar, D., *et al.* (2009). Analyses of associations with asthma in four asthma population samples from Canada and Australia. *Human genetics* 125, 445-459.

Daley, D., Park, J.E., He, J.Q., Yan, J., Akhabir, L., Stefanowicz, D., Becker, A.B., Chan-Yeung, M., Bosse, Y., Kozyrskyj, A.L., *et al.* (2012). Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 1284-1293.

Daniels, S.E., Bhattacharrya, S., James, A., Leaves, N.I., Young, A., Hill, M.R., Faux, J.A., Ryan, G.F., le Souef, P.N., Lathrop, G.M., *et al.* (1996). A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383, 247-250.

Darveaux, J., and Busse, W.W. (2015). Biologics in asthma-the next step toward personalized treatment. *J Allergy Clin Immunol Pract* 3, 152-160.

Davies, D.E. (2009). The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 6, 678-682.

Davoine, F., and Lacy, P. (2014). Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front Immunol* 5, 570.

Deckers, J., Branco Madeira, F., and Hammad, H. (2013). Innate immune cells in asthma. *Trends Immunol* 34, 540-547.

Dema, B., and Charles, N. (2014). Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med* 17, 247-255.

Denham, S., Koppelman, G.H., Blakey, J., Wjst, M., Ferreira, M.A., Hall, I.P., and Sayers, I. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage studies of asthma and related traits. *Respir Res* 9, 38.

Devries, A., and Vercelli, D. (2013). Epigenetics of human asthma and allergy: promises to keep. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 31, 183-189.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

Dinarello, C.A. (2002). The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20, S1-13.

Dinarello, C.A. (2010). Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 140, 935-950.

Dinarello, C.A., Simon, A., and van der Meer, J.W. (2012). Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 11, 633-652.

Dold, S., Wjst, M., von Mutius, E., Reitmeir, P., and Stiepel, E. (1992). Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 67, 1018-1022.

Dominguez-Salas, P., Moore, S.E., Cole, D., da Costa, K.A., Cox, S.E., Dyer, R.A., Fulford, A.J., Innis, S.M., Waterland, R.A., Zeisel, S.H., *et al.* (2013). DNA methylation potential: dietary intake and blood concentrations of one-carbon metabolites and cofactors in rural African women. *The American journal of clinical nutrition* 97, 1217-1227.

Dommisch, H., Winter, J., Gotz, W., Miesen, J., Klein, A., Hierse, L., Deschner, J., Jager, A., Eberhard, J., and Jepsen, S. (2015). Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing. *Clin Oral Investig* 19, 209-220.

Duffy, D.L., Martin, N.G., Battistutta, D., Hopper, J.L., and Mathews, J.D. (1990). Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 142, 1351-1358.

Dunnill, M.S. (1971). The pathology of asthma. Ciba Foundation Study Group 38, 35-46.

Edfors-Lubs, M.L. (1971). Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergol* 26, 249-285.

Farahani, R., Sherkat, R., Hakemi, M.G., Eskandari, N., and Yazdani, R. (2014). Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma. *Adv Biomed Res* 3, 127.

Finotto, S. (2008). T-cell regulation in asthmatic diseases. *Chem Immunol Allergy* 94, 83-92.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., *et al.* (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10604-10609.

Galvis, L.A., Holik, A.Z., Short, K.M., Pasquet, J., Lun, A.T., Blewitt, M.E., Smyth, I.M., Ritchie, M.E., and Asselin-Labat, M.L. (2015). Repression of *Igf1* expression by *Ezh2* prevents basal cell differentiation in the developing lung. *Development* 142, 1458-1469.

Gandhi, V.D., and Vliagoftis, H. (2015). Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Front Immunol* 6, 147.

Ganong, W.F. (2005). *Physiologie médicale*, 2nd edn (Bruxelles, De Boeck université).

Garcia-Sanchez, A., Isidoro-Garcia, M., Garcia-Solaesa, V., Sanz, C., Hernandez-Hernandez, L., Padron-Morales, J., Lorente-Toledano, F., and Davila, I. (2014). Genome-wide association studies (GWAS) and their importance in asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*.

Garlanda, C., Dinarello, C.A., and Mantovani, A. (2013a). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39, 1003-1018.

Garlanda, C., Riva, F., Bonavita, E., and Mantovani, A. (2013b). Negative regulatory receptors of the IL-1 family. *Semin Immunol* 25, 408-415.

Gaurav, R., and Agrawal, D.K. (2013). Clinical view on the importance of dendritic cells in asthma. *Expert Rev Clin Immunol* 9, 899-919.

Gerrard, J.W., Vickers, P., and Gerrard, C.D. (1976). The familial incidence of allergic disease. *Ann Allergy* 36, 10-15.

Gibson, G. (2011). Rare and common variants: twenty arguments. *Nature reviews Genetics* 13, 135-145.

Gold, D.R. (2000). Environmental tobacco smoke, indoor allergens, and childhood asthma. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 4, 643-651.

Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., and Ju, G. (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *The Journal Of Biological Chemistry* 270, 13757-13765.

Grotenboer, N.S., Ketelaar, M.E., Koppelman, G.H., and Nawijn, M.C. (2013). Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol* 131, 856-865.

Gudbjartsson, D.F., Bjornsdottir, U.S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G.M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., *et al.* (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 41, 342-347.

Guo, Z., Wu, J., Zhao, J., Liu, F., Chen, Y., Bi, L., Liu, S., and Dong, L. (2014). IL-33 promotes airway remodeling and is a marker of asthma disease severity. *J Asthma* 51, 863-869.

Gutierrez-Arcelus, M., Ongen, H., Lappalainen, T., Montgomery, S.B., Buil, A., Yurovsky, A., Bryois, J., Padioleau, I., Romano, L., Planchon, A., *et al.* (2015). Tissue-specific effects of genetic and epigenetic variation on gene regulation and splicing. *PLoS Genet* 11, e1004958.

Haahtela, T., Heiskala, M., and Suoniemi, I. (1980). Allergic disorders and immediate skin test reactivity in Finnish adolescents. *Allergy* 35, 433-441.

Haj-Salem, I., Fakhfakh, R., Berube, J.C., Jacques, E., Plante, S., Simard, M.J., Bosse, Y., and Chakir, J. (2015). MicroRNA-19a enhances proliferation of bronchial epithelial cells by targeting TGFbetaR2 gene in severe asthma. *Allergy* 70, 212-219.

Halim, T.Y., and McKenzie, A.N. (2013). New kids on the block: group 2 innate lymphoid cells and type 2 inflammation in the lung. *Chest* 144, 1681-1686.

Hall, S., and Agrawal, D.K. (2014). Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *Int Immunopharmacol* 23, 316-329.

Hallstrand, T.S., and Henderson, W.R., Jr. (2010). An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 10, 60-66.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2006). Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118, 331-336.

Hamzaoui, A., Berraies, A., Kaabachi, W., Haifa, M., Ammar, J., and Kamel, H. (2013). Induced sputum levels of IL-33 and soluble ST2 in young asthmatic children. *J Asthma* 50, 803-809.

Han, W., Kang, S.Y., Kang, D., Park, S.K., Lee, J.Y., Kim, H., Park, A.K., and Noh, D.Y. (2010). Multiplex genotyping of 1107 SNPs from 232 candidate genes identified an association between IL1A polymorphism and breast cancer risk. *Oncology reports* 23, 763-769.

Handoyo, S., and Rosenwasser, L.J. (2009). Asthma phenotypes. *Current Allergy And Asthma Reports* 9, 439-445.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.

Hebert, H.L., Bowes, J., Smith, R.L., Flynn, E., Parslew, R., Alsharqi, A., McHugh, N.J., Barker, J.N., Griffiths, C.E., Barton, A., *et al.* (2015). Identification of loci associated with late-onset psoriasis using dense genotyping of immune-related regions. *Br J Dermatol* 172, 933-939.

Heijink, I.H., Nawijn, M.C., and Hackett, T.L. (2014). Airway epithelial barrier function regulates the pathogenesis of allergic asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*.

Hepworth, M.R., and Sonnenberg, G.F. (2014). Regulation of the adaptive immune system by innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* 27, 75-82.

Heyn, H. (2014). A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front Genet* 5, 113.

Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., and Rothenberg, M.E. (2008). Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38, 709-750.

Holgate, S.T. (2011). Pathophysiology of asthma: what has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 495-505.

Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 18, 673-683.

Hollingsworth, J.W., Maruoka, S., Boon, K., Garantziotis, S., Li, Z., Tomfohr, J., Bailey, N., Potts, E.N., Whitehead, G., Brass, D.M., *et al.* (2008). In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 118, 3462-3469.

Hrdlickova, B., and Holla, L.I. (2011). Relationship between the 17q21 locus and adult asthma in a Czech population. *Hum Immunol* 72, 921-925.

Hsiao, Y.P., Tsai, J.D., Muo, C.H., Tsai, C.H., Sung, F.C., Liao, Y.T., Chang, Y.J., and Yang, J.H. (2014). Atopic diseases and systemic lupus erythematosus: an epidemiological study of the risks and correlations. *Int J Environ Res Public Health* *11*, 8112-8122.

Huang, Q. (2015). Genetic Study of Complex Diseases in the Post-GWAS Era. *J Genet Genomics* *42*, 87-98.

Hunninghake, G.M., Soto-Quiros, M.E., Avila, L., Kim, H.P., Lasky-Su, J., Rafaels, N., Ruczinski, I., Beaty, T.H., Mathias, R.A., Barnes, K.C., *et al.* (2010). TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* *65*, 1566-1575.

Islam, S.A., and Luster, A.D. (2012). T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* *18*, 705-715.

Ismaila, A.S., Sayani, A.P., Marin, M., and Su, Z. (2013). Clinical, economic, and humanistic burden of asthma in Canada: a systematic review. *BMC pulmonary medicine* *13*, 70.

Jeffery, P., Holgate, S., and Wenzel, S. (2003). Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine* *168*, S1-17.

Johansson, S.G., Hourihane, J.O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., *et al.* (2001). A revised nomenclature for allergy. . *Allergy* *56*, 813-824.

Kabesch, M. (2014). Epigenetics in asthma and allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology* *14*, 62-68.

Kaisho, T. (2013). [Innate immunity and allergy]. *Arerugi = [Allergy]* *62*, 789-796.

Karagiannidis, C., Hense, G., Martin, C., Epstein, M., Ruckert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Uhlig, S., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C.B. (2006). Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117, 111-118.

Karjalainen, J., Hulkkonen, J., Pessi, T., Huhtala, H., Nieminen, M.M., Aromaa, A., Klaukka, T., and Hurme, M. (2002). The IL1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. *J Allergy Clin Immunol* 110, 429-434.

Kauffmann, F., and Demenais, F. (2012). Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1229-1240; quiz 1241-1222.

Kierszenbaum, A.L. (2002). *Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology* Mosby, 621 p.

Kim, H.Y., Shin, Y.H., and Han, M.Y. (2014). Determinants of sensitization to allergen in infants and young children. *Korean J Pediatr* 57, 205-210.

Kinnally, E.L., Feinberg, C., Kim, D., Ferguson, K., Leibel, R., Coplan, J.D., and John Mann, J. (2011). DNA methylation as a risk factor in the effects of early life stress. *Brain, behavior, and immunity* 25, 1548-1553.

Kishore, U., Greenhough, T.J., Waters, P., Shrive, A.K., Ghai, R., Kamran, M.F., Bernal, A.L., Reid, K.B., Madan, T., and Chakraborty, T. (2006). Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43, 1293-1315.

Kitamura, K., Takeda, K., Koya, T., Miyahara, N., Kodama, T., Dakhama, A., Takai, T., Hirano, A., Tanimoto, M., Harada, M., *et al.* (2007). Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 178, 480-488.

Kitaya, K., Yasuo, T., Yamaguchi, T., Fushiki, S., and Honjo, H. (2007). Genes regulated by interferon-gamma in human uterine microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 20, 689-697.

Knopik, V.S., Maccani, M.A., Francazio, S., and McGeary, J.E. (2012). The epigenetics of maternal cigarette smoking during pregnancy and effects on child development. *Development and psychopathology* 24, 1377-1390.

Kobayashi, T., Iijima, K., Checkel, J.L., and Kita, H. (2013). IL-1 family cytokines drive Th2 and Th17 cells to innocuous airborne antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 49, 989-998.

Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 20, 791-800.

Kool, M., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2012). Cellular networks controlling Th2 polarization in allergy and immunity. *F1000 Biol Rep* 4, 6.

Koppelman, G.H., Los, H., and Postma, D.S. (1999). Genetic and environment in asthma: the answer of twin studies. *The European respiratory journal* 13, 2-4.

Kroegel, C., Virchow, J.C., Jr., Luttmann, W., Walker, C., and Warner, J.A. (1994). Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). *European Respiratory Journal* 7, 519-543.

Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., *et al.* (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181, 4780-4790.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., *et al.* (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183, 6469-6477.

Kynnyk, J.A., Mastrorarde, J.G., and McCallister, J.W. (2011). Asthma, the sex difference. *Curr Opin Pulm Med* 17, 6-11.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* *134*, 499-507.

Laprise, C. (2014). The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes Immun* *15*, 247-255.

Laprise, C., and Boulet, L.P. (1996). Airway responsiveness and atopy in families of patients with asthma. *Clin Invest Med* *19*, 461-469.

Laprise, C., Sladek, R., Ponton, A., Bernier, M.C., Hudson, T.J., and Laviolette, M. (2004). Functional classes of bronchial mucosa genes that are differentially expressed in asthma. *BMC Genomics* *5*, 21.

Lee, K.W., and Pausova, Z. (2013). Cigarette smoking and DNA methylation. *Frontiers in genetics* *4*, 132.

Lee, S.H., Park, J.S., and Park, C.S. (2011). The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* *3*, 236-244.

Lefrancais, E., Roga, S., Gautier, V., Gonzalez-de-Peredo, A., Monsarrat, B., Girard, J.P., and Cayrol, C. (2012). IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 1673-1678.

Lewis, S., Richards, D., Bynner, J., Butler, N., and Britton, J. (1995). Prospective study of risk factors for early and persistent wheezing in childhood. *Eur Respir J* *8*, 349-356.

Li, X., Ampleford, E.J., Howard, T.D., Moore, W.C., Torgerson, D.G., Li, H., Busse, W.W., Castro, M., Erzurum, S.C., Israel, E., *et al.* (2012). Genome-wide association studies of asthma indicate opposite immunopathogenesis direction from autoimmune diseases. *J Allergy Clin Immunol* *130*, 861-868 e867.

Lin, S.Y., Hsieh, S.C., Lin, Y.C., Lee, C.N., Tsai, M.H., Lai, L.C., Chuang, E.Y., Chen, P.C., Hung, C.C., Chen, L.Y., *et al.* (2012). A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun* *13*, 214-220.

Liu, C., Hart, R.P., Liu, X.J., Clevenger, W., Maki, R.A., and De Souza, E.B. (1996). Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 271, 20965-20972.

Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L., and Huang, T. (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 181-185.

Lloyd, C.M. (2010). IL-33 family members and asthma - bridging innate and adaptive immune responses. *Curr Opin Immunol* 22, 800-806.

Lloyd, C.M., and Saglani, S. (2015). Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* 34C, 52-58.

Locksley, R.M. (2010). Asthma and allergic inflammation. *Cell* 140, 777-783.

Loisel, D.A., Tan, Z., Tisler, C.J., Evans, M.D., Gangnon, R.E., Jackson, D.J., Gern, J.E., Lemanske, R.F., Jr., and Ober, C. (2011). IFNG genotype and sex interact to influence the risk of childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 128, 524-531.

Lokk, K., Modhukur, V., Rajashekar, B., Martens, K., Magi, R., Kolde, R., Koltsina, M., Nilsson, T.K., Vilo, J., Salumets, A., *et al.* (2014). DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol* 15, r54.

Los, H., Postmus, P.E., and Boomsma, D.I. (2001). Asthma genetics and intermediate phenotypes: a review from twin studies. *Twin research : the official journal of the International Society for Twin Studies* 4, 81-93.

Loxham, M., Davies, D.E., and Blume, C. (2014). Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clin Exp Allergy* 44, 1299-1313.

Lozewicz, S., Wells, C., Gomez, E., Ferguson, H., Richman, P., Devalia, J., and Davies, R.J. (1990). Morphological integrity of the bronchial epithelium in mild asthma. *Thorax* 45, 12-15.

Lu, S., Li, H., Gao, R., Gao, X., Xu, F., Wang, Q., Lu, G., Xia, D., and Zhou, J. (2015). IL-17A, But Not IL-17F, Is Indispensable for Airway Vascular Remodeling Induced by Exaggerated Th17 Cell Responses in Prolonged Ovalbumin-Challenged Mice. *J Immunol* 194, 3557-3566.

Lund, S., Walford, H.H., and Doherty, T.A. (2013). Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Disease. *Curr Immunol Rev* 9, 214-221.

Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., *et al.* (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.

Madrigano, J., Baccarelli, A., Mittleman, M.A., Sparrow, D., Vokonas, P.S., Tarantini, L., and Schwartz, J. (2012). Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics* 7, 63-70.

Manica-Cattani, M.F., Bittencourt, L., Rocha, M.I.U., Algarve, T.D., Bodanese, L.C., Rech, R., Machado, M.M., Santos, G.F.F., Gottlieb, M.G.V., Schwanke, C.H.A., *et al.* (2009). Association between interleukin-1 beta polymorphism (+3953) and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314, 84-89.

Martin, M., and Resch, K. (1988). Interleukin 1: more than a mediator between leukocytes. *Trends in Pharmacological Sciences* 9, 171-177.

Martinez, F.D. (2011). New insights into the natural history of asthma: primary prevention on the horizon. *The Journal of allergy and clinical immunology* 128, 939-945.

Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., and Beasley, R. (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469-478.

Mathias, R.A. (2014). Introduction to genetics and genomics in asthma: genetics of asthma. *Adv Exp Med Biol* 795, 125-155.

Mayr, S.I., Zuberi, R.I., Zhang, M., de Sousa-Hitzler, J., Ngo, K., Kuwabara, Y., Yu, L., Fung-Leung, W.P., and Liu, F.T. (2002). IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* *169*, 2061-2068.

McMahan, C.J., Slack, J.L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S.D., Brunton, L.L., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jenkins, N.A., Brannan, C.I., *et al.* (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J* *10*, 2821-2832.

McNamara, P.S., Kicic, A., Sutanto, E.N., Stevens, P.T., and Stick, S.M. (2008). Comparison of techniques for obtaining lower airway epithelial cells from children. *Eur Respir J* *32*, 763-768.

Melen, E., Himes, B.E., Brehm, J.M., Boutaoui, N., Klanderman, B.J., Sylvia, J.S., and Lasky-Su, J. (2010). Analyses of shared genetic factors between asthma and obesity in children. *J Allergy Clin Immunol* *126*, 631-637 e631-638.

Metcalf, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiological Reviews* *77*, 1033-1079.

Meurer, J.R., George, V., Subichin, S., Yauck, J., and Layde, P. (2000). Asthma severity among children hospitalized in 1990 and 1995. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* *154*, 143-149.

Mfuna Endam, L., Cormier, C., Bossé, Y., Filali-Mouhim, A., and Desrosiers, M. (2010). Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: A replication study. *Archives Of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* *136*, 187-192.

Michalik, M., Pierzchalska, M., Legutko, A., Ura, M., Ostaszewska, A., Soja, J., and Sanak, M. (2009). Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* *15*, BR194-201.

Miller, A.M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease. *Journal of Inflammation (London, England)* *8*, 22-32.

Miller, R.L., and Peden, D.B. (2014). Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 134, 1001-1008.

Moffatt, M.F., Gut, I.G., Demenais, F., Strachan, D.P., Bouzigon, E., Heath, S., von Mutius, E., Farrall, M., Lathrop, M., and Cookson, W.O. (2010). A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* 363, 1211-1221.

Moffatt, M.F., Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A.L., Strachan, D., Heath, S., Depner, M., von Berg, A., Bufe, A., Rietschel, E., *et al.* (2007). Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 448, 470-473.

Monteseirin, J. (2009). Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19, 340-354.

Morales, E., Bustamante, M., Vilahur, N., Escaramis, G., Montfort, M., de Cid, R., Garcia-Esteban, R., Torrent, M., Estivill, X., Grimalt, J.O., *et al.* (2012). DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 185, 937-943.

Mukherjee, A.B., and Zhang, Z. (2011). Allergic asthma: influence of genetic and environmental factors. *J Biol Chem* 286, 32883-32889.

Muniz, V.S., Weller, P.F., and Neves, J.S. (2012). Eosinophil crystalloid granules: structure, function, and beyond. *J Leukoc Biol* 92, 281-288.

Murdoch, J.R., and Lloyd, C.M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res* 690, 24-39.

Murk, W., Walsh, K., Hsu, L.I., Zhao, L., Bracken, M.B., and Dewan, A.T. (2011). Attempted replication of 50 reported asthma risk genes identifies a SNP in RAD50 as associated with childhood atopic asthma. *Hum Hered* 71, 97-105.

Clicours.COM

Naumova, A.K., Al Tuwajri, A., Morin, A., Vaillancourt, V.T., Madore, A.M., Berlivet, S., Kohan-Ghadr, H.R., Moussette, S., and Laprise, C. (2013). Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Human genetics* 132, 811-822.

Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.* (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367-1370.

Neumann, D., Beermann, S., and Seifert, R. (2010). Does the histamine H4 receptor have a pro- or anti-inflammatory role in murine bronchial asthma? *Pharmacology* 85, 217-223.

Noutsios, G.T., and Floros, J. (2014). Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med Wkly* 144, w14036.

Ober, C., and Yao, T.C. (2011). The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 242, 10-30.

OMS (2013). Asthme. Aide mémoire #307.

Orlando, S., Matteucci, C., Fadlon, E.J., Buurman, W.A., Bardella, M.T., Colotta, F., Introna, M., and Mantovani, A. (1997). TNF-alpha, unlike other pro- and anti-inflammatory cytokines, induces rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human myelomonocytic cells. *J Immunol* 158, 3861-3868.

Osborn, L., Kunkel, S., and Nabel, G.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2336-2340.

Padron-Morales, J., Sanz, C., Davila, I., Munoz-Bellido, F., Lorente, F., and Isidoro-Garcia, M. (2013). Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 23, 487-494.

Paul, W.E. (2015). History of interleukin-4. *Cytokine*.

Peck, A., and Mellins, E.D. (2009). Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol* 132, 295-304.

Pelaia, G., Vatrella, A., Busceti, M.T., Gallelli, L., Calabrese, C., Terracciano, R., and Maselli, R. (2015). Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma. *Mediators Inflamm* 2015, 879783.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S., *et al.* (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115, 335-343.

Pepe, C., Foley, S., Shannon, J., Lemiere, C., Olivenstein, R., Ernst, P., Ludwig, M.S., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2005). Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116, 544-549.

Perera, F., and Herbstman, J. (2011). Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod Toxicol* 31, 363-373.

Pillai, R.A., and Calhoun, W.J. (2014). Introduction to asthma and phenotyping. *Adv Exp Med Biol* 795, 5-15.

Pociot, F., Molvig, J., Wogensen, L., Worsaae, H., and Nerup, J. (1992). A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest* 22, 396-402.

Pociot, F., Ronningen, K.S., Bergholdt, R., Lorenzen, T., Johannesen, J., Ye, K., Dinarello, C.A., and Nerup, J. (1994). Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 19, 169-178.

Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2010). Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125, 752-754.

Ramasamy, A., Kuokkanen, M., Vedantam, S., Gajdos, Z.K., Couto Alves, A., Lyon, H.N., Ferreira, M.A., Strachan, D.P., Zhao, J.H., Abramson, M.J., *et al.* (2012). Genome-wide association studies of asthma in population-based cohorts confirm known and suggested loci and identify an additional association near HLA. *PLoS One* 7, e44008.

Ray, A., Khare, A., Krishnamoorthy, N., Qi, Z., and Ray, P. (2010). Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol* 3, 216-229.

Razin, A., and Cedar, H. (1977). Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 2725-2728.

Reinius, L.E., Gref, A., Saaf, A., Acevedo, N., Joerink, M., Kupczyk, M., D'Amato, M., Bergstrom, A., Melen, E., Scheynius, A., *et al.* (2013). DNA methylation in the Neuropeptide S Receptor 1 (NPSR1) promoter in relation to asthma and environmental factors. *PLoS One* 8, e53877.

Relton, C.L., and Davey Smith, G. (2012). Two-step epigenetic Mendelian randomization: a strategy for establishing the causal role of epigenetic processes in pathways to disease. *International journal of epidemiology* 41, 161-176.

Renaudineau, Y., and Youinou, P. (2011). Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med* 60, 10-16.

Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 986-1000.

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* 187, 4835-4843.

Riese, R.J., and Chapman, H.A. (2000). Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 12, 107-113.

Roitt, I., Brostoff, J, Male, D (2007). Immunologie, 4^e édition. Paris *De Boeck Université*, 496 p.

Salam, M.T., Zhang, Y., and Begum, K. (2012). Epigenetics and childhood asthma: current evidence and future research directions. *Epigenomics* 4, 415-429.

Sarwal, M.M., Sigdel, T.K., and Salomon, D.R. (2011). Functional proteogenomics--embracing complexity. *Semin Immunol* 23, 235-251.

Schaack, J., Qiao, L., Walkiewicz, M.P., Stonehouse, M., Engel, D.A., Vazquez-Torres, A., Nordeen, S.K., Shao, J., and Moorhead, J.W. (2011). Insertion of CTCF-binding sites into a first-generation adenovirus vector reduces the innate inflammatory response and prolongs transgene expression. *Virology* 412, 136-145.

Schaub, B., Liu, J., Hoppler, S., Schleich, I., Huehn, J., Olek, S., Wiczorek, G., Illi, S., and von Mutius, E. (2009). Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123, 774-782 e775.

Schieck, M., Sharma, V., Michel, S., Toncheva, A.A., Worth, L., Potaczek, D.P., Genuneit, J., Kretschmer, A., Depner, M., Dalphin, J.C., *et al.* (2014). A polymorphism in the TH2 locus control region is associated with changes in DNA methylation and gene expression. *Allergy* 69, 1171-1180.

Schroeder, J.T. (2009). Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol* 101, 123-161.

Schubeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature* 517, 321-326.

Schwartz, M. (1952). Heredity in bronchial asthma; a clinical and genetic study of 191 asthma probands and 50 probands with Baker's asthma. *Acta Allergol Suppl (Copenh)* 2, 1-288.

Sears, M.R. (2015). Smoking, asthma, chronic airflow obstruction and COPD. *Eur Respir J* 45, 586-588.

Sekigawa, T., Tajima, A., Hasegawa, T., Hasegawa, Y., Inoue, H., Sano, Y., Matsune, S., Kurono, Y., and Inoue, I. (2009). Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin-intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* 39, 972-981.

Semitekolou, M., Alissafi, T., Aggelakopoulou, M., Kourepini, E., Kariyawasam, H.H., Kay, A.B., Robinson, D.S., Lloyd, C.M., Panoutsakopoulou, V., and Xanthou, G. (2009). Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. *J Exp Med* 206, 1769-1785.

Seumois, G., Chavez, L., Gerasimova, A., Lienhard, M., Omran, N., Kalinke, L., Vedanayagam, M., Ganesan, A.P., Chawla, A., Djukanovic, R., *et al.* (2014). Epigenomic analysis of primary human T cells reveals enhancers associated with TH2 memory cell differentiation and asthma susceptibility. *Nat Immunol* 15, 777-788.

Shen, T.C., Tu, C.Y., Lin, C.L., Wei, C.C., and Li, Y.F. (2014). Increased risk of asthma in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Respir Crit Care Med* 189, 496-499.

Shenker, N.S., Flower, K.J., Wilhelm-Benartzi, C.S., Dai, W., Bell, E., Gore, E., El Bahrawy, M., Weaver, G., Brown, R., and Flanagan, J.M. (2015). Transcriptional implications of intragenic DNA methylation in the oestrogen receptor alpha gene in breast cancer cells and tissues. *BMC Cancer* 15, 337.

Shimizu, K., Nakajima, A., Sudo, K., Liu, Y., Mizoroki, A., Ikarashi, T., Horai, R., Kakuta, S., Watanabe, T., and Iwakura, Y. (2015). IL-1 Receptor Type 2 Suppresses Collagen-Induced Arthritis by Inhibiting IL-1 Signal on Macrophages. *J Immunol* 194, 3156-3168.

Shimizu, M., Matsuda, A., Yanagisawa, K., Hirota, T., Akahoshi, M., Inomata, N., Ebe, K., Tanaka, K., Sugiura, H., Nakashima, K., *et al.* (2005). Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Hum Mol Genet* 14, 2919-2927.

Sims, J.E., Acres, R.B., Grubin, C.E., McMahan, C.J., Wignall, J.M., March, C.J., and Dower, S.K. (1989). Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8946-8950.

Sims, J.E., Gayle, M.A., Slack, J.L., Alderson, M.R., Bird, T.A., Giri, J.G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., *et al.* (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6155-6159.

Singh, R.K., Gupta, S., Dastidar, S., and Ray, A. (2010). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* 85, 336-349.

Slack, J.L., Schooley, K., Bonnert, T.P., Mitcham, J.L., Qwarnstrom, E.E., Sims, J.E., and Dower, S.K. (2000). Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 275, 4670-4678.

Slieker, R.C., Bos, S.D., Goeman, J.J., Bovee, J.V., Talens, R.P., van der Breggen, R., Suchiman, H.E., Lameijer, E.W., Putter, H., van den Akker, E.B., *et al.* (2013). Identification and systematic annotation of tissue-specific differentially methylated regions using the Illumina 450k array. *Epigenetics & chromatin* 6, 26.

Smith, A.J., Keen, L.J., Billingham, M.J., Perry, M.J., Elson, C.J., Kirwan, J.R., Sims, J.E., Doherty, M., Spector, T.D., and Bidwell, J.L. (2004). Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 5, 451-460.

Smith, A.K., Conneely, K.N., Kilaru, V., Mercer, K.B., Weiss, T.E., Bradley, B., Tang, Y., Gillespie, C.F., Cubells, J.F., and Ressler, K.J. (2011). Differential immune system DNA methylation and cytokine regulation in post-traumatic stress disorder. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 156B, 700-708.

Smith, D.E. (2010). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy* 40, 200-208.

Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20, 1019-1030.

Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9, 310-318.

Song, Y., Liu, C., Hui, Y., Srivastava, K., Zhou, Z., Chen, J., Miller, R.L., Finkelman, F.D., and Li, X.M. (2014). Maternal allergy increases susceptibility to offspring allergy in association with TH2-biased epigenetic alterations in a mouse model of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 134, 1339-1345 e1337.

Stapleton, M., Howard-Thompson, A., George, C., Hoover, R.M., and Self, T.H. (2011). Smoking and asthma. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM* 24, 313-322.

Statistique Canada (2014). Tableau 105-0501 - Profil d'indicateurs de la santé, estimations annuelles, selon le groupe d'âge et le sexe, Canada, provinces, territoires, régions sociosanitaires (limites de 2013) et groupes de régions homologues, occasionnel. CANSIM (base de données).

Stefanowicz, D., Hackett, T.L., Garmaroudi, F.S., Gunther, O.P., Neumann, S., Sutanto, E.N., Ling, K.M., Kobor, M.S., Kicic, A., Stick, S.M., *et al.* (2012). DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One* 7, e44213.

Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125, S73-80.

Stoyanov, E., Ludwig, G., Mizrahi, L., Olam, D., Schnitzer-Perlman, T., Tasika, E., Sass, G., Tiegs, G., Jiang, Y., Nie, T., *et al.* (2015). Chronic liver inflammation modifies DNA methylation at the precancerous stage of murine hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*. 6(13):11047-60.

Subbarao, P., Mandhane, P.J., and Sears, M.R. (2009). Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 181, E181-190.

Subramaniam, S., Stansberg, C., and Cunningham, C. (2004). The interleukin 1 receptor family. *Developmental & Comparative Immunology* 28, 415-428.

Szeffler, S.J. (2015). Advances in pediatric asthma in 2014: Moving toward a population health perspective. *J Allergy Clin Immunol* 135, 644-652.

Tang, W.Y., and Ho, S.M. (2007). Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 8, 173-182.

Tedner, S.G., Ortqvist, A.K., and Almqvist, C. (2012). Fetal growth and risk of childhood asthma and allergic disease. *Clin Exp Allergy* 42, 1430-1447.

Thomsen, S.F., van der Sluis, S., Kyvik, K.O., Skytthe, A., and Backer, V. (2010). Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 40, 1054-1061.

Torgerson, D.G., Ampleford, E.J., Chiu, G.Y., Gauderman, W.J., Gignoux, C.R., Graves, P.E., Himes, B.E., Levin, A.M., Mathias, R.A., Hancock, D.B., *et al.* (2011). Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 43, 887-892.

Travers, J., and Rothenberg, M.E. (2015). Eosinophils in mucosal immune responses. *Mucosal Immunol* 8, 464-475.

Tsicopoulos, A., de Nadai, P., and Glineur, C. (2013). Environmental and genetic contribution in airway epithelial barrier in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13, 495-499.

Turker, M.S. (2002). Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* 21, 5388-5393.

Turner, J., and Jones, C.E. (2009). Regulation of mucin expression in respiratory diseases. *Biochemical Society transactions* 37, 877-881.

Uddin, M., Koenen, K.C., Aiello, A.E., Wildman, D.E., de los Santos, R., and Galea, S. (2011). Epigenetic and inflammatory marker profiles associated with depression in a community-based epidemiologic sample. *Psychological medicine* 41, 997-1007.

Varriale, A. (2014). DNA Methylation, Epigenetics, and Evolution in Vertebrates: Facts and Challenges. *International journal of evolutionary biology* 2014, 475981.

Vasilyev, F., Silkov, A., and Sennikov, S. (2015). Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors. *Cell Mol Immunol* 12, 222-230.

Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 8, 169-182.

Vocca, L., Di Sano, C., Uasuf, C.G., Sala, A., Riccobono, L., Gangemi, S., Albano, G.D., Bonanno, A., Gagliardo, R., and Profita, M. (2015). IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology*.

Vock, C., Hauber, H.P., and Wegmann, M. (2010). The other T helper cells in asthma pathogenesis. *J Allergy (Cairo)* 2010, 519298.

Vroiling, A.B., Jonker, M.J., Luiten, S., Breit, T.M., Fokkens, W.J., and van Drunen, C.M. (2008). Primary nasal epithelium exposed to house dust mite extract shows activated expression in allergic individuals. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 293-299.

Wan, Y.I., Shrine, N.R., Soler Artigas, M., Wain, L.V., Blakey, J.D., Moffatt, M.F., Bush, A., Chung, K.F., Cookson, W.O., Strachan, D.P., *et al.* (2012). Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax* 67, 762-768.

Wang, A., Wang, Z., Cao, Y., Cheng, S., Chen, H., Bunjhoo, H., Xie, J., Wang, C., Xu, Y., and Xiong, W. (2015a). CCL2/CCR2-Dependent Recruitment of Th17 Cells but Not Tc17 Cells to the Lung in a Murine Asthma Model. *Int Arch Allergy Immunol* 166, 52-62.

Wang, I.J., Karmaus, W.J., Chen, S.L., Holloway, J.W., and Ewart, S. (2015b). Effects of phthalate exposure on asthma may be mediated through alterations in DNA methylation. *Clin Epigenetics* 7, 27.

Wang, T., Liang, Z.A., Sandford, A.J., Xiong, X.Y., Yang, Y.Y., Ji, Y.L., and He, J.Q. (2012). Selection of suitable housekeeping genes for real-time quantitative PCR in CD4(+) lymphocytes from asthmatics with or without depression. *PLoS One* 7, e48367.

Wang, Y., Barbacioru, C., Hyland, F., Xiao, W., Hunkapiller, K.L., Blake, J., Chan, F., Gonzalez, C., Zhang, L., and Samaha, R.R. (2006). Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 7, 59.

West, E.E., Kashyap, M., and Leonard, W.J. (2012). TSLP: A Key Regulator of Asthma Pathogenesis. *Drug Discov Today Dis Mech* 9.

Wiktorowicz, J.E., and Jamaluddin, M. (2014). Proteomic analysis of the asthmatic airway. *Adv Exp Med Biol* 795, 221-232.

Wills-Karp, M., and Ewart, S.L. (2004). Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. *Nat Rev Genet* 5, 376-387.

Wjst, M., Sargurupremraj, M., and Arnold, M. (2013). Genome-wide association studies in asthma: what they really told us about pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 13, 112-118.

Wolthers, O.D. (2003). Eosinophil granule proteins in the assessment of airway inflammation in pediatric bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 14, 248-254.

Clicours.COM

Wu, J., Liu, S., Liu, G., Dombkowski, A., Abrams, J., Martin-Trevino, R., Wicha, M.S., Ethier, S.P., and Yang, Z.Q. (2012). Identification and functional analysis of 9p24 amplified genes in human breast cancer. *Oncogene* 31, 333-341.

Xu, L., Sun, Y., Gao, L., Cai, Y.Y., and Shi, S.X. (2014). Prenatal Restraint Stress is Associated with Demethylation of Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) Promoter and Enhances CRH Transcriptional Responses to Stress in Adolescent Rats. *Neurochemical research*.

Yang, B., Wagner, J., Damaschke, N., Yao, T., Wuerzberger-Davis, S.M., Lee, M.H., Svaren, J., Miyamoto, S., and Jarrard, D.F. (2014a). A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation. *PLoS One* 9, e88052.

Yang, I.V., Pedersen, B.S., Liu, A., O'Connor, G.T., Teach, S.J., Kattan, M., Misiak, R.T., Gruchalla, R., Steinbach, S.F., Szeffler, S.J., *et al.* (2015). DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol* 136, 69-80.

Yang, I.V., and Schwartz, D.A. (2012). Epigenetic mechanisms and the development of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 1243-1255.

Yang, S.N., Hsieh, C.C., Kuo, H.F., Lee, M.S., Huang, M.Y., Kuo, C.H., and Hung, C.H. (2014b). The effects of environmental toxins on allergic inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res* 6, 478-484.

Zhang, H., Tong, X., Holloway, J.W., Rezwan, F.I., Lockett, G.A., Patil, V., Ray, M., Everson, T.M., Soto-Ramirez, N., Arshad, S.H., *et al.* (2014). The interplay of DNA methylation over time with Th2 pathway genetic variants on asthma risk and temporal asthma transition. *Clin Epigenetics* 6, 8.

Zhang, S., Smartt, H., Holgate, S.T., and Roche, W.R. (1999). Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79, 395-405.

Zhiguang, X., Wei, C., Steven, R., Wei, D., Wei, Z., Rong, M., Zhanguo, L., and Lianfeng, Z. (2010). Over-expression of IL-33 leads to spontaneous pulmonary inflammation in mIL-33 transgenic mice. *Immunol Lett* *131*, 159-165.

Zhou, F.C. (2012). DNA methylation program during development. *Frontiers in biology* *7*, 485-494.

Ziegler, S.F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* *130*, 845-852.