

Table des matières

Résumé.....	iii
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements.....	ix
Avant-propos.....	x
1- Introduction.....	1
1.1. Asthme	1
1.1.1. Description et symptômes	1
1.1.2. Inflammation	2
1.1.3. Remodelage des voies respiratoires	11
1.1.4. Hyperactivité bronchique	13
1.1.5. Phénotypes	13
1.1.6. Thérapies actuelles	14
1.2. Trait complexe	15
1.2.1. Facteurs génétiques	16
1.2.2. Épigénétique.....	26
1.2.3. Méthylation de l'ADN	27
1.2.4. Facteurs environnementaux.....	31
1.4. Hypothèses et objectifs.....	33
2- Chapitre 1 : Methylation profiles of <i>IL33</i> and <i>CCL26</i> in bronchial epithelial cells are associated with asthma	35
2.1. Avant-propos.....	35
2.2. Résumé.....	39
2.3. Abstract	40
2.4. Introduction	40
2.5. Results	42
Patient's characteristics	42
Epigenotyped loci and surrounding genomic regions	42
Epivariations in <i>IL33</i> and <i>CCL26</i> are associated with asthma and related phenotypes	43
Gene expression levels of <i>CCL26</i> is associated with eosinophil count.....	43

Asthma-associated SNPs are associated with <i>IL33</i> DNA-me levels.....	44
2.6. Discussion	44
2.7. Patients and methods.....	48
BEC samples	48
DNA methylation quantification in BECs.....	48
Expression study	49
Genetic analyses.....	49
Identification of potential binding motifs.....	50
Statistical analyses.....	50
2.8. References	62
3 - Chapitre 2 - Discussion générale	66
3.1. Modèles expérimentaux	66
3.2. Types d'approche expérimentale	67
3.3. Association épigénétique entre l'interleukine-33 et l'éotaxine-3 et l'asthme.....	69
3.4. Associations génétiques et épigénétiques du gène <i>Interleukine 33</i>	72
3.5. Limites et avantages de l'étude.....	73
3.6. Perspectives.....	77
4 - Conclusion	79
Références	80

Liste des figures

Figure 1. Structures d'une bronche saine (haut) et d'une bronche d'asthmatique en crise (bas).	2
Figure 2. Étapes principales caractérisant la cascade inflammatoire.	11
Figure 3. Position chromosomique du gène <i>Interleukine-33</i>	20
Figure 4. Position chromosomique du gène <i>Interleukine-1-receptor-like-1</i>	21
Figure 5. Mécanismes d'action de l'interleukine-33.	22
Figure 6. Effets de l'interleukine-33 sur les principales cellules immunitaires.	24
Figure 7. Position chromosomique du gène <i>éotaxine-3</i>	25
Figure 8. Régulation de l'expression génique.....	29
Figure 9. Gènes associés au phénotype d'asthme par trois types d'approche dans la cohorte familiale du Saguenay–Lac-Saint-Jean	30

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 : *Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*
CCL5 : *Chemokine (C-C motif) ligand 5*
CCL11 : Éotaxine-1
CCL26 : Éotaxine-3
CCR3 : *C-C motif chemokine receptor 3*
CMHII : Complexe majeur d'histocompatibilité II
CpG : Site cytosine-phosphate-guanine dinucléotide
FCεRI : Récepteur de forte affinité pour l'immunoglobuline de type E
GATA3 : *Globin transcription factor 3*
GM-CSF : *colony stimulating factor 2 receptor beta common subunit*
GWAS : Étude d'association pangénomique ou *Genome wide association study*
IgE : Immunoglobuline E
IL : Interleukine
IL1RAcP : Protéine accessoire du récepteur d'IL1
IL1RL1 : *Interleukine 1 receptor-like-1*
IL-1 : Interleukine 1
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-9 : Interleukine 9
IL-10 : Interleukine 10
IL-12 : Interleukine 12
IL-13 : Interleukine 13
IL-16 : Interleukine 16
IL-17 : Interleukine 17
IL-18 : Interleukine 18
IL-22 : Interleukine 22
IL-25 : Interleukine 25
IL33 : Interleukine 33
ILC : Cellule lymphoïde innée
IκB : *NFKB inhibitor alpha*

INF- γ : Interféron gamma
IRAK : *Interleukin 1 receptor associated kinase*
ITAM : *Signal transducing adaptor molecule*
IUCPQ : Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec
JAK : Janus kinase
LPS : Lipopolysaccharide
MAP : *Mitogen-activated protein*
MCP-1 : *Chemokine (C-C motif) ligand 2*
miARN : Micro acide ribonucléique
MIP-1 α : *Chemokine (C-C motif) ligand 3*
MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NF κ B : *Nuclear factor-kappa B*
NK : lymphocyte *Natural killer*
ORMDL3 : *ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3*
PAF : *PCNA clamp associated factor*
PCR : *Polymerase chain reaction*
RANTES : *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*
ROS : *Reactive oxygen species*
SNARE : *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*
SNP : Polymorphisme d'un seul nucléotide
sST2 : Suppresseur de tumorigénicité 2 soluble
ST2 : Suppresseur de tumorigénicité 2
ST2L : Suppresseur de tumorigénicité 2 ligand
STAT6 : *Signal transducer and activator of transcription 6*
SYK : *Spleen associated tyrosine kinase*
TGF : *Transforming growth factor*
T_H : Lymphocyte T auxiliaire
TLR : *Toll-like receptor*
TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*
TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*
TSLP : *Thymic stromal lymphopoietin*
VCAM1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement ma directrice de maîtrise Dre Catherine Laprise pour son soutien, son encadrement et sa confiance en moi. Elle est un modèle de réussite pour moi et je suis privilégiée d'avoir pu faire partie de son équipe pendant mon baccalauréat et ma maîtrise.

Merci à toutes les personnes qui ont participé à l'étude. D'abord, aux collaborateurs de l'Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, la Dre Jamila Chakir pour l'isolation et la culture des cellules épithéliales et le Dr Michel Laviolette qui a effectué les biopsies bronchiques.

Merci à Anne-Marie Madore, professionnelle de recherche de l'équipe de la Dre Catherine Laprise, pour ses conseils précieux et son aide tout au long de ce projet, particulièrement en ce qui concerne le soutien relatif aux analyses statistiques.

Merci à toutes les personnes de l'équipe pour leur soutien et leur amitié qui ont permis de créer une atmosphère de travail extrêmement agréable. Ces personnes sont non seulement des collègues de travail, mais aussi des amies.

Merci à mes amis et ma famille qui ont toujours cru en moi et qui m'ont encouragé tout au long de mes études. Un merci tout particulier à mon conjoint qui a toujours été là pour m'appuyer, me soutenir, m'inciter à dépasser mes limites, me conseiller et cheminer à mes côtés. Finalement, un merci tout spécial à ma belle Jade adorée. Elle est et sera pour toujours ma plus grande motivation, ma plus grande fierté et ma plus grande source de bonheur.

Avant-propos

Le présent mémoire est divisé en 2 chapitres. Avant ces chapitres, l'introduction fait état des connaissances actuelles à propos de l'asthme. Plus précisément, elle débute par une description de la maladie et de ses symptômes puis par des explications sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de réactions asthmatiques allergiques. Par la suite, la notion de trait complexe est abordée par l'introduction de la génétique et de l'épigénétique. Finalement, les thérapies actuellement utilisées sont effleurées et les objectifs et les hypothèses du projet sont exposés.

Le premier chapitre est composé de l'article issu du projet de recherche. Cet article est actuellement sous révision dans la revue *Epigenetics*, soumission faite le 12 février. La mesure de la méthylation de l'ADN et de l'expression génique des gènes interleukine-33 (*IL33*), interleukine-1 receptor-like-1 (*IL1RL1*) et éotaxine-3 (*CCL26*) a été réalisée dans un échantillon de cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques prélevées chez des patients asthmatiques et des individus sans asthme ni allergie servant de contrôles. Le séquençage de l'ADN a aussi été effectué pour les gènes *IL33* et *CCL26*. Les résultats de la recherche permettent de démontrer une différence épigénétique et transcriptomique des gènes *IL33* et *CCL26* ainsi qu'une association entre le niveau de méthylation du promoteur d'*IL33* et certains polymorphismes situés dans la même région.

Le chapitre 2 présente une discussion plus élaborée en lien avec le projet de recherche. Il s'agit d'un travail de réflexion plus poussé que la discussion présente dans l'article ainsi que l'exposition des limites et des perspectives du projet.

Finalement, la conclusion est un résumé du projet de recherche exposant les aboutissements tirés de celui-ci.

1- Introduction

1.1. Asthme

1.1.1. Description et symptômes

L'asthme est une maladie respiratoire chronique prévalente et présentant une hétérogénéité symptomatologique importante¹. Actuellement, environ 300 millions de personnes en souffrent dans le monde et cette maladie causerait approximativement 250 000 décès par an². Il y a quelques années, la prévalence était beaucoup plus forte dans les pays industrialisés que dans les pays à faible ou moyen revenu, mais cet écart tend à diminuer. De ce fait, la prévalence augmente dans les pays plus pauvres et celle des pays plus riches semble se stabiliser. Par contre, le taux de mortalité serait plus élevé dans les pays en voie de développement puisque l'accès à une médication adéquate ainsi qu'à des centres médicaux spécialisés sont réduits¹. Au Canada, près de 2,5 millions de personnes étaient atteintes d'asthme en 2014 avec une légère prédominance de femmes³. Le sexe est un des éléments pouvant affecter le développement de l'asthme. En effet, jusqu'à 13-14 ans, les garçons sont plus à risque de présenter la maladie que les filles. Par contre, à l'âge adulte, le phénomène inverse est observé. Les femmes ont plus de chance de développer de l'asthme, leurs hospitalisations sont plus fréquentes et plus longues et la sévérité de la maladie est pire que chez les hommes. La puberté pourrait être une piste d'explication, mais les études n'ont rien démontré de valide à cet effet jusqu'à présent^{4,5}.

Les symptômes liés à l'asthme varient selon les individus et selon la sévérité de la maladie¹. Les symptômes les plus communs sont un souffle court, de la toux, une oppression thoracique et une respiration sifflante^{6,7}. Les symptômes de l'asthme sont expliqués principalement par trois mécanismes clés soit l'inflammation, le remodelage des voies respiratoires et des tissus et l'hyperactivité bronchique⁸. La figure 1 montre la différence de structure entre une bronche d'une personne saine et une bronche d'une personne asthmatique en crise. Chez l'individu asthmatique, on peut observer une inflammation de la muqueuse bronchique, une bronchoconstriction (remodelage des voies respiratoires) ainsi qu'une surproduction de mucus dans le tractus respiratoire. Tous ces

symptômes entravent le passage du flux d'air dans les poumons, ce qui cause l'obstruction bronchique et le sentiment d'oppression⁶.

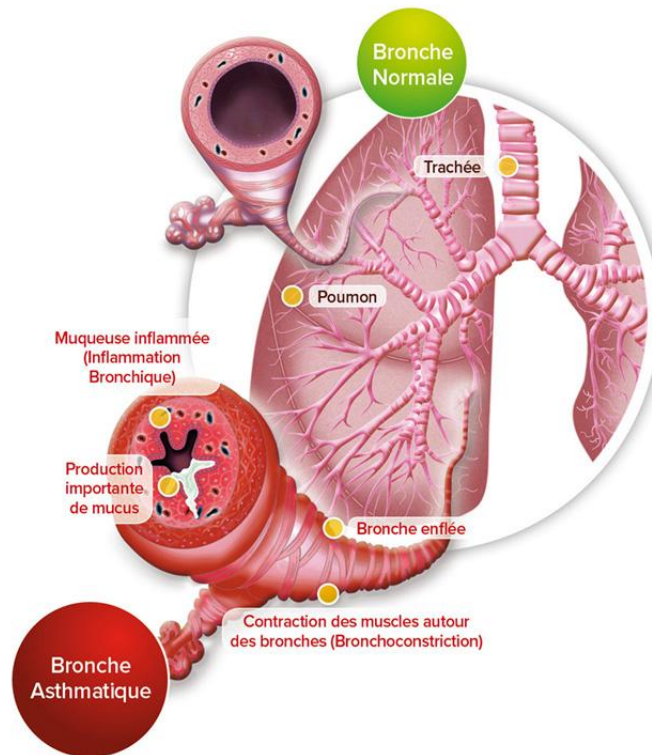


Figure 1. Structures d'une bronche saine (haut) et d'une bronche d'asthmatique en crise (bas). Il est possible d'observer une diminution de la lumière bronchique induite par l'inflammation, le remodelage des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique chez les patients atteints d'asthme. De plus, une sécrétion plus abondante de mucus dans les voies respiratoires entrave le passage de l'air. Figure tirée de <http://asthmaalic.fr/>.

1.1.2. Inflammation

La composante inflammatoire de l'asthme débute par une agression provenant d'un élément extrinsèque⁹. Dans la plupart des cas, le facteur déclenchant est un allergène, une substance pouvant provoquer des symptômes allergiques¹⁰. En effet, l'asthme allergique représente la forme la plus commune d'asthme pour plus de 80% des enfants et 50% des adultes souffrant de cette maladie⁶. Comme les individus étudiés dans ce mémoire sont issus d'une cohorte d'asthmatiques allergiques, ce facteur sera utilisé comme facteur déclenchant la cascade inflammatoire.

L'allergie est une hypersensibilité de type I (hypersensibilité immédiate) qui est caractérisée par une libération de médiateurs chimiques par les mastocytes¹¹. La cascade inflammatoire de la réponse allergique débute par l'inhalation d'un allergène dans les voies respiratoires. Les allergènes sont composés de plusieurs protéines dont certaines enzymes protéolytiques telles que Der p 1 qui peuvent couper l'occludine¹², une protéine transmembranaire permettant la cohésion des jonctions serrées de l'épithélium¹³. Suite à la pénétration des allergènes dans l'organisme, ceux-ci se lient à des récepteurs *Toll-like* (TLR)¹⁴ puis sont captés par des cellules présentatrices d'antigènes, principalement les cellules dendritiques, qui les amènent jusqu'aux ganglions lymphatiques¹². C'est à ces organes que les allergènes vont pouvoir induire une cascade d'événements entraînant l'inflammation caractéristique des maladies allergiques¹⁴.

Phase de sensibilisation

Les gens souffrant de maladies allergiques ont une réponse exagérée des bronches à l'exposition à certaines particules environnementales. En effet, leur organisme exprime une réponse immunologique perturbée en réagissant à de très faibles concentrations d'allergènes⁹. La réaction allergique doit débiter par une phase de sensibilisation, c'est-à-dire un premier contact avec l'allergène, ce qui activera les mastocytes en cas de rencontre ultérieure avec celui-ci¹¹. Lors de ce premier contact, la présentation de l'allergène par les cellules dendritiques favoriserait une différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie T_H2¹². Suite à cette différenciation, les cellules T_H2 produisent des cytokines telles que l'interleukine (IL)-4 et l'IL13 et des chimiokines amplifiant la réponse T_H2 et entraînant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes^{11,12}. Ces cellules, responsables de la formation des anticorps, produisent des immunoglobulines (Ig) E, anticorps caractéristiques aux réactions allergiques¹⁵. Ces IgE sont produites dans les ganglions lymphatiques ou directement au site de la réaction allergique où des centres germinatifs peuvent se former. Deux signaux principaux entraînent la commutation isotypique des Ig vers le sous-type IgE. Tout d'abord, l'IL-4 et l'IL-13 produits par les cellules T_H2 activent les tyrosines kinases JAK1 et JAK3 qui phosphorylent STAT6, un régulateur de transcription des lymphocytes T et B. Pour le deuxième signal, les deux types de lymphocytes sont nécessaires. Les lymphocytes T expriment à leur surface le ligand CD40. Lorsque celui-ci se lie à son récepteur présents sur les cellules B, il y a production d'IgE par ces dernières¹².

Activation des mastocytes et des basophiles

La phase de sensibilisation se termine lorsque les IgE se fixent à leurs récepteurs FcεRI présents à la surface des mastocytes et des basophiles. Les précurseurs des mastocytes se retrouvent dans la circulation sanguine puis migrent vers les tissus périphériques où ils se différencient en mastocytes¹⁶. Ces cellules matures ne sont donc pas présentes dans la circulation sanguine, mais plutôt dans les tissus¹⁷. Elles se situent principalement dans les tissus conjonctifs sous-épithéliaux, près des vaisseaux sanguins et des extrémités nerveuses^{11,16}. La différenciation des basophiles se fait dans la moelle osseuse pour ensuite rejoindre la circulation sanguine et s'accumuler éventuellement au site de la réaction allergique¹⁶. L'activation des mastocytes et des basophiles est complétée lorsque les IgE sont liées aux récepteurs FcεRI. Lorsque ces cellules sont activées, elles expriment à leur surface le ligand CD40 et qui permet de lier les lymphocytes B afin de les stimuler à produire davantage d'IgE, amplifiant ainsi la commutation isotypique des anticorps¹².

La réaction allergique survient lors du deuxième contact avec l'allergène. Deux phases distinctes caractérisent la réaction allergique et sont médiées par les granules des mastocytes et des basophiles ; la phase immédiate et la phase tardive¹⁶.

Phase immédiate

La phase immédiate, se produit dès la première heure d'exposition à l'allergène. Elle est caractérisée par une diminution des débits expiratoires et l'apparition de symptômes de l'asthme tels qu'une dyspnée, une sensation d'oppression, une respiration sifflante, un souffle court et de la toux⁹. Ces symptômes cliniques sont dus à une cascade de signalisation cellulaire en réponse à l'allergène inhalé. Tout d'abord, cet allergène se lie aux IgE fixées aux récepteurs FcεRI des mastocytes et des basophiles provoquant leur agrégation¹¹. Trois conséquences découlent de cette agrégation. Premièrement, une dégranulation survient par un processus d'exocytose permettant la libération de différents médiateurs préformés¹⁶. Pour ce faire, la tyrosine kinase Lyn phosphoryle les motifs ITAM qui recrutent et activent la tyrosine kinase SYK. Cette dernière catalyse la dégradation du phosphatidylinositol entraînant une augmentation du calcium Ca²⁺ dans le cytoplasme. Cet ion phosphoryle la chaîne légère de myosine dissociant le complexe actine-myosine et

favorisant le contact entre les granules et la membrane plasmique¹⁶. Des protéines SNARE sont aussi présentes sur les granules et sur la membrane cellulaire, ce qui favorise la fusion de celles-ci, permet l'exocytose et la libération des médiateurs¹⁵. Les autres conséquences de l'agrégation des récepteurs FcεRI sont la synthèse et la sécrétion de médiateurs lipidiques et de cytokines.

Types de médiateurs

Deux types de médiateurs sont libérés par les mastocytes et les basophiles; les médiateurs primaires et les médiateurs secondaires.

Les médiateurs primaires sont formés avant la dégranulation et mis en réserve dans les granules de ces deux types cellulaires. Leurs effets sont donc immédiats suite à l'agrégation des récepteurs FcεRI provoquée par la liaison des IgE décrite plus haut¹¹. L'**histamine** est une amine représentant environ 10% du granule¹⁵. Son action est très rapide, mais elle est aussi rapidement dégradée par l'histamine N-méthyltransférase ou par l'histaminase sécrétée par les éosinophiles et a donc un effet de courte durée^{16,18,19}. L'histamine peut se lier à son récepteur principal, le récepteur H1, exprimé sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins et sur les muscles lisses bronchiques.^{15,16} Elle provoque la bronchoconstriction, la dilatation des vaisseaux sanguins et augmente la perméabilité vasculaire et la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes^{11,15}. Les **protéases**, dont la tryptase, sont les constituants principaux des granules et provoquent des lésions tissulaires. Ils augmentent la réactivité des muscles lisses, entraînent la formation d'un œdème avec passage de protéines plasmatiques dans le tissu et augmente le recrutement des éosinophiles et la prolifération des fibroblastes^{11,16}. Les **protéoglycanes** ne sont présents que chez les basophiles et stabilisent l'histamine et les autres enzymes du granule. Ils aident aussi à contrôler la vitesse de libération des différents médiateurs du granule¹⁶. Les autres médiateurs primaires libérés par les granules des mastocytes et des basophiles sont les facteurs chimiotactiques des éosinophiles et des neutrophiles ainsi que l'héparine, une molécule anticoagulante^{15,20}.

Les médiateurs secondaires sont synthétisés suite à la dégranulation et à la dégradation de la membrane plasmique des mastocytes, donc leur effet n'est pas immédiat, mais dure plus longtemps^{15,21}. Les **leucotriènes**, des eicosanoïdes se fixant aux mastocytes,

lymphocytes B, éosinophiles et macrophages²², influencent la bronchoconstriction car elles ont un effet prolongé sur les muscles lisses bronchiques. Elles augmentent aussi la perméabilité des capillaires sanguins et sont impliquées dans le recrutement des éosinophiles et la production de mucus^{11,15,16}. Les **prostaglandines** sont des métabolites de l'acide arachidonique et ont des effets vasodilatateurs et bronchoconstricteurs^{11,15,16}. Leurs récepteurs sont présents sur les lymphocytes, les éosinophiles et les basophiles. L'activation de ce complexe ligand-récepteur permet le recrutement de ces cellules inflammatoires par chimiotactisme²³. Le **facteur d'activation plaquettaire** (PAF) est un facteur produit et libéré par plusieurs types cellulaires dont les basophiles, neutrophiles, éosinophiles, fibroblastes, plaquettes et cellules endothéliales. Chez les personnes souffrantes d'allergies, le PAF est impliqué dans la bronchoconstriction, la sécrétion de mucus et l'inflammation bronchique²⁴. Finalement, diverses **cytokines** sont considérées comme des médiateurs secondaires relâchés par les mastocytes et les basophiles. Ces substances solubles libérées par les cellules du système immunitaire permettent la communication intercellulaire en réponse à divers stimuli dont les allergènes²⁵. Elles sont impliquées dans l'activation ou l'inhibition des fonctions de certaines cellules et elles régulent les différenciations, la configuration et la migration au site de blessure ainsi que le processus de réparation²⁶. Les principales cytokines libérées par les mastocytes et les basophiles sont IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 et *Tumor necrosis factor- α* (TNF α). Ces différentes cytokines jouent un rôle important dans le recrutement et l'accumulation de cellules pro-inflammatoires, stimulent la réponse T_H2 et augmentent la production d'IgE¹⁵.

En résumé, la phase immédiate est caractérisée par différents symptômes cliniques tels qu'une vasodilatation, une bronchoconstriction et une sécrétion de mucus. Avec la dégranulation des mastocytes et des basophiles, plusieurs médiateurs sont libérés causant une infiltration cellulaire importante caractéristique de la phase tardive de la réaction¹⁶.

Phase tardive

Les médiateurs produits lors de la phase immédiate, spécialement les cytokines, sont à l'origine de la phase tardive de la réaction. Celle-ci est caractérisée par un important infiltrat cellulaire causant une inflammation locale^{11,16}. Les principales cellules impliquées

dans cette phase de la réaction sont les lymphocytes T, les éosinophiles, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques^{11,15,16}.

Les **lymphocytes T** auxiliaires (T_H) prennent naissance dans le thymus sous forme naïve. Suite aux contacts avec différentes cytokines, ces cellules peuvent se différencier en sous-types, dont les sous-types T_{H1} et T_{H2} ^{9,12}. Ces deux voies fonctionnent en équilibre dans l'organisme et une production excessive d'un de ces sous-types entraîne le développement de pathologies immunitaires distinctes. Par exemple, une production excessive de T_{H1} est associée au développement de maladies auto-immunes alors qu'une production de T_{H2} à la hausse est caractéristique d'une réaction allergique pouvant entraîner de l'asthme, comme cela a déjà été souligné ci-dessus²⁷.

Dans l'asthme allergique, les lymphocytes T_{H2} ont un rôle important lors de la phase tardive. En effet, ces cellules libèrent plusieurs cytokines dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13, qui ont toutes été associées à l'asthme dans plusieurs études^{14,28-30}. Par exemple, l'IL-4, en se fixant à ses récepteurs cellulaires lors de réactions allergiques, permet d'activer les facteurs de transcription STAT6 et GATA3 induisant la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie T_{H2} ^{31,32}. Ces cytokines amplifient donc la réponse allergique en augmentant la différenciation des lymphocytes T naïfs vers la voie T_{H2} , mais aussi en augmentant la production d'IgE par les lymphocytes B activés, en promouvant l'infiltration, la maturation et la dégranulation des mastocytes et en permettant le recrutement et l'activation des éosinophiles^{11,14}.

Les **éosinophiles** sont un autre type cellulaire ayant un rôle primordial dans la réponse allergique et le développement de l'asthme. Ces cellules prennent naissance et se différencient dans la moelle osseuse. Ils sont présents en petite quantité en circulation sanguine et dans la muqueuse respiratoire, mais la majorité de ceux-ci se retrouvent dans les tissus conjonctifs sous les épithéliums respiratoires, intestinaux et uro-génitaux^{12,16}. Les éosinophiles sont recrutés au site de la réaction allergique par le facteur chimiotactique des éosinophiles libéré par les mastocytes suite à leur dégranulation¹⁵. L'IL-5 relâché par les lymphocytes T_{H2} joue aussi un rôle dans la production et de la libération des éosinophiles^{12,16}. Tout comme les lymphocytes, les éosinophiles expriment la molécule d'adhérence VLA-4 dont le récepteur VCAM1 est exprimé sur les cellules endothéliales en

réponse à l'IL-4 et l'IL-13 ce qui permet leur ancrage aux cellules et facilitent leur passage dans la sous-muqueuse bronchique^{9,16}. Les éosinophiles ont deux fonctions principales. Tout d'abord, grâce à leurs récepteurs aux IgE, un complexe ligand-récepteur se forme lors de la réaction allergique et entraîne leur dégranulation^{12,15}. Ces granules libèrent de nombreux médiateurs de l'inflammation tels que des leucotriènes, des protéines basiques majeures, des protéines cationiques, des facteurs d'activation des plaquettes et des peroxydases^{15,33}. Les protéines basiques majeures et les protéines cationiques ont la capacité de détruire les pathogènes en faisant des pores dans leur membrane, entraînant une lyse osmotique³³. Les peroxydases jouent un rôle dans la destruction des bactéries³⁴. La libération des granules permet donc la défense de l'organisme, mais peut causer des dommages tissulaires importants lors de la réaction allergique^{12,15,34}. La deuxième fonction exercée par les éosinophiles est la synthèse et la libération de cytokines et de chimiokines qui amplifient la réponse inflammatoire en activant et recrutant d'autres éosinophiles et leucocytes¹². Parmi ces médiateurs se retrouvent l'IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, le *transforming growth factor* (TGF) α/β , le CCL5/RANTES, l'éotaxine-1 (CCL11), le facteur d'activation des plaquettes (PAF) et des leucotriènes³⁴. Outre ces deux fonctions principales, les éosinophiles peuvent aussi présenter les allergènes aux cellules T_H2 et favoriser l'apoptose des cellules T_H1. Les éosinophiles ont donc un rôle très important au niveau de l'entretien et de la modulation de la réponse inflammatoire⁹.

Autres cellules

Les **macrophages** alvéolaires sont des monocytes présents dans la lumière bronchique et sont impliqués dans le processus inflammatoire⁹. Ces cellules peuvent se différencier en deux sous-types, soit M1 et M2³⁵. Le sous-type M1, surtout associé à l'asthme non-allergique, confère une protection contre les pathogènes grâce à son activité antimicrobienne^{35,36}. Le sous-type M2 se divise à nouveau en trois groupes (M2a, M2b et M2c) en fonction des inducteurs et des cytokines sécrétées. Dans le cas de l'asthme allergique, les macrophages activés font partie du sous-groupe M2a et sécrètent entre autres les cytokines pro-inflammatoires IL-4 et IL-13, amplifiant la réponse allergique et augmentant la production de mucus. Leur activation et leur prolifération se déroulent surtout pendant la phase immédiate de la réaction allergique³⁶.

Les **cellules dendritiques** sont aussi des monocytes et sont les principales cellules présentatrices d'antigènes³⁵. Elles se retrouvent dans les cellules épithéliales bronchiques et jouent un rôle dans l'activation et le recrutement de leucocytes. Chez les individus allergiques, la réponse T_H2 est prédominante suite à la présentation d'antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité des cellules dendritiques³⁷. Ces cellules sont aussi capables d'activer les lymphocytes T *Natural Killer* (NK)³⁵.

Le rôle des **cellules NK** dans la pathogénèse de l'asthme a été mis en lumière récemment et est toujours controversé³⁷. Ces cellules sont formées dans la moelle osseuse puis migrent vers la circulation sanguine et les tissus, majoritairement vers les poumons. Étant donné leur importante contribution à la défense contre des agents viraux, les cellules NK pourraient avoir un rôle dans le développement de l'asthme puisque les rhinovirus sont une cause importante d'exacerbation des symptômes³⁸. De plus, ce type de lymphocytes aurait une influence dans la réponse allergique. En effet, ils peuvent relâcher plusieurs cytokines et chimiokines comme IL-5, IL-8, IL-10, IL-22, IFN- γ , TNF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α et RANTES³⁸. Les cellules NK n'influencent pas directement la réponse T_H2 de l'asthme allergique lorsqu'elle est installée, mais elles produiraient de l'IL-5 agissant au niveau du recrutement des éosinophiles. Tout comme les lymphocytes T, les cellules NK peuvent se différencier en sous-types. Le sous-type NK2 libère des cytokines pro-inflammatoires dont IL-4, IL-5 et IL-13³⁸. Aktas et collaborateurs ont démontré que les cellules NK d'individus allergiques produisaient une plus grande quantité de ces cytokines que celles d'individus non-allergiques, ce qui démontre leur implication potentielle dans le déséquilibre des cytokines T_H1/T_H2³⁹.

Les **cellules lymphoïdes innées** (ILC) sont classifiées en trois sous-types en fonction du profil de cytokines relâchées³⁵. Le sous-type 2 (ILC2) a surtout été décrit dans des modèles murins et serait impliqué dans la réponse allergique^{35,37}. Les ILC2 ressemblent beaucoup aux lymphocytes T_H2 car elles produisent aussi les cytokines pro-inflammatoires IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 suite à leur activation par les cytokines épithéliales IL-25 et IL-33. Elles auraient donc un rôle dans la pathogénèse de l'asthme, mais son importance n'est pas encore bien connue³⁷.

Épithélium bronchique

L'épithélium bronchique est la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes et les substances exogènes inhalées. Il s'agit d'un épithélium pseudo-stratifié composé principalement de cellules cylindriques ciliées reliées par des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence⁴⁰. L'épithélium bronchique était autrefois considéré uniquement comme barrière physique, mais différentes évidences ont permis de mettre en lumière son rôle de barrière chimique et de barrière immunologique. En effet, le mucus des voies respiratoires est riche en mucines et permet la protection contre les pathogènes et les agents nocifs⁴⁰.

De plus, les cellules épithéliales bronchiques expriment différents récepteurs dont les récepteurs TLR qui reconnaissent différents ligands spécifiques tels que les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries⁴¹. Le complexe récepteur-ligand induit une cascade de signalisation impliquant *Myeloid differentiation primary response 88* ainsi que l'*Interleukin-1 receptor associated kinase 1* (Myd88/IRAK) d'où en résulte l'activation de MAP kinases et la translocation nucléaire de NFκB⁴⁰. Cette cascade entraîne la libération de plusieurs cytokines, éotaxines, chimiokines et molécules d'adhésion. Les trois cytokines principales de la réponse allergique sont le *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), IL-25 et IL-33⁴¹.

Le TSLP peut déclencher une réponse inflammatoire de type T_H2 et son niveau est augmenté chez les individus souffrant d'asthme sévère⁴². Les cellules épithéliales bronchiques exposées à différents stimuli tels que les allergènes produisent un niveau plus important de TSLP. L'IL-25 est sécrété par les cellules épithéliales, mais aussi par les lymphocytes T_H2 et les mastocytes. Son action a un impact sur le remodelage et l'inflammation des voies respiratoires⁴¹. L'IL-33 est une alarmine pléiotropique. Elle induit la production d'IL-5 par les lymphocytes T, active les macrophages, mène à la bronchoconstriction, l'hyperplasie des cellules caliciformes et l'inflammation allergique^{37,40,41,43}.

La figure 2 résume la cascade inflammatoire caractéristique des maladies allergiques telles que l'asthme allergique. Cette inflammation entraîne différents symptômes subséquents dont le remodelage des voies respiratoires.

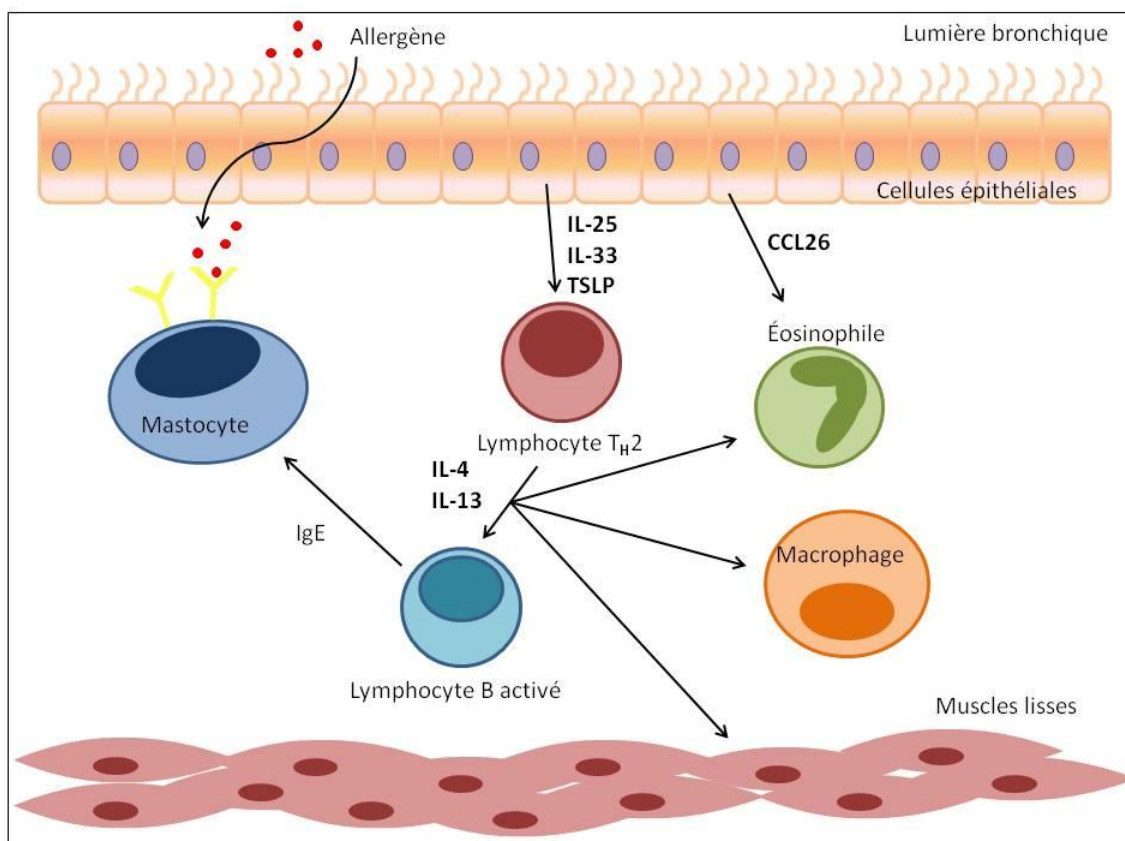


Figure 2. Étapes principales caractérisant la cascade inflammatoire. En détruisant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, l'allergène peut pénétrer dans le tissu et entrer en contact avec les cellules immunitaires. Lors du premier contact, l'allergène active les lymphocytes B qui produisent des IgE se liant aux mastocytes. Lors des contacts subséquents, l'allergène se lie directement aux IgE sur les mastocytes entraînant leur dégranulation. Les cellules épithéliales peuvent quant à elles sécréter diverses cytokines entraînant la sécrétion d'IL-4 et IL-13 par les lymphocytes T. Les cellules épithéliales peuvent aussi sécréter de l'éotaxine-3 (CCL26) entraînant le recrutement des éosinophiles. Image modifiée et traduite de Ingram et Kraft, 2012⁴⁴.

1.1.3. Remodelage des voies respiratoires

Le remodelage des voies respiratoires implique plusieurs tissus différents et est fondamental dans la pathogénèse de l'asthme⁴⁰. La première caractéristique du remodelage à être observée est une augmentation de la masse musculaire lisse. Cette augmentation serait due à une hyperplasie et une hypertrophie des cellules musculaires. L'origine de l'hyperplasie est encore imprécise, mais plusieurs types cellulaires pourraient en être la cause tels que les cellules mésenchymateuses, les cellules épithéliales et les fibrocytes, des

cellules sanguines ayant la capacité de pénétrer les tissus et de se transformer en cellules mésoenchymateuses contractiles⁴⁵.

La matrice extracellulaire subit aussi des transformations au cours du remodelage. Cette matrice est composée de protéoglycanes, collagène, fibres élastiques, fibronectine, laminine et tenascine sécrétées principalement par les cellules mésoenchymateuses. Ces macromolécules assurent le support structural et biologique des tissus respiratoires⁴⁵. La matrice extracellulaire des voies respiratoires des individus atteints d'asthme a une composition excessive de laminine, fibronectine, tenascine, protéoglycanes et collagène I, III et V et réduite en collagène IV et fibres élastiques. L'augmentation de l'épaisseur de la matrice est associée aux cellules inflammatoires T_H2 et ses médiateurs, spécialement le *transforming growth factor β* (TGF-β)⁴⁵. Cette cytokine est sécrétée par les cellules épithéliales en réponse à des facteurs environnementaux ou intrinsèques et est présente en grande quantité dans la circulation sanguine des patients asthmatiques^{40,46}.

Les cytokines T_H2 telles que l'IL-9 et l'IL-13 peuvent induire la métaplasie des cellules caliciformes du tissu épithélial. De plus, les cellules épithéliales ont des récepteurs CCR3 et peuvent produire deux de ses ligands (CCL5 et CCL11). Le complexe ligand-récepteur recrute plus de lymphocytes T_H2 et d'éosinophiles dans les poumons ce qui amplifie la réponse inflammatoire¹². Chez les patients asthmatiques, l'intégrité de l'épithélium bronchique est inversement corrélé avec le nombre d'éosinophiles et de lymphocytes T CD4+, deux types cellulaires clés dans la réponse allergique⁴⁷.

Finalement, le remodelage entraîne aussi des conséquences sur les vaisseaux sanguins. Il y a formation de nouveaux vaisseaux, augmentation du flux sanguin et augmentation de la perméabilité des vaisseaux. Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sécrété par les lymphocytes T_H2, les éosinophiles, les macrophages et les cellules musculaires induit la formation de nouveaux vaisseaux à partir de ceux existant. L'augmentation du flux sanguin est causée par l'augmentation du nombre de vaisseaux, mais aussi par une vasodilatation permettant un plus grand volume de sang. La plus grande perméabilité des vaisseaux sanguins est due à l'action de médiateurs, soit l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et le VEGF⁴⁵.

Toutes ces particularités du remodelage aboutissent à la formation d'œdème, au rétrécissement des voies respiratoires et à l'augmentation de sécrétion de mucus qui sont caractéristiques de l'asthme et mènent à ses symptômes. Le remodelage des voies aériennes peut, par la suite, mener à l'hyperactivité bronchique, le troisième mécanisme clé de la pathogénèse de l'asthme¹².

1.1.4. Hyperactivité bronchique

L'hyperactivité bronchique est le troisième élément caractéristique de l'asthme, mais le mécanisme sous-jacent n'est pas encore bien défini. Par contre, il est proposé que son origine découlerait de l'inflammation et du remodelage des voies bronchiques⁴⁸. Cette hyperactivité est causée par une réponse exagérée des muscles lisses bronchiques résultant en un bronchospasme, une diminution de la lumière bronchique, un sentiment d'oppression, une respiration sifflante et une toux^{49,50}. Les cytokines IL-13, IL-17 et TNF- α , présentes en grande quantité dans les voies respiratoires de patients asthmatiques, permettraient de réguler l'hyperactivité bronchique en augmentant la sensibilité au calcium des cellules musculaires bronchiques. Cette sensibilité accrue augmenterait la contraction par un mécanisme de phosphorylation de la myosine⁴⁹. Une des méthodes les plus couramment utilisées pour évaluer l'hyperactivité bronchique est le test de provocation à la méthacholine⁴⁸. La méthacholine agit sur les récepteurs des cellules musculaires lisses pour augmenter la contraction⁵⁰. Une exposition à une dose exponentielle de cette molécule permet le diagnostic de l'asthme⁵¹.

1.1.5. Phénotypes

L'asthme peut être classé selon différentes méthodes. Une de ces méthodes consiste à diviser les phénotypes selon l'endotype, c'est-à-dire selon le type cellulaire principalement activé dans une voie biologique particulière⁵². Les deux grandes formes de cette classification sont l'asthme éosinophilique, caractérisé par une réponse allergique telle que décrite ci-dessus, et l'asthme neutrophilique, qui est souvent associé à un type d'asthme sévère résistant à la majorité des traitements actuels^{7,53}. Une autre méthode de classification consiste à séparer les types d'asthme selon les facteurs déclenchant la réponse inflammatoire. De ce fait, il est possible d'observer des phénotypes d'asthme allergique et non-allergique, d'asthme à l'effort, d'asthme professionnel, etc⁶. Tel que rapporté plus haut,

l'asthme allergique représente plus de 50% des cas d'asthme chez l'adulte et 80% environ chez les enfants, ce qui en fait le type d'asthme le plus commun⁶. Il est souvent développé pendant l'enfance, mais peut persister tout au long de la vie⁷. Toutes les particules aéroportées peuvent constituer des allergènes déclenchant une réponse immune chez les asthmatiques allergiques. Parmi les allergènes les plus fréquents se retrouvent le pollen, les squames d'animaux, les champignons, les moisissures et les acariens^{7,54,55}. L'asthme allergique peut ensuite se sous-diviser en fonction du taux d'IgE sériques (faible ou élevé) puisque celui-ci est corrélé avec la sévérité de la maladie particulièrement dans le sous-type asthme allergique⁴⁴.

1.1.6. Thérapies actuelles

Comme la cascade allergique comprend plusieurs étapes, divers points peuvent constituer des cibles de thérapies éventuelles. Parmi les traitements actuels permettant de soulager les symptômes allergiques se retrouvent les antihistaminiques comme le cétirizine, le loratadine et le desloratadine. Ceux-ci sont des antagonistes des récepteurs H1 de l'histamine²⁵. Ils inhibent l'action de l'histamine au niveau des vaisseaux sanguins et des muscles lisses¹¹.

Pour ce qui est du traitement de l'asthme, l'utilisation d'un bronchodilatateur devrait constituer la première étape⁴⁸. Les bronchodilatateurs comme le salbutamol et le sulfate de terbutaline relâchent les muscles lisses des bronches en augmentant les taux d'AMPC et préviennent la dégranulation des mastocytes. Une autre avenue possible pour le traitement de l'asthme allergique est le blocage des IgE. On envoie un anticorps anti-IgE dans l'organisme qui se lie à leurs récepteurs, empêchant ceux-ci de se lier aux mastocytes²⁵. L'inhibition de la libération des médiateurs peut aussi être un traitement efficace. En effet, cette voie permet aux mastocytes de rester dans un état physiologique normal et les rend résistants à la dégranulation²⁵. Ensuite, il existe des médicaments inhalés qui sont des corticostéroïdes et qui empêchent la transcription de gènes inflammatoires, spécialement ceux qui codent pour des cytokines²⁵. Ces médicaments comme le propionate de fluticasone, le ciclesonide et le budésonide ont comme but principal de réduire l'inflammation des bronches en inhibant l'activation et la prolifération des lymphocytes de la voie T_H2 ¹¹. À plus long terme, les antagonistes des leucotriènes réduisent la bronchoconstriction en relâchant les muscles lisses des bronches, réduisent l'inflammation

et diminuent la production de mucus¹¹. En cas de choc anaphylactique, des injections d'adrénaline entraînent une contraction des muscles lisses vasculaires afin d'augmenter le débit cardiaque, le relâchement des muscles lisses bronchiques et bloquent la dégranulation des mastocytes¹¹. Le tableau 1 résume les principaux types de médicaments, la molécule active ainsi que le nom commercial du produit. Finalement, des vaccins de désensibilisation peuvent être administrés afin de diminuer la réponse T_H2 des lymphocytes. Ces petites doses répétées d'allergène entraînent une certaine tolérance des lymphocytes T spécifiques à l'allergène¹¹.

Tableau 1. Principaux traitements de l'asthme allergique

Classes de traitement	Molécule active	Nom commercial
Antihistaminiques	Cétirizine	Reactine®
	Loratadine	Claritin®
	Desloratadine	Aerius®
Bronchodilatateurs	Salbutamol	Ventolin®
	Sulfate de terbutaline	Bricanyl®
Corticostéroïdes inhalés	Propionate de fluticasone	Flovent®
	Ciclésonide	Alvesco®
	Budésonide	Pulmicort®
Antagoniste des leucotriènes	Montelukast	Singulair®
Injections d'adrénaline	Adrénaline	EpiPen®, Twinject®

1.2. Trait complexe

L'asthme est un trait complexe défini comme étant la résultante d'une composante génétique, d'une composante environnementale et des interactions entre celles-ci. La présence d'une composante génétique a été clairement mise en évidence depuis plusieurs années, mais l'histoire familiale d'asthme n'est pas suffisante ni nécessaire au développement de la maladie⁴. Cette affection démontre une grande hétérogénéité des symptômes et variabilité inter-individuelle en ce qui a trait à sévérité^{56,57}.

1.2.1. Facteurs génétiques

Comme plusieurs maladies, la transmission de l'asthme ne suit pas le modèle Mendélien classique et plusieurs gènes/loci sont impliqués⁵⁷. À ce jour, plus de 300 gènes ont été associés à l'asthme et validés dans des études indépendantes⁵⁸. Pour ce faire, plusieurs techniques différentes ont permis l'avancement des connaissances. Tout d'abord, les premières études familiales ont été réalisées par Cooke en 1916 et en 1924. Il a ainsi démontré que l'asthme était plus fréquent chez les gens dont une personne apparentée en était atteinte comparativement aux gens n'ayant aucune histoire familiale d'asthme¹. L'agrégation familiale d'asthme est observée lorsque le risque de développer la maladie est plus fréquent dans une famille dont un membre est atteint que dans la population en général⁵⁹. Pour effectuer ce genre d'études, il est important d'avoir accès à des données basées sur un individu-cas et sa famille puis de faire la caractérisation fine de leurs données phénotypiques, cliniques et généalogiques afin de pouvoir faire des comparaisons avec la population générale⁵⁹. Les analyses familiales peuvent aussi être réalisées avec des paires de jumeaux homozygotes comparativement à des jumeaux dizygotes. Comme ces individus partagent le même ADN, il est plus facile de détecter certains effets génétiques comme la dominance et l'épistasie, ainsi que l'impact environnemental sur l'expression des gènes¹. Par ailleurs, différentes études plus récentes ont permis de démontrer des associations entre l'asthme et différents traits tels que le remodelage des voies respiratoires ou le rhume des foins plus fréquemment chez des jumeaux homozygotes, renforçant l'idée d'une implication génétique importante dans l'asthme⁶⁰⁻⁶². La contribution héréditaire à la variance observée dans l'asthme est actuellement évaluée à environ 60%⁶.

La liaison génétique est l'une des premières méthodes qui a été utilisées pour identifier des loci qui pourraient abriter un ou des gènes impliqués dans la physiopathologie des maladies complexes. Dans ce type d'études, aucune hypothèse de départ n'est posée en lien avec le processus physiopathologique. L'hypothèse suppose plutôt que si le trait étudié possède une composante génétique, des gènes et variations génétiques sont nécessairement impliqués dans la transmission familiale. Cette méthode statistique repose sur l'analyse de la co-transmission des génotypes et phénotypes au sein d'individus de mêmes familles (affectés et non-affectés), afin d'identifier les loci liés à la maladie. Les études de liaison génétiques permettent donc de trouver de nouveaux gènes et de nouvelles voies biologiques

(mécanismes) impliqués dans le développement de la maladie. Dans le cas de l'asthme, plusieurs régions et plusieurs gènes ont pu être mis en lumière par des études de liaison. Par exemple, Moffatt et ses collaborateurs ont trouvé des liens entre les IgE sériques et le chromosome 11q alors que le *Collaborative Study on the Genetics of Asthma* a lié les niveaux circulants des cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF et leucotriène C4 synthase avec l'asthme et les allergies. Depuis la publication de la première étude de ce genre en lien avec l'asthme en 1996, plus de 20 loci ont été associés et répliqués¹.

Les études d'association permettent de voir la corrélation entre le génotype et le phénotype d'individus. Le design de ces études est souvent selon le modèle cas-témoin et basé sur le concept de déséquilibre de liaison¹. Le principe de déséquilibre de liaison repose sur la transmission de deux ou plusieurs loci à une fréquence plus élevée que le produit de leur fréquence allélique⁶³. Les gènes s'y trouvant sont donc transmis en association dû à leur proximité physique, rendant la recombinaison moins fréquente. Parmi les études d'association se retrouve l'approche par gène-candidat. Fondé sur les connaissances antérieures, ce type d'études exploite les gènes qui ont déjà été associés à la maladie, qui sont en déséquilibre de liaison avec une région associée (dû à leur transmission simultanée plus fréquente) ou qui ont une fonction biologique en lien avec la pathologie du trait à l'étude¹. Dans le cas de l'asthme et de l'allergie, plus de 100 loci ayant une influence sur la pathologie ont été mis en évidence par cette méthode et plus de 25 gènes ont été identifiés et répliqués dans 6 à 10 autres études indépendantes^{1,59}. Parmi ces gènes se retrouvent l'*IL3*, *IL4*, *IL10*, *TNFA*, *ILAR* et *CD14*⁵⁹. Les gènes qui ont été associés à l'asthme par l'approche des gènes-candidats se retrouvent tous dans une des quatre catégories suivantes : (1) les gènes associés à l'immunité innée et l'immunorégulation; (2) les gènes associés à la différenciation des lymphocytes T_H2 et leurs fonctions effectrices; (3) les gènes exprimés par les cellules épithéliales et impliqués dans l'immunité; et (4) les gènes impliqués dans la fonction pulmonaire, le remodelage des voies respiratoires et la sévérité de l'asthme⁶⁴. Comme une hypothèse est posée au début de l'étude, le seuil de significativité est moins sévère que dans les études où tout le génome est analysé puisqu'il est calculé en fonction du nombre de tests statistiques effectués. Par contre, il n'est pas possible de trouver de nouvelles régions impliquées dans la maladie puisque les analyses sont très ciblées¹.

La première étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) dans l'asthme a été publiée en 2007. Cette technique utilise des puces qui permettent l'analyse de centaines de milliers de variations génétiques d'une seule base (SNP) qui couvrent l'ensemble du génome afin de valider leur statut de facteur de risque de la maladie. Ce type d'études permet donc de trouver de nouveaux gènes-candidats pouvant être impliqués dans la physiopathologie d'une affection. Par contre, il peut être nécessaire de bien définir les populations étudiées afin de regrouper les phénotypes pouvant partager des causes génétiques pour caractériser les mécanismes impliqués. Un échantillon de grande taille, idéalement plusieurs milliers d'individus, est aussi nécessaire pour observer des résultats statistiquement significatifs. Il est important de noter que les résultats obtenus par les GWAS ne donnent pas nécessairement d'informations sur le SNP causal d'une maladie puisque ces analyses sont faites à l'aide de puces contenant plusieurs centaines de milliers de tagSNP. Ces tagSNP sont répartis dans tout le génome et servent de marqueurs puisqu'il représente plusieurs SNP d'une région précise qui sont en déséquilibre de liaison. Il est donc nécessaire de faire des analyses plus détaillées de la région identifiée par le tagSNP afin d'identifier le variant génétique responsable du phénotype anormal⁶⁴. Un des exemples démontrant la pertinence des GWAS est le locus 17q21 incluant les gènes *ORMDL3*, *GSMDB* et *ZPBP2*. Avant les GWAS, ce locus n'avait jamais été considéré comme un gène-candidat, mais une étude d'association a démontré un lien entre un SNP contenu dans ce gène et le niveau de transcrits dans l'asthme chez les enfants⁶⁴. Suite à la venue des GWAS, plusieurs projets d'envergure ont permis de documenter les variants du génome humain et de faire des bases de données publiques permettant une meilleure exploitation des résultats issus des GWAS. Par exemple, le projet HapMap a cartographié le parton haplotypique du génome humain permettant la découverte de millions de SNP et la comparaison de GWAS en fonction d'une maladie⁶⁵.

Les technologies suivantes ont permis de faire le séquençage complet du génome humain, qui a été publié en février 2001⁶⁶. Depuis la première méthode de séquençage Sanger par électrophorèse à l'aide de capillaires, plusieurs compagnies ont mis sur le marché des procédés de séquençage de plus en plus rapides et abordables, appelés séquençage de nouvelle génération ou séquençage à haut débit. Ce type de séquençage permet de faire l'analyse de plusieurs séquences en même temps, ce qui diminue

grandement le temps et le prix de la manipulation. Grâce au séquençage du génome entier, des bibliothèques ont été créées et sont accessibles permettant l'analyse et la comparaison de variants génétiques avec des séquences de référence⁶⁷.

Toutes ces différentes techniques permettent donc de mettre en évidence des régions ou des SNP pouvant avoir un impact sur le trait étudié que ce soit par exemple un effet déclencheur, régulateur ou protecteur d'une maladie. Dans le cas de l'asthme, des centaines de gènes ont démontré une association avec le phénotype observé alors il est important de continuer et d'affiner les recherches afin d'expliquer la part génétique de la maladie. En plus de faire l'étude des déterminants génétiques, comprendre le rôle de ces variants génétiques dans la maladie est l'étape logique subséquente aux études génétiques. Pour documenter le rôle ou l'impact de variants génétiques, plusieurs approches méthodologiques sont possibles. L'une de ces approches est de cibler un type cellulaire distinctif documenté pour sa pertinence dans la physiopathologie de la maladie étudiée. C'est dans ce contexte que le présent travail s'inscrit, il cible l'épithélium bronchique puisque la majorité des gènes associés à l'asthme allergique ont un lien avec cette cellule (l'éosinophile et le lymphocyte T étant les deux autres types cellulaires qui expriment aussi une large part des protéines codées par les gènes associés à l'asthme) et se concentre sur trois gènes associés dans l'échantillon considéré (canadien francophone); l'interleukine-33 (*IL33*), son récepteur *IL1RL1* et l'éotaxine-3 (*CCL26*).

Voie biologique de l'interleukine-33 et son récepteur

Plusieurs études ont démontré que le niveau d'expression génique de **l'interleukine-33** (*IL33*) était augmenté chez les patients asthmatiques en comparaison avec les individus témoins, particulièrement dans les cellules épithéliales bronchiques⁶⁸⁻⁷⁰. Le niveau d'expression de l'*IL33* a tout d'abord été associé au niveau d'éosinophiles dans le sang dans une population islandaise⁷¹. Suite à cette étude, la communauté scientifique a commencé à s'intéresser à son rôle potentiel dans l'asthme. De grandes études cas-témoins et des GWAS ont alors été réalisées chez des individus asthmatiques et des individus témoins afin de vérifier si des SNP du gène *IL33* pourraient être associés à l'asthme et ainsi confirmer le rôle de ce gène dans la maladie. Huit d'entre eux ont démontré une association avec le phénotype asthmatique, illustrant l'importance biologique de ce gène et la pertinence de son

étude². En 2010, Moffatt et ses collaborateurs ont réalisé une méta-analyse comprenant plus de 25 000 individus de 23 études indépendantes afin de valider l'association de différents SNP à l'asthme et au niveau d'IgE sériques. Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'association entre le gène et la maladie, renforçant l'idée qu'*IL33* pourrait être lié à la physiopathologie de l'asthme⁶. De plus, une méta-analyse de différents GWAS comprenant 2,83 millions de SNP a identifié 9 loci ayant une incidence sur l'asthme. Parmi ces loci se retrouvent les gènes *IL33* et *IL1RL1*. Cette analyse a été réalisée dans les cellules immunitaires, mais comme les cellules épithéliales bronchiques expriment aussi ces gènes, les auteurs concluent que l'étude de l'épigénétique de ces gènes devraient être davantage investiguée⁷². Toutes ces études indépendantes permettent de conclure que le gène *IL33* est très important dans l'asthme et que celui-ci pourrait potentiellement devenir une cible thérapeutique.

Le gène codant pour l'IL-33 fait partie de la superfamille de l'*IL1*, est localisé sur le chromosome 9p24.1 et possède 11 exons⁷³ (figure 3). Les SNP présents dans ce gène ont été associés à l'asthme allergique⁷⁴. La cytokine codée par le gène *IL33* se retrouve dans le noyau des cellules, principalement des cellules épithéliales et endothéliales, grâce à un signal de localisation nucléaire sur l'extrémité N-terminale. Les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et quelques leucocytes activés tels que les mastocytes et les cellules dendritiques peuvent aussi exprimer l'*IL33* en faibles quantités⁷⁵. En conditions normales, elle peut se lier aux histones par un motif hélice-tour-hélice et réguler la structure de la chromatine et, par conséquent, l'expression des gènes^{75,76}. L'expression du gène *IL33* est élevée dans plusieurs organes, notamment dans l'estomac, les poumons, le cerveau et la peau.

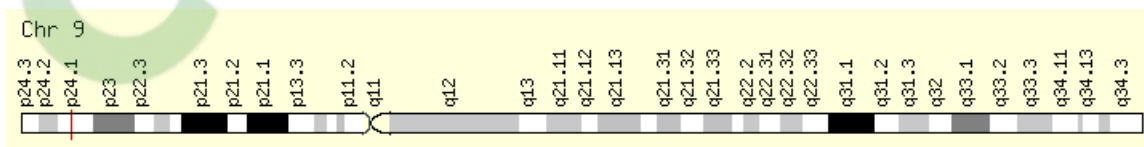


Figure 3. Position chromosomique du gène *Interleukine-33*. Le gène est situé sur le bras court du chromosome 9 en position 24.1 et est lu sur le brin positif de l'ADN. Figure tirée de <http://www.genecards.org/>⁷⁷.

Le récepteur de l'*IL33*, le suppresseur de tumorigénicité 2 (ST2), est codé par le gène **IL1-receptor-like-1** (*IL1RL1*) et est présent sur les mastocytes, basophiles, éosinophiles, les cellules NK et sous forme soluble dans la circulation sanguine^{75,78}. Le gène est situé en position 2q12.1¹ (figure 4) et comprend deux promoteurs, un distal et un proximal, codant tous deux pour les formes solubles (sST2) et transmembranaires (ST2L) en fonction du type cellulaire par épissage alternatif. Les deux types de récepteur comprennent trois domaines extracellulaires Ig, mais la forme soluble ne possède pas la séquence transmembranaire. Le récepteur transmembranaire lié à l'*IL-33* mène à une cascade de signalisation impliquée dans la réaction allergique alors que la forme soluble agit à titre de récepteur-leurre en bloquant la voie biologique de l'*IL-33*^{75,76}. De hauts niveaux d'expression des deux isoformes ont été observés dans les reins, les poumons, le placenta et l'estomac, et la forme transmembranaire est surtout exprimée à la surface des fibroblastes, des lymphocytes T_H2, des cellules lymphoïdes de type 2 et des mastocytes⁷⁵.

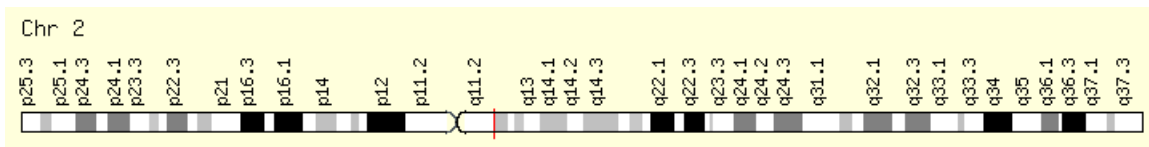


Figure 4. Position chromosomique du gène *Interleukine-1-receptor-like-1*. Le gène est situé sur le bras long du chromosome 2 en position 12.1 et est lu sur le brin positif de l'ADN⁷⁷. Deux isoformes peuvent être observées, soit la forme transmembranaire (ST2L) permettant la cascade de réaction menant à l'inflammation, soit la forme soluble (sST2) agissant comme récepteur-leurre pour l'*IL-33*^{75,76}. Figure tirée de <http://www.genecards.org/>

L'*IL-33* peut agir de différentes manières. Tout d'abord, en conditions basales, elle agit comme facteur de liaison nucléaire puisqu'elle se fixe directement sur la chromatine pour réguler l'expression génique en inhibant la transcription⁷⁹. Dans un contexte d'asthme allergique, *IL-33* est libéré par les cellules épithéliales en réponse à un dommage cellulaire par un allergène et agit comme une alarmine, une cytokine indiquant une menace pour l'organisme aux cellules environnantes⁷⁴. Lorsque l'*IL-33* est relâché dans l'environnement extracellulaire, il se lie à son récepteur ST2L entraînant un changement de conformation de ce dernier ce qui permet le recrutement de l'*IL1 Accessory Protein* (IL1RAcP) nécessaire à

la transmission du signal⁷⁵. La formation du complexe IL33-ST2-IL1RAcP conduit à l'augmentation de l'inflammation chronique et au remodelage des voies respiratoires⁷⁰. En effet, lorsque ce complexe est formé, on observe le recrutement de MyD88 au niveau du domaine cytoplasmique *Toll-interleukin-1 receptor* de ST2. Le signal est alors transmis par l'activation de IRAK-1, IRAK-4 et TRAF6 qui vont scinder le message en deux composantes. Tout d'abord, ces molécules peuvent activer des MAP kinases qui vont stimuler le facteur de transcription AP-1. Le deuxième signal est donné par la phosphorylation de IκB qui active le facteur de transcription NFκB. Ces deux facteurs de transcription permettront la transcription de médiateurs inflammatoires tels que des cytokines et des chimiokines (figure 5)⁷⁶.

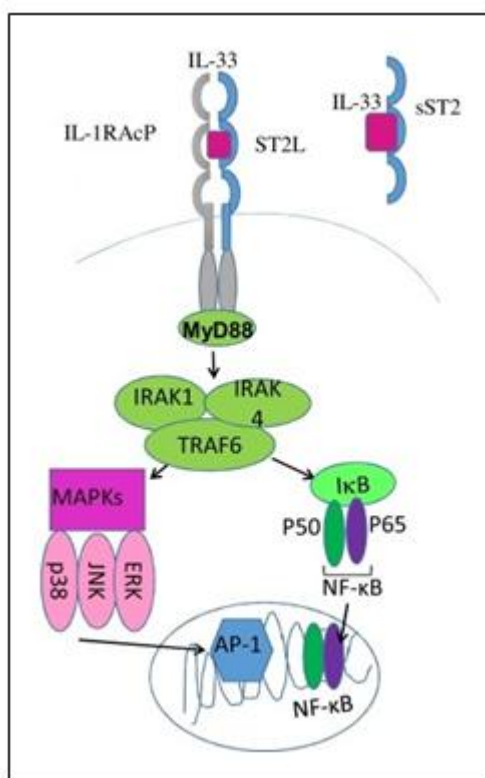


Figure 5. Mécanismes d'action de l'interleukine-33. Lorsque l'IL-33 se lie au récepteur sST2, la réaction est bloquée (en haut à droite). Par contre, la liaison entre IL-33 et le complexe ST2L-IL1RAcP permet la transmission du signal⁷⁰. MyD88 est recruté et transmet le signal par l'activation d'IRAK-1, IRAK-4 et TRAF6. Le signal est alors scindé en deux composantes : l'activation des MAP kinases qui stimule le facteur de transcription AP-1 et la phosphorylation de IκB qui stimule le facteur de transcription NFκB. Ces deux signaux permettent au final la transcription de médiateurs pro-inflammatoires⁷⁶. Image adapté de Millar et al, 2017⁷⁵.

L'IL-33 peut agir sur différents types de cellules immunitaires. Le récepteur ST2 est présent en grande quantité à la surface des **lymphocytes** T_{H2}⁷⁶. La formation du complexe IL-33-ST2 n'induit pas la différenciation des lymphocytes, mais permet la régulation génique et la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 par les lymphocytes T_{H2}^{70,76}. Outre ces cytokines T_{H2}, l'IL-33 peut induire la production de cytokines T_{H1} telle que l'interféron-gamma (IFN- γ). L'IL-33 augmenterait aussi le recrutement des cellules T_{H2}, amplifierait la réponse allergique et induirait le remodelage des voies respiratoires en agissant sur la contraction des fibroblastes et des cellules musculaires lisses^{69,70,76}.

L'IL-33 peut aussi augmenter la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines par les **mastocytes**, prolonger leur survie et améliorer l'adhésion des cellules⁷⁶. La cytokine peut aussi induire la production de cytokines médiées par les IgE et induire la dégranulation des mastocytes, amplifiant la réponse allergique⁷⁶. Chez les **basophiles**, tout comme chez les lymphocytes T_{H2} et les mastocytes, l'IL-33 induit la production de cytokines et de chimiokines et augmente l'adhésion cellulaire. La dégranulation des basophiles n'est pas affectée directement par l'IL-33, mais cette cytokine peut avoir un effet synergique avec les IgE, ce qui stimule la dégranulation. Finalement, l'IL-33 augmente la réponse immunitaire des basophiles, leur migration cellulaire au site de réaction allergique et prolonge leur survie⁷⁶.

Les **éosinophiles** sont recrutés au site d'inflammation chez les patients souffrant de maladies allergiques médiées par les IgE comme l'asthme allergique. Le récepteur ST2 est présent à la surface de ces cellules, mais en plutôt faible quantité. Par contre, des taux d'ARNm et de protéines ST2 élevés ont été observés dans les éosinophiles⁷⁶. Le complexe IL-33/ST2 induirait la production de plusieurs cytokines dont l'IL-3, l'IL-5 et l'IL-8, lesquelles augmenteraient l'adhésion des éosinophiles et prolongeraient leur survie⁷⁶.

Plusieurs autres cellules peuvent être affectées par l'IL-33. Cette alarmine augmenterait la production de **cellules dendritiques** par la moelle osseuse et augmenterait l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMHII), permettant une augmentation de la présentation d'antigènes aux différentes cellules du système immunitaire⁷⁶. L'IL-33 jouerait aussi un rôle dans l'activation des **macrophages** alvéolaires,

renforçant le rôle de cette cytokine dans la pathogénèse de l'inflammation des voies respiratoires³⁷. Finalement, l'IL-33 stimulerait le relâchement d'IL-8 par les **cellules caliciformes** augmentant l'inflammation des voies respiratoires et la métaplasie de ces cellules caliciformes³⁷.

La figure 6 montre un résumé des effets du complexe IL-33/ST2 sur les principales cellules du système immunitaire.

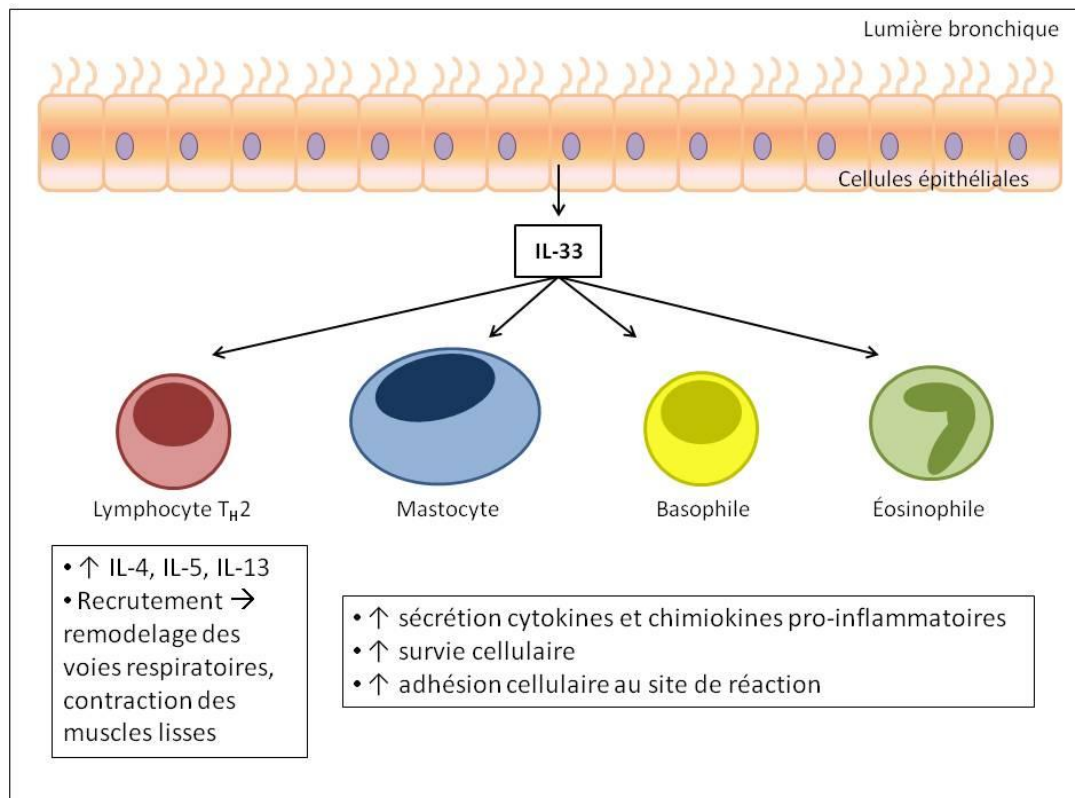


Figure 6. Effets de l'interleukine-33 sur les principales cellules immunitaires. Au niveau des lymphocytes T, l'IL-33 augmente la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 et permet le recrutement d'autres lymphocytes T_H2 au site de réaction. Ce recrutement entraîne une amplification de la réponse inflammatoire et induit le remodelage des voies respiratoires et la contraction des muscles lisses. L'IL-33 agit aussi au niveau des mastocytes, basophiles et éosinophiles en augmentant leur sécrétion de cytokines et chimiokines causant l'inflammation et en prolongeant leur survie et leur adhésion au site de réaction^{37,76}.

L'éotaxine-3

Les chimiokines sont un type de médiateurs impliqués dans l'inflammation tissulaire, notamment dans la réponse allergique. Les chimiokines ont un poids moléculaire entre 8 et 10 kDa et possèdent un domaine de liaison héparine permettant le recrutement de

différents leucocytes. Il existe 4 grandes familles de chimiokines basées sur la position des deux premières cystéines dans leur structure biochimique ; CXC, CX₃C, C et CC. Les éotaxines sont des chimiokines faisant partie de la famille CC et un des principaux représentants de cette famille est l'éotaxine-3 (CCL26). Le gène codant pour cette chimiokine est situé en position 7q11.23 et possède 5 exons (figure 7)⁸⁰.

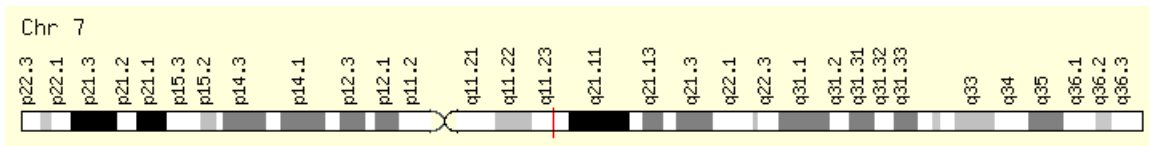


Figure 7. Position chromosomique du gène *éotaxine-3*. Le gène est situé sur le bras long du chromosome 7 en position 11.23 et est lu sur le brin négatif de l'ADN. Figure tirée de <http://www.genecards.org/>⁷⁷.

Son expression a été démontrée tout d'abord dans le cœur et les tissus ovariens, puis dans les fibroblastes et les cellules endothéliales. Sa production est médiée par les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-33 et par l'activation du facteur de transcription STAT6⁸⁰⁻⁸². Les cellules épithéliales et endothéliales sont capables de produire une grande quantité de CCL26 en contexte d'asthme et en réponse à une provocation allergénique⁸³. Cette production cause la migration des éosinophiles de la moelle osseuse vers le mucus des bronches des patients asthmatiques. De plus, CCL26 stimule la production de ROS et de protéines cationiques, entraînant les dommages aux cellules épithéliales caractéristiques de l'asthme^{80,84}. La plupart des éotaxines induisent le recrutement des éosinophiles dans les premières six heures alors que CCL26 induirait une deuxième migration entre 12 et 18 heures plus tard⁸⁴.

Le taux de CCL26 est beaucoup plus élevé chez les patients en crise atteints de maladies éosinophiliques telles que la dermatite atopique, la rhinosinusite ainsi que l'asthme allergique. En effet, dans le cas de l'asthme allergique, le recrutement des éosinophiles augmente selon l'intensité et la sévérité de la maladie⁸⁵. Le taux d'ARNm de CCL26 dans les voies respiratoires de patients asthmatiques serait associé à une diminution de la fonction pulmonaire, une augmentation du compte d'éosinophiles et à l'exacerbation de la maladie⁸⁵.

Outre le recrutement des éosinophiles, CCL26 agirait aussi sur la migration des cellules NK et, dans une plus faible mesure, sur l'attraction des lymphocytes T et des monocytes⁸¹. Tous ces rôles confirment donc l'importance et la pertinence d'étudier cette chimiokine dans un contexte d'asthme allergique.

1.2.2. Épigenétique

L'asthme est un trait complexe qui met en jeu des interactions entre les gènes, mais également entre les gènes et l'environnement. Ce fait a également été démontré en considérant que l'héritabilité de l'asthme n'est expliquée qu'à 60% par la génétique⁶. Ainsi, la régulation des gènes impliqués dans des mécanismes importants dont la différenciation des lymphocytes T vers la voie T_H2 pourrait être expliquée, en partie du moins, par des facteurs exogènes. L'environnement peut moduler l'expression des gènes par les modifications épigénétiques par exemple⁸. Ce type de modifications affecte directement l'expression des gènes et peut entraîner des modifications de la structure de la chromatine, mais la séquence de l'ADN n'est en aucun cas altérée ou modifiée⁵⁷. L'épigénétique joue un rôle important dans la différenciation et l'activation cellulaire. Toutes les cellules du corps humain contiennent les mêmes informations génétiques, mais leur code épigénétique distinct permet d'exprimer les protéines différentes qui les caractérisent. Il s'agit donc de modifications spécifiques à chaque tissu et même à chaque cellule⁸⁶. Ces marques épigénétiques incluent les modifications post-traductionnelles des histones, les micro-ARN et la méthylation de l'ADN⁸⁷.

Les modifications post-traductionnelles des histones comprennent entre autres l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Les histones sont des protéines retrouvées dans le noyau des cellules eucaryotes autour desquelles l'ADN est replié dans des unités structurales, les nucléosomes. Les quatre principales histones dans un nucléosome sont H2A, H2B, H3 et H4⁸⁸. Les modifications affectant la queue des histones entraînent la répression de l'expression d'un gène ou, au contraire, son activation. La plus connue de ces modifications est l'acétylation. L'acétylation des histones consiste au transfert d'un groupement acétyle sur un résidu lysine de l'histone par l'enzyme histone acétyltransférase⁸⁸. Ce transfert de groupement chimique permet le relâchement et l'ouverture de la chromatine, ce qui permet aux facteurs de transcription de venir se lier à

l'ADN et induire la transcription génique. Ce type de modification se situe principalement près des sites d'initiation de la transcription⁵⁷. La phosphorylation des histones est un processus un peu moins étudié, mais tout comme l'acétylation, cette marque épigénétique serait associée à une ouverture de la chromatine et donc à une plus grande expression génique⁸⁹. La méthylation des histones est un mécanisme un peu plus complexe. En effet, il s'agit de l'ajout d'un groupement méthyle au niveau des histones. Par contre, dépendamment où se situe ce groupement méthyle, cette marque épigénétique peut être associée à l'ouverture ou à la fermeture de la chromatine. La méthylation des histones peut donc soit induire soit réprimer l'expression des gènes⁸⁸. Il en va de même pour l'ubiquitination des histones qui peut augmenter ou diminuer l'expression des gènes⁸⁹.

Un autre mécanisme épigénétique bien connu est le micro-ARN. Il s'agit de petites molécules d'ARN simple brin d'une longueur approximative de 19 à 25 nucléotides⁵⁷. Les micro-ARN ont démontré un rôle dans plusieurs processus cellulaires tels que le métabolisme, l'apoptose et la différenciation et le développement cellulaire. Les micro-ARN seraient aussi impliqués dans le système immunitaire en inhibant l'expression de certains gènes⁵⁷. Le mécanisme d'action des micro-ARN consiste à se lier au segment 3'-UTR des ARN messagers transcrits à partir de certains gènes. Une fois qu'ils sont liés, les micro-ARN empêchent l'interaction entre les ARN messagers et la machinerie de traduction cellulaire et/ou induisent la dégradation des ARN messagers. Ils induisent donc une répression de la traduction en protéines, diminuant les fonctions accomplies par celles-ci dans la cellule⁵⁷.

La dernière marque épigénétique discutée est la méthylation de l'ADN. Il s'agit de la première modification épigénétique à avoir été identifiée et la plus étudiée à ce jour⁹⁰. Comme le présent projet est en lien direct avec cette marque épigénétique, une attention particulière lui sera accordée.

1.2.3. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout covalent d'un groupement méthyle aux cytosines sans changer la séquence nucléotidique^{86,91}. Cet ajout se fait à partir d'une méthyltransférase en réponse à divers stimuli exogènes. L'ajout du groupement méthyle se situe sur le 5^e carbone de l'anneau pyrimidine des cytosines lorsque celles-ci précèdent une

guanine⁹⁰. C'est pour cette raison que l'on parle de sites CpG en parlant des sites potentiels de méthylation de l'ADN⁸⁶. La plupart des études ont centré leurs recherches sur les îlots CpG, des régions de plus de 500pb riches en CG souvent situées près des régions régulatrices ou des promoteurs, situées directement dans un gène ou dans une région intergénique⁹². Par contre, depuis quelques années, des études ont démontré que les «rives» des îlots de dinucléotides CpG, 2kb autour des îlots, sont des régions où la méthylation de l'ADN pourrait avoir des effets encore plus importants sur la régulation de l'expression des gènes⁵⁷.

La méthylation de l'ADN peut affecter l'expression des gènes de deux façons distinctes. Tout d'abord, lorsque la méthylation se retrouve au niveau du promoteur d'un gène, les groupements méthyles peuvent empêcher physiquement les facteurs de transcription de se lier à l'ADN, bloquant la transcription en ARN messager⁵⁷. Ensuite, la méthylation de l'ADN peut induire le recrutement d'autres protéines aux mêmes endroits tels que des histones déacétylases. Ces enzymes enlèvent les groupements acétyles des histones et induisent la formation d'une chromatine compacte et inaccessible pour les facteurs de transcription⁵⁷.

Les conséquences de la méthylation de l'ADN dépendent beaucoup de l'endroit où se retrouvent les groupements méthyles par rapport à un gène. En effet, une hyperméthylation au niveau du promoteur d'un gène est souvent associée à une faible expression du gène alors que l'hypométhylation est associée à une expression accrue. Lorsque la méthylation se situe dans le corps du gène, les conséquences sont inverses. Une hyperméthylation dans le corps du gène est associée à une expression plus grande du gène (figure 8)⁹³.

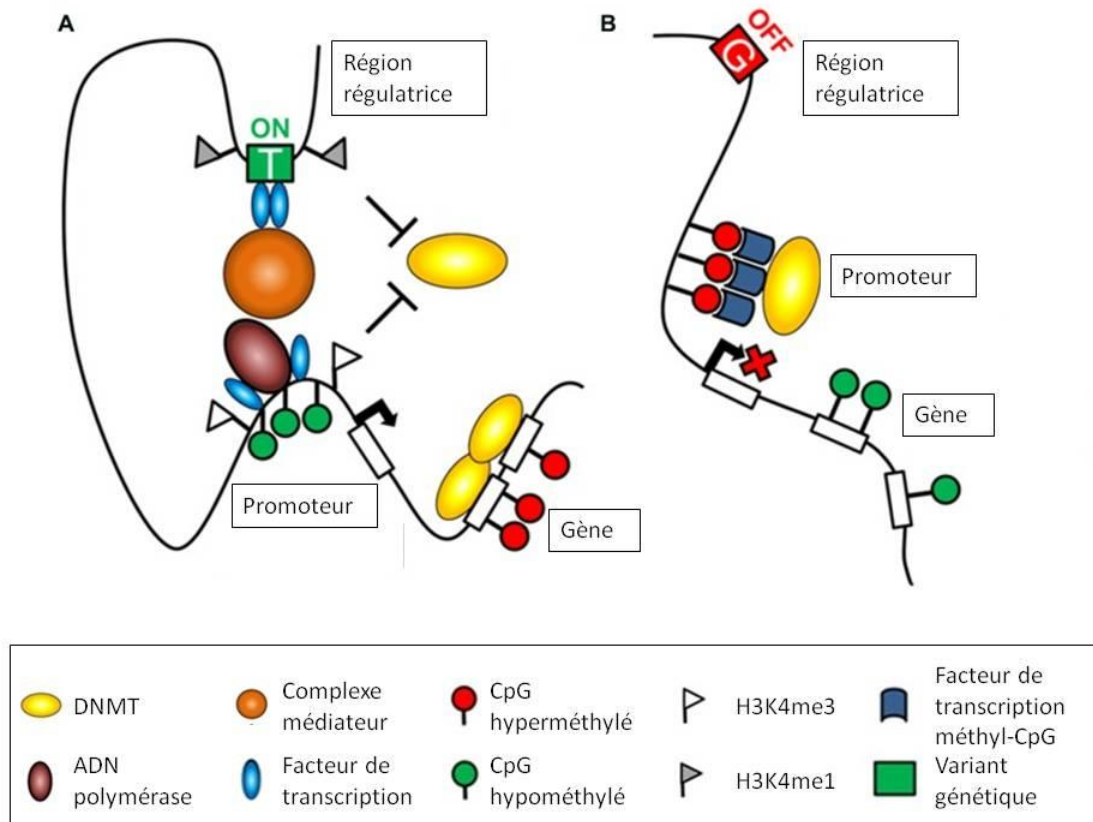


Figure 8. Régulation de l'expression génique. La méthylation de l'ADN peut avoir des répercussions différentes selon l'endroit où elle se trouve par rapport au gène. Dans la région du promoteur, une méthylation plus faible entraîne une transcription plus grande (A) et une méthylation plus élevée bloque la fixation des facteurs de transcription diminuant la quantité d'ARNm produit (B). De plus, un polymorphisme dans une région régulatrice pourrait permettre la fixation d'un facteur de transcription (A) ou l'en empêcher (B), ce qui peut réguler à la hausse ou à la baisse la transcription du gène. Figure modifiée de Heyn, 2014⁹³.

Certains changements de méthylation de l'ADN peuvent survenir tout au long de la vie, mais la majorité de l'épigénome est établi pendant l'embryogénèse et le début du développement du fœtus car celui-ci peut être soumis à divers facteurs exogènes⁹⁰. Par contre, il s'agit d'un mécanisme réversible et certains groupements méthyles peuvent se perdre permettant l'accès aux facteurs de transcription et la production d'ARN messagers⁵⁷. En effet, des groupements méthyles peuvent être ajoutés ou retirés de la séquence d'ADN en réponse à divers stimuli. La diète, les facteurs environnementaux tels que la fumée de cigarette et les pesticides, et différents stress peuvent modifier le patron de méthylation par l'action de plusieurs méthyltransférases⁵⁷. Ces modifications épigénétiques sont très

importantes puisqu'elles ont été associées à plusieurs maladies comme les maladies auto-immunes, les cancers, l'insuffisance cardiaque et certaines affections de la peau⁹⁴.

La méthylation de l'ADN pourrait aussi jouer plusieurs rôles importants en asthme atopique. Par exemple, une hypométhylation des promoteurs de gènes pro-inflammatoires induirait une expression plus grande de ceux-ci, augmentant la susceptibilité de réaction pour certains individus⁹⁵. De plus, le développement, l'activation et le maintien des fonctions des cellules T dépendent en partie de la méthylation de l'ADN⁸⁸.

Dans la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean, la combinaison d'études d'association génétique, d'association épigénétique (méthylation de l'ADN) et d'expression génique a permis de mettre en lumière quelques gènes significatifs pour toutes ces approches, dont le gène *IL33* (figure 9). Cela confirme donc la pertinence d'étudier ce gène ainsi que sa voie biologique dans ce mémoire.

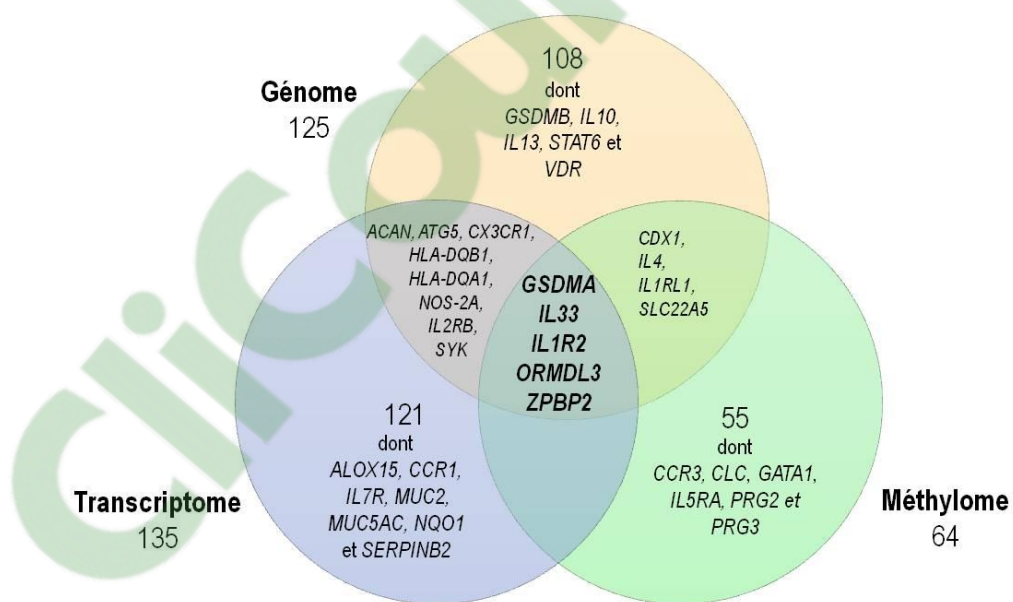


Figure 9. Gènes associés au phénotype d'asthme par trois types d'approche dans la cohorte familiale du Saguenay–Lac-Saint-Jean. Il est possible de remarquer qu'*IL33* fait partie des gènes qui ont été associés à l'asthme tant par une approche génétique (association), épigénétique (méthylation) que transcriptomique (expression) ce qui justifie le choix de ce gène comme pierre angulaire du présent projet.

1.2.4. Facteurs environnementaux

Comme l'asthme est un trait complexe, il est influencé par de nombreux facteurs en plus de la composante génétique, tels l'histoire familiale, l'âge, le sexe, le statut socio-économique, l'origine ethnique ainsi que plusieurs facteurs environnementaux⁵⁶.

L'exposition au tabac est l'un des facteurs les plus importants dans le développement de l'asthme allergique chez les enfants⁹⁵. En effet, l'exposition à la fumée secondaire a été reliée au commencement et au maintien de l'asthme⁹⁶. Dépendamment des études, cette habitude de vie diminue de 50% à 174% le taux de contrôle de l'asthme⁹⁶. La fumée de cigarette chez les asthmatiques est associée à un taux plus élevé de mortalité, des crises d'asthme plus fréquentes et l'exacerbation de la maladie et de ses symptômes tels que la respiration sifflante et les éveils pendant la nuit⁹⁶. Plusieurs études démontrent que l'arrêt du tabagisme peut améliorer les symptômes de l'asthme et des améliorations dans les fonctions des poumons peuvent même être observées seulement 24 heures après l'arrêt⁹⁶. Le tabagisme affecte le profil épigénétique et peut même se reproduire chez un enfant dont la grand-mère était fumeuse puisque la transmission de la méthylation peut se répercuter jusqu'à la troisième génération. Une étude a été menée sur 27 000 CpGs de 14 000 régions promotrices de gènes et les résultats démontrent des différences de méthylation entre les fumeurs et les témoins, ce qui porte à croire qu'il existe un lien direct entre la fumée de cigarette et l'asthme⁹⁵.

Un autre facteur de risque pour l'asthme est le mode de vie. En effet, les gens vivant dans les pays développés sont en contact avec plusieurs types d'allergènes et d'irritants présents dans l'environnement⁵⁶. La pollution de l'air, les bactéries, les virus, les particules présentes dans l'air, l'ozone, les gaz d'échappement des voitures, le pollen, l'humidité, les moisissures ne sont que quelques exemples d'allergènes extérieurs pouvant déclencher ou exacerber l'asthme allergique. Parmi les irritants intérieurs se retrouvent la poussière, les coquerelles, les animaux, le bois, les gaz générés par les plantes et plusieurs autres⁵⁶. Tous ces allergènes, en se liant aux IgE sur les mastocytes, peuvent déclencher la cascade allergique décrite plus haut⁵⁶.

Le facteur mode de vie comprend par contre une dualité intéressante qui n'a toujours pas été éclaircie. En effet, outre la plus grande proximité avec des allergènes et des irritants

dans les pays développés, les enfants vivent dans un monde de plus en plus aseptisé. En 1989, Strachan propose pour la première fois la théorie de l'hygiène⁹⁷. Dans cette hypothèse, il avance que la plus faible exposition des enfants aux microbes altère leur système immunitaire et augmenterait la susceptibilité de souffrir de maladies allergiques⁹⁸. Le développement d'un microbiote « sain » serait donc très important pour protéger contre ce type d'affection. Des études récentes ont démontré que la composition du microbiote intestinal, en particulier l'abondance de certaines familles et même de certaines espèces, joue un rôle important dans la susceptibilité de développer des maladies allergiques⁹⁸. Parmi les facteurs influençant l'établissement du microbiote se retrouvent le mode d'accouchement (par césarienne ou par voie naturelle), la pratique de l'allaitement maternel (exclusive ou non et la durée de celle-ci) ainsi que l'absence de prise d'antibiotiques dans les premières années de vie⁹⁹.

La prise d'antibiotiques par les enfants fait également le lien avec les infections respiratoires contractées en bas âge. Ce facteur peut lui aussi être abordé de deux façons opposées. D'une part, l'hypothèse de l'hygiène avance que l'exposition précoce à des infections et des endotoxines altère la balance T_H1/T_H2 , atténuant la réponse de type TH2. Ainsi, le développement de l'asthme et des maladies allergiques serait atténué chez ces enfants¹⁰⁰. D'autre part, un environnement trop aseptisé entraînerait une différenciation des cellules T vers la voie TH2, ce qui prédispose au développement de maladies allergiques telles que l'asthme¹⁰⁰.

L'alimentation joue aussi un rôle important dans le développement et le maintien du profil épigénétique et du microbiote. Une augmentation marquée du taux de personnes asthmatiques dans le monde a été observée, spécialement dans les pays en développement où le mode de vie occidental se fait de plus en plus sentir^{57,101}. Afin de maintenir un patron de méthylation adéquat, il est nécessaire d'avoir des aliments contenant des groupes donneurs de méthyle dans son alimentation tels que l'acide folique, la choline, la vitamine B12, B2 et B6 et la bétaine¹⁰². Une étude a été menée avec des modèles murins où le taux d'acide folique maternel a été modifié. Les résultats ont démontré que la diminution d'acide folique dans la diète de la mère entraînait une hypométhylation des gènes associés à l'allergie chez les souris et altérait l'expression de ceux-ci⁵⁶. En contrepartie, en

augmentant le nombre de donneurs de méthyle chez la mère, les souriceaux avaient un taux plus élevé de maladies des voies respiratoires car ces donneurs favorisent la maturation des lymphocytes T vers la voie T_{H2} et augmentent les risques de maladies allergiques⁵⁶. Le changement dans la diète altère la méthylation à des îlots CpG particuliers qui modifient l'expression de gènes clés dans la régulation et le développement d'un système immunitaire efficace⁵⁶. On peut observer une augmentation de la voie T_{H2}, un nombre plus élevé d'éosinophiles, un remodelage des voies respiratoires et une augmentation de l'héritabilité d'une maladie respiratoire⁵⁶.

1.4. Hypothèses et objectifs

L'asthme constitue un fardeau économique important pour la société dû au nombre important de personnes affectées ainsi qu'à l'hétérogénéité des réponses aux différents traitements en fonction du bagage génétique et de la sévérité de la maladie. Comme il s'agit d'un trait complexe impliquant des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux, le développement de traitement personnalisé, serait plus efficace que l'application d'une approche visant à réduire les symptômes pour le plus grand nombre possible d'individus. Dans cette optique, il est nécessaire de faire des recherches afin de mieux comprendre la biologie moléculaire de la maladie et de ses différentes formes et de préciser les mécanismes physiopathologiques responsables des manifestations cliniques. Ainsi, la documentation des différentes voies biologiques menant au développement, à la persistance et à l'exacerbation de l'asthme pourra permettre d'identifier des cibles thérapeutiques et conduire à l'application d'une médecine personnalisée.

Actuellement, plus de 300 gènes ont été associés à l'asthme et ce nombre ne cesse d'augmenter⁵⁸. L'IL-33 et son récepteur ST2 ont déjà été associés dans plusieurs études d'association génétique indépendantes^{2,103-105}. Afin d'intégrer le facteur environnement à l'étude de l'*IL33* et de gènes dans sa voie biologique, la méthylation de l'ADN, le mécanisme épigénétique le mieux connu, est étudiée afin de bien documenter l'implication de cette cytokine dans l'asthme. L'hypothèse du travail est donc que les variations de la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes *IL33*, *IL1RL1* et *CCL26* des cellules épithéliales bronchiques ainsi que l'expression de ces gènes sont associés aux phénotypes asthme allergique.

Les objectifs de l'étude sont donc de :

1. Documenter le patron de méthylation de l'ADN des gènes *IL33*, *IL1RL1* et *CCL26* des cellules épithéliales bronchiques d'individus asthmatiques allergiques et d'individus-témoins (sans asthme ni allergie);
2. Documenter le patron d'expression de ces gènes et vérifier la corrélation entre la méthylation et l'expression afin d'évaluer si cette marque épigénétique régule le niveau d'ARN messenger.

2- Chapitre 1 : Methylation profiles of *IL33* and *CCL26* in bronchial epithelial cells are associated with asthma

2.1. Avant-propos

Ce chapitre expose les principaux résultats du projet de recherche visant à documenter les patrons de méthylation et d'expression des gènes *IL33*, *IL1RL1* et *CCL26* dans des cellules épithéliales bronchiques dans un contexte d'asthme.

Les analyses ont permis de démontrer une différence significative du niveau de la méthylation des cytosines du promoteur des gènes *IL33* et *CCL26*. La méthylation de l'ADN dans la région du promoteur du gène *IL33* et trois polymorphismes ont aussi démontré une corrélation positive significative. Les résultats ont donc permis de confirmer la pertinence de l'étude de l'IL-33 et de sa voie biologique afin de mieux comprendre et éventuellement traiter la maladie.

Cet article est actuellement en révision et la soumission a été faite le 12 février 2018. La Dre Catherine Laprise a dirigé l'ensemble du projet et réalisé le devis de l'étude. Les biopsies bronchiques d'où ont été extraites les cellules épithéliales ont été réalisées à l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (IUCPQ) par le Dr Michel Laviolette. Sophie Plante, de l'équipe du Dre Jamila Chakir de l'IUCPQ, s'est occupée de la mise en culture et de l'isolation des cellules épithéliales bronchiques. Sophie Plante et Valérie Gagné-Ouellet ont fait l'extraction de l'ADN et de l'ARNm ainsi que de la mesure de l'expression du gène *IL1RL1*. Valérie Gagné-Ouellet a également fait la conversion au bisulfite de sodium et le pyroséquençage du gène *IL33*. Par la suite, j'ai réalisé le pyroséquençage des deux autres gènes, *IL1RL1* et *CCL26*, la transcription inverse, les PCR en temps réel pour la mesure de l'expression des gènes *IL33* et *CCL26*, puis le séquençage de ces deux gènes. Marie-Chantale Larose, assistante de recherche du Dr Nicolas Flamant de l'IUCPQ, a contribué aux étapes pour le *CCL26* en ayant mis au point les conditions pour la mesure d'expression. Suite à ces différentes manipulations, Valérie Gagné-Ouellet et moi avons rédigé l'article en collaboration. Catherine Laprise a dirigé les analyses statistiques, retravaillé le manuscrit. Tous les auteurs ont révisé le manuscrit et

approuvé sa soumission. Catherine Laprise a finalement soumis l'article à la revue *Epigenetics* le 12 février 2018.

Title: Methylation profiles of *IL33* and *CCL26* in bronchial epithelial cells are associated with asthma

Authors: Miriam Larouche*¹, BSc, Valérie Gagné-Ouellet*¹, MSc, Anne-Marie Boucher-Lafleur¹, BSc, Marie-Chantale Larose², PhD, Sophie Plante², MSc, Anne-Marie Madore¹, PhD, Michel Laviolette², MD, Nicolas Flamand², PhD, Jamila Chakir², PhD, and Catherine Laprise¹, PhD.

Affiliations: ¹Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada; ²Centre de recherche, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Département de médecine, Faculté de médecine, Université Laval, Québec City, QC G1V 4G5, Canada.

Address for correspondence:

Catherine Laprise

Canada Research Chair in Environment and Genetics of Respiratory Disorders and Allergy

Université du Québec à Chicoutimi

555, boulevard Université

G7H 2B1, Saguenay, Québec, Canada

Catherine.laprise@uqac.ca

Key words: *IL33*, *IL1RL1*, *CCL26*, methylation, inflammation, T_H2, bronchial epithelial cells, gene expression, DNA sequencing

Abbreviations:

BECs: Bronchial epithelial cells

CCL26: Eotaxin-3

cDNA: Complementary DNA

CDX: Caudal type homeobox

CpG: Cytosine-phosphate-guanine dinucleotide site
CTCF: CCCTC binding factor
DNA-me: DNA methylation
FEV₁: Forced expiratory volume in 1 second
GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA1: GATA binding protein-1
GATA3: GATA binding protein-3
GWAS: Genome wide association study
IgE: Immunoglobulin-E
IL-1: Interleukin 1
IL-4: Interleukin 4
IL-5: Interleukin 5
IL-13: Interleukin 13
IL-25: Interleukin 25
IL-33: Interleukin 33
IL1RL1/ST2: IL-1 receptor-like 1
IL33: Interleukin 33 gene
mRNA: Messenger RNA
NFκB: Nuclear factor kappa B/c-rel
NKX25: NK2 homeobox 5
PC₂₀: methacholine concentration causing 20% drop
PPIA: Peptidylpropyl isomerase A
qRT-PCR: quantitative real time polymerase chain reaction
ROS: Reactive oxygen species
RPLP0: Ribosomal protein lateral stalk subunit P0
STAT6: signal transducer and activator of transcription 6
SNP: Single nucleotide polymorphism
TF: Transcription factor
TSLP: Thymic stromal lymphopoietin
TSS: Transcription start site
Δβ: Difference of methylation levels

2.2. Résumé

L'épithélium des voies respiratoires joue un rôle important dans la réponse inflammatoire dans l'asthme. Les cellules épithéliales bronchiques relâchent des médiateurs pro-inflammatoires qui recrutent à leur tour des cellules inflammatoires telles que les éosinophiles. Malgré le fait que le rôle des cytokines relâchées par l'épithélium ait été largement décrit, les mécanismes régulant leur sécrétion demeurent toujours incertains. La méthylation de l'ADN, un mécanisme épigénétique, a précédemment été identifiée comme médiateur de la production de plusieurs cytokines de type auxiliaire 2 (T_H2) dans les cellules sanguines. L'objectif de cette étude est de caractériser les variations de méthylation de l'ADN dans les gènes *IL33*, *IL1RL1* et *CCL26* dans des cellules épithéliales bronchiques d'individus asthmatiques et de voir les impacts fonctionnels sur la transcription de ces gènes. Le bis-pyrosequençage et le qRT-PCR ont été réalisés sur un échantillon de 10 patients asthmatiques et 10 témoins. Le séquençage des gènes a aussi été réalisé pour identifier des polymorphismes pouvant interagir avec les variations épigénétiques. Un niveau de méthylation de l'ADN plus faible a été détecté chez les asthmatiques pour les gènes *IL33* et *CCL26* ($\Delta\beta=15\%$, $p<0.001$ et $\Delta\beta=5\%$, $p=0.036$, respectivement). De plus, les individus porteurs d'un allèle mutant au sein d'un haplotype dans le promoteur d'*IL33* (formé par chr9:6210100, rs928413 et rs7848215) avaient un niveau plus faible de méthylation ($\Delta\beta=6\%$, $p=0.021$ et $\Delta\beta=14\%$, $p=0.038$ pour le CpG 1 et la moyenne CpGs 2-3-4, respectivement), suggérant qu'une potentielle interaction entre ces SNP et le niveau de méthylation du promoteur d'*IL33* pourrait mener à une action synergique augmentant le risque de développer de l'asthme. Le niveau d'expression des trois gènes était supérieur chez les asthmatiques, mais le seuil de significativité n'a pas été atteint. Par contre, une association entre le niveau d'expression de *CCL26* et le décompte d'éosinophiles sanguins a été observée ($r=0,772$; $p=0,009$). Ces résultats démontrent l'importance d'investiguer à la fois les mécanismes génétiques et épigénétiques (par exemple les polymorphismes, l'expression génique et la méthylation de l'ADN) dans le but de mieux comprendre et de documenter la réponse immunitaire des cellules épithéliales bronchiques dans l'asthme.

2.3. Abstract

Airway epithelium plays a key role in the inflammatory response in asthma. Bronchial epithelial cells (BECs) release pro-inflammatory mediators, which recruit inflammatory cells such as eosinophils. Although the roles of epithelial cytokines have widely been described, the underlying mechanisms regulating their secretions remain unclear. The epigenetic mechanism of DNA methylation (DNA-me) has previously been identified to mediate the production of several type 2 helper cell (T_H2) cytokines in blood cells, and this study aimed to characterize DNA-me variations in *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* in asthma and their functional impacts on transcriptional activity in BECs. We performed bis-pyrosequencing and qRT-PCR in BECs from 10 asthmatic and 10 control individuals. We also sequenced these genes to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), and tested interaction with DNA-me variations. We detected lower DNA-me levels of *IL33* and *CCL26* in asthmatic than control BECs ($\Delta\beta=15\%$, $p<0.001$ and $\Delta\beta=5\%$, $p=0.036$, respectively). Interestingly, carriers of a mutative allele in a haplotype within the promoter of *IL33* (formed by chr9:6210100, rs928413 and rs7848215) had a lower DNA-me levels ($\Delta\beta=6\%$, $p=0.021$ and $\Delta\beta=14\%$, $p=0.038$ for CpG 1 and mean CpGs 2-3-4, respectively), suggesting a possible interaction between these SNPs and methylation level in *IL33* promoter region that may lead to a synergetic risk effect. mRNA levels of the three genes were higher in the asthmatic than non-asthmatic group but did not reach statistical significance. However, an association was observed between *CCL26* gene expression and blood eosinophil count in billion per liter ($r=0.772$; $p=0.009$). Altogether these findings highlight the importance of investigating both epigenetic and genetic mechanisms (eg. DNA-me, gene expression and polymorphisms) in understanding the epithelial immune response in asthma.

2.4. Introduction

Airway epithelium constitutes the first line of host defense against pathogens. Airway epithelial remodeling in asthma involves the disruption of tight junctions, loss of epithelial integrity, impairment of barrier function, goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion; features which correlate with asthma severity.^{106,107} It is now recognized that epithelial cells are the first set of immune cells interacting with antigens such as aeroallergens in allergic individuals.¹⁰⁸ The allergen-epithelial cell interactions release a plethora of inflammatory

mediators activating both the innate and adaptive responses; hence, the epithelium plays a key role in the development and persistence of inflammatory response.¹⁰⁹

Cytokines derived from the epithelium (e.g. thymic stromal lymphopietin (TSLP) and interleukins (ILs) -25 and -33)¹¹⁰ have been implicated in asthma pathogenesis. IL-33, a member of the IL-1 family, acts as an endogenous alarm signal to orchestrate the immune response following an epithelium damage.⁴³ In atopic asthma, allergens stimulate the airway epithelium release of IL-33,⁷⁸ possibly in a severity-dependent manner.¹¹¹ This leads to an upregulation of T_H2-driven inflammation and an activation of the IL-33-specific receptor (IL-1 receptor-like 1 (IL-1RL1)/ST2).¹⁰⁹ The T_H2 response results in blood eosinophil recruitment, which is highly involved in asthma exacerbations through the liberation of inflammation mediators (e.g. major basic proteins and leukotrienes).^{80,112,113} Furthermore, IL-33 expression is increased in bronchial epithelial cells (BECs) from asthmatic individuals.⁷⁸ Additionally, several single nucleotide polymorphisms (SNPs) near and within *IL33* and *IL1RL1* have been found to associate with asthma and have been validated in several genome-wide association studies (GWASs).^{2,103-105} IL-33 is known to enhance the production of chemokine (C-C motif) ligand 26 (eotaxin-3; CCL26),⁸² a potent chemotactic factor for eosinophils.^{84,85} We previously reported that CCL26 levels are correlated with eosinophil levels in sputum of asthmatic patients and that this relationship is correlated with severity.⁸⁵ In addition, genetic variants within *CCL26* have been found to associate with immunoglobulin (Ig)-E levels.¹¹⁴ Taken together, IL-33 and its downstream target molecules (i.e. IL-1RL1 and CCL26) present themselves as strong candidates for asthma.

Epigenetic modifications are suspected to be one type of underlying mechanisms involved in the fine regulation of asthma key gene expression.¹¹⁵ DNA methylation (DNA-me), the most investigated epigenetic modification, is the covalent binding of a methyl group on the fifth carbon of a cytosine pyrimidine ring in response to environmental cues.¹¹⁶ It is most likely to be found when cytosine precedes a guanine (dinucleotide CpG). In addition, several studies highlighted the contribution of DNA-me in processes relevant to asthma physiopathology, including cell differentiation and cytokine production.¹¹⁷⁻¹²³ In blood cells, DNA-me is involved in the regulation of transcriptional activity of some T_H2 genes.^{118,123-125} However, only few studies assessed whether DNA-me might be altered in the airway epithelium of asthmatic patients¹²⁶⁻¹³¹ and only one study investigated the interactions between genetic and epigenetic

modifications.¹³¹ Since the airway epithelium acts as a barrier between the bronchial lumen and lung tissue, and that epigenetic changes are sensitive to environmental insults, DNA-me may be involved in the immune response of asthmatic airway epithelium by modulating the release of cytokines.

In this study, we assessed whether DNA-me in the epithelium is involved in the gene expression of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* in asthmatic individuals and looked for evidence of an interplay between epigenetic and genetic mechanisms in gene expression regulation. A better understanding of these mechanisms will bring new insights to new therapeutic development for asthma.

2.5. Results

Patient's characteristics

A total of 20 primary BEC cell lines were used for the study of which 10 were from asthmatic individuals and 10 from healthy subjects.⁸⁵ All subjects were never-smokers. Of the 10 asthmatic individuals, 6 had mild asthma and 4 had severe eosinophilic asthma (Table 2). The mean age of the severe asthmatic group is significantly higher than the control and mild asthmatic groups. The mean force expiratory volume in 1 second (FEV₁) % predicted is 65% (sd=9) for severe asthmatic subjects, 93% (sd=7) for mild subjects and 101% (sd=13) for control subjects. The groups did not differ by blood cell counts.

Epigenotyped loci and surrounding genomic regions

We epigenotyped a total of 14 CpG dinucleotide sites within or upstream (located in promoter region) of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* in DNA isolated from BECs. These loci are shown in Figure 1. *IL33* CpG sites 2, 3 and 4, *IL1RL1* CpG sites 5 and 6 and *CCL26* sites 2 and 3 were correlated ($r>0.5$; $p<0.05$). Three of the 14 CpG sites were considered hypomethylated (i.e. $<10\%$; *IL1RL1* CpG sites 3, 6 and 7) and were not further analysed. Potential binding sites were detected for several transcription factors (TFs) including GATA binding protein-1 (GATA1), GATA binding protein-3 (GATA3), CCCTC-binding factor (CTCF), Caudal type homeobox (CDX) and NK2 homeobox 5 (NKX25) (Figure 1).

Epivariations in *IL33* and *CCL26* are associated with asthma and related phenotypes

We investigated the relationship between DNA-me levels in *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* and asthma history with age and sex as covariates in BECs. The promoter region of *IL33* (CpG sites 2, 3 and 4) was less methylated in BECs from asthmatic than from non-asthmatic individuals (difference of methylation levels ($\Delta\beta$) =15%, $p<0.001$ with Cohen's effect size (d) =1.1; Figure 2). DNA-me levels at the *CCL26* gene promoter region (CpG site 4) were associated with asthma ($\Delta\beta$ =5%, $p=0.036$ with $d=1.3$; Figure 2). None of the analyzed CpG sites within *IL1RL1* was found to be differentially methylated between asthmatic and non-asthmatic individuals (data not shown).

We next assessed whether DNA-me variations were associated with asthma severity. DNA-me levels of *IL33* CpG sites 2-3-4 and *CCL26* CpG site 4 were similar between mild asthmatic and eosinophilic severe asthmatic groups ($p=0.997$ and $p=0.053$, Supplementary Figure 1A). DNA-me levels were significantly lowered in the severe asthma group compared to the control individuals for the *CCL26* CpG site 4 ($p=0.002$). No association was found between DNA-me levels and the clinical phenotypes FEV₁ and cell counts (data not shown).

Gene expression levels of *CCL26* is associated with eosinophil count

We investigated the association between *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* gene expression in BECs and asthma phenotypes. mRNA levels of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* were higher in the asthmatic than non-asthmatic group but did not reach statistical significance (*IL33* fold-change = 4.3, $p=0.537$; *IL1RL1* fold-change = 1.5, $p=0.066$ and *CCL26* fold-change = 1.5, $p=0.273$, Figure 3A). An association was observed between *CCL26* gene expression and blood eosinophil count in billion per liter ($r=0.772$; $p=0.009$, Figure 3B); no association was observed for either *IL33* or *IL1RL1* (data not shown, $p=0.683$ and $p=0.531$ respectively). No association was found between gene expression and asthma severity ($p=0.992$, $p=0.356$ and $p=0.215$ for *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* respectively, Supplementary Figure 1B).

We assessed the functional impacts of epivariations on transcriptional activity in BECs. No significant correlation was observed between *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* DNA-me and mRNA levels (for *IL33* CpG 1 and 2-3-4: $p=0.390$ and $p=0.271$, for *IL1RL1* CpG 1, 2, 4 and 5: $p=0.085$, 0.106, 0.064 and 0.217, and for *CCL26* CpG 1, 2-3 and 4: $p=0.295$, $p=0.393$ and $p=0.395$).

Asthma-associated SNPs are associated with *IL33* DNA-me levels

We sequenced the promoter regions of *IL33* and *CCL26* given the associations detected between DNA-me levels and asthma in these genes (Figure 1 and Table 1). A total of 10 SNPs in *IL33* and 2 in *CCL26* were identified; of the ten *IL33* SNPs 2 were novel (chr9:6210100 and chr9:6215082). Three SNPs in *IL33* have too low heterozygote frequency to be analyzed (only 1 heterozygote). Seven SNPs in *IL33* were tested for association with asthma and none was found to be associated ($p > 0.05$, Table 1) in the 20 BEC samples. However, association analyses were also performed in the SLSJ cohort using MFQLS analyses and 4 SNPs were associated with asthma including the 2 SNPs associated in the literature (from $p = 0.020$ to $p = 0.039$, Table 1). No association was observed between these SNPs and gene expression of *IL33* (Supplementary Table 1). *CCL26* SNPs were not tested due to low sample number.

We assessed the associations between the 7 *IL33* SNPs and DNA-me levels at *IL33* CpG site 1 and *IL33* CpG sites 2-3-4 and found that DNA-me levels at CpG site 1 was associated with 5 SNPs (rs992969, chr9:6210100, rs928412, rs928413 and rs7848215) and that DNA-me levels at CpG sites 2-3-4 were associated with 3 SNPs (chr9:6210100, rs928413 and rs7848215) (Table 1). All 7 SNPs were in strong linkage disequilibrium ($D' > 0.92$) (Supplementary Figure 2). *IL33* promoter DNA-me levels at CpG site 1 and CpG sites 2-3-4 were 6% and 14% higher in homozygous individuals (homozygous for all SNPs of the haplotypes) compared to heterozygotes (heterozygote for all SNPs of the haplotype), respectively ($p = 0.021$ and 0.038 and $d = 1.1$ and $d = 1.0$; respectively) (Figure 4).

2.6. Discussion

In recent years, efforts to better define asthma aetiology have led to the discovery that epigenetic mechanisms modify disease pathogenesis. Here we show that the immune role of airway epithelium is regulated, at least partially, by DNA-me modifications at specific loci within T_H2 genes. We and others have previously identified several epivariations within T_H2 pro-inflammatory genes in various tissues such as whole blood, CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes and umbilical cord DNA.^{123-125,132,133} Given that the epithelium is significantly affected in asthma,¹³⁴ an investigation of the epigenetic regulation in BECs is warranted to bring more promising findings in understanding asthma pathogenesis.

To the best of our knowledge, we are the first to report epivariations in the promoter region of *IL33* to be associated with asthma using BECs. These DNA-me levels are likely to be associated with gene expression, suggesting that the epigenotyped CpG sites might be involved in the modulation of *IL33* cytokine production by the airway epithelium. Generally speaking, lower DNA-me levels in the promoter induce an upregulation of transcriptional activity;⁹³ however, even though an increase in mRNA levels has been found for the three genes in asthmatic individuals compared to controls, the reverse correlation between DNA-me and mRNA levels did not reach significance for *IL33* and *CCL26*. This may be explained by the great variability observed in asthmatic individuals in this study, particularly for the *IL33* gene, and by the small sample size. Given the key role of IL-33 in asthma^{6,70} and eosinophil-induced airway inflammation^{135,136} and our findings of lowered DNA-me levels in asthmatic BECs, we expected but did not find a negative correlation between *IL33* DNA-me levels and blood eosinophil. The poor correlation between blood and epithelial eosinophil counts may be a contributing factor.^{137,138} Our finding of hypomethylation in the promoter region of *IL33* in asthmatic BECs underscores the need to better define the transcriptional and functional impacts of *IL33* epivariations in airway epithelium and the origin of these epigenetic modifications (e.g. foetal development, childhood exposition).¹⁰⁹ IL-33 is a pleiotropic alarmin, which is released after stress and mechanical damage,¹³⁹ hence tissue-specific blockade of IL-33 in asthmatic individuals through DNA-me might be a biologically relevant and efficient therapeutic tool.

We also reported that *IL1RL1* is expressed in human BECs. IL-1RL1 is expressed on several target cells such as T_H2 lymphocytes, mast cells, type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) and eosinophils,¹⁴⁰ and its expression on airway epithelial cells has only been reported in mice.¹⁴¹ Although we did not identify an asthma-associated DNA-me signature for *IL1RL1*, the potential implication of epigenetic modifications in the regulation of epithelial *IL1RL1* expression cannot be ruled out as not all the CpG dinucleotide sites within the gene had been epigenotyped. It may be of particular interest to measure other CpG sites as the gene has many alternative splicing sites including a second promoter region for the soluble form, which has an inhibitory function on *IL33*.¹⁴² Furthermore, other DNA regions upstream of the *IL1RL1* promoter are likely to regulate transcriptional activities since an enhancer has been identified within this locus (i.e. chr2:102335866-102336151, GRCh38, ENCODE data) and may associate with DNA-me levels.¹⁴³ To better assess the presence of a retro-activation or retro-inhibition loop involving

IL33 and *IL1RL1*, it should be interesting to document *IL1RL1* expression by other cell types as tissue-infiltrating immune cells (T_H2 lymphocytes, mast cells, etc.)¹⁴⁰ and to differentiate between the expression of its membrane-bound and soluble forms.¹⁴² Epithelial regulation of *IL1RL1* release and retro-action on *IL33* is crucial to better define, notably because several genetic variants within these genes have been previously associated to asthma pathogenesis and exacerbation, underscoring their pivotal roles.^{2,105,144,145} Together, these observations highlight the need to better understand the epigenetic regulation of *IL1RL1* and how these changes may increase the T_H2 inflammation in asthma.

We also reported asthma-associated epivariations within the promoter of *CCL26*. We showed that DNA-me levels were lower in asthmatic BECs. The roles of *CCL26* in the physiopathology of asthma have been widely studied; including our previous report that *CCL26* gene expression was negatively correlated with pulmonary function and positively with asthma severity and sputum eosinophil counts.^{80,83,85} *CCL26* also stimulates eosinophil reactive oxygen species and cationic protein releases, both are associated with severe airway epithelium damages in asthmatic patients.⁸⁰ It is known that *CCL26* secretion is mediated by pro-inflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-13 and IL-33) and the TF signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6);⁸⁰⁻⁸² however, less is known about the regulation of its gene expression. In patients with eosinophilic esophagitis, another allergic inflammatory disease, lower *CCL26* DNA-me and higher gene expression levels have been found in patients' epithelial cells, suggesting that epigenetic modifications regulate transcriptional activities.¹⁴⁶ Nevertheless, further work will be needed to determine if DNA-me is one of the underlying mechanisms involved in the regulation of *CCL26* release by the airway epithelium.

Abnormal gene expression of key players (e.g. *IL33* and *IL1RL1*) involved in the T_H2 inflammatory response have been found to associate with asthma pathogenesis and exacerbation,¹⁴⁷ and our finding of an association between a haplotype within *IL33* and DNA-me levels at asthma-associated epivariations (CpG site 1 and CpG sites 2-3-4) within the promoter region suggests an interplay between epigenetic and genetic modifications in asthmatic airways. These SNPs were not associated with asthma in BEC samples. However, the analysis in a larger French-Canadian cohort (the SLSJ cohort) shown an association for two of the three SNPs (the third one was filtered out during quality check). Whether a SNP far from the epivariations could have a biological impact is unclear.^{148,149} We speculate that a haplotype (formed by

chr9:6210100, rs928413 and rs7848215 variants) may interact with DNA-me at the promoter of *IL33* and together modulate the asthma risk (i.e. risk effect of the mutative allele). DNA-me mediates gene expression mainly through blocking the access of TFs to their binding sites^{150,151} and we identified several binding motifs for proteins such as GATA1, GATA3 and CTCF, which have been found to associate with immune response and/or asthma. For example, GATA1 and GATA3 are involved in the promotion of T_H2 cytokines expression whereas CTCF mediates the innate immune response in murine models.¹⁵²⁻¹⁵⁴ These results highlight the probable interactions between genetic and epigenetic modifications and that they synergistically modulate asthma pathogenesis.

The use of primary bronchial cells in this study is biologically relevant given that epithelial damages in the airways are a characteristic feature of asthma. DNA-me and gene expression could be stable among several tissues or can be tissue-specific or cell-type-specific.⁸⁶ This particularity motivate the use of tissues or cell types directly involved in the pathophysiology studied instead of whole blood samples for example. However, the invasive sampling method and the fastidious laboratory work to obtain BECs limited our sample size and reduced the statistical power of the study. However, in terms of the effect size,¹⁵⁵ all significant results had a large Cohen's effect size ($d > 0.8$); suggesting a biological relevance of our findings. When we investigated the TF binding sites motifs near the asthma-associated epivariations, we identified a motif for CTCF, an insulator generally associated to alternative splicing.¹⁵⁶ Hence, further work will be needed to better understand the mechanisms underlying the interaction between DNA-me and TF binding. In addition, we used quantitative pyrosequencing validated for its robustness and reproducibility with documented correlation between replicate of $r = 0.996$ and between laboratories of $r = 0.98$.¹⁵⁷

In summary, our findings suggest that *IL33* and its downstream target molecule *CCL26* modulate asthma risk through DNA-me and their subsequent gene expression. There is evidence of interplay between genetic variants and epigenetic modifications which impact on the asthma risk through a fine-tuning of gene expression. These results underline the need to combine epigenetic and genetic analyses to better understand asthma pathogenesis, especially its severity and the role of airway epithelium.

2.7. Patients and methods

BEC samples

A total of 20 cell lines were used for the study of which 10 were from asthmatic individuals and 10 from healthy subjects.⁸⁵ All subjects were never-smokers. Asthmatic subjects may be atopic if the allergy skin test indicated positive to at least one common allergen. The healthy individuals had no history of asthma, atopy or other inflammatory disease and had a PC₂₀ value >16mg/mL. Asthmatic patients had a history of asthma for at least 6 months. The degree of asthma severity was based on symptomatology and medications used according to the American Thoracic Society criteria.¹⁵⁸ Mild asthmatic patients (n=6) were treated with β_2 -agonists when needed and showed normal FEV₁. Severe asthmatic patients (n=4) with eosinophilia were treated with both β_2 -agonists and corticosteroids (>1000 μ g of fluticasone propionate or equivalent in combination with a long-acting β_2 -agonist) and showed an induced sputum eosinophil count >5% and a sputum neutrophil count \leq 64%. Bronchial biopsies were obtained from participants with no recent airway infection (8 weeks) by flexible bronchoscopy at the *Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec* (IUCPQ) and BEC isolation and cell culture were performed as previously described.^{85,159} Cells were used at maximum passage three. This study was approved by the *Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux (CIUSSS) du Saguenay–Lac-Saint-Jean* and the IUCPQ Human Ethic Committees. All participants gave their informed consent.

DNA methylation quantification in BECs

CpG sites in respective regions of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* (Figure 1) were investigated. CpG sites located in the promoter (i.e. CpG sites 1 to 4 for each gene) were within 1kb upstream of transcription start site (TSS) (GRCh38). CpG sites 5 to 7 in *IL1RL1* were within 1kb upstream of the TSS for the soluble form of the IL-1RL1 protein. Primers were selected using the PyroMark Assay Design Software (v2.0.1.15; Qiagen) (Table 3). DNA was extracted from BECs according to the Blood & Cell Culture Midi Kit guidelines (Qiagen, cat. # 13343). Two micrograms of DNA were treated with sodium bisulfite using EpiTech Bisulfite Kit (Qiagen, cat. # 59104) following manufacturer's instructions. Bisulfite-treated DNA was then amplified with Pyromark PCR kit (Qiagen, 978703) and the cytosine methylation rates were assessed by bispyrosequencing using the PyroMark Q24 Advanced kit and PyroMark Q24 software v2.0.6 (Qiagen).

Expression study

Total RNA was extracted from cultured BECs with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). RNA concentrations and qualities were determined with the Experion automated electrophoresis station (BioRad). The messenger RNA (mRNA) was converted into complementary DNA (cDNA) with a reverse transcription using the qScript™ cDNA SuperMix (QuantaBio, cat. # 95048-500). The mRNA relative levels of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* were measured by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using TaqMan technology on Corbett Rotorgene (Thermo Fisher Scientific). The PerfeCTa® qPCR FastMix® was used (QuantaBio, cat. # 95076-012). We tested all primers for efficiency with a dilution series and all of them gave a 100% amplification efficiency. 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 twice. The relative expressions of *IL33* and *CCL26* were normalized on peptidylpropyl isomerase A (*PPIA*), ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (*RPLP0*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) whereas only *GAPDH* was used as a reference gene for *IL1RL1*. All genes have been shown to be stable in epithelial cells.^{160,161}

Genetic analyses

According to the methylation results, sequencing of the promoter regions (i.e. about 1kb upstream of TSS) of *IL33* (chr9:6,214,109-6,215,150) and *CCL26* (chr7:75,789,746:75,790,818) were performed. In addition, we sequenced the regions containing SNPs (rs928413 and rs992969) within *IL33*, which have been reported to associate with asthma.^{2,162} A total of three sites in *IL33* and one site in *CCL26* were sequenced. Primers were selected using Primer3 software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Table 3). Amplicons were generated from 100ng of genomic DNA from BECs and amplified using KAPA2G Fast HotStart PCR Kit (Sigma-Aldrich, cat. # KK5530) and sequenced with the Sanger method (3730xl DNA Analyzer technology; ThermoFisher Scientific) at the *Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes (Centre de recherche du centre hospitalier universitaire de Québec, Québec, Canada)*. SNPs were detected with the Variant Reporter Software 2 (ThermoFisher Scientific).

Linkage disequilibrium was measured with data from GWAS (Illumina 610 quad array) using another French-Canadian population from Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) to increase the sample size.¹⁶³ A region of 150kb including significant SNPs was analyzed using the Haploview software (Haploview, <https://www.broadinstitute.org/>) and haplotype blocks were described with

linkage disequilibrium coefficient (D'). This same population was used to test association of the 10 *IL33* SNPs and asthma. Briefly, imputations were performed in two steps with Shapeit 2^{164,165} for the pre-phasing step and Impute 2¹⁶⁶ for the imputation. Data from the 1000 Genomes Project (Phase 3) and UK10K project were used as references for the imputation. Dosage data with $\geq 90\%$ probability were converted into genotype calls. SNPs fulfilling these criteria were used for the analysis: minor allele frequency $\geq 1\%$, genotype call rate $\geq 95\%$, individual call rate $\geq 95\%$ and Hardy-Weinberg p value ≥ 0.0001 . Analyses were performed using MFQLS, a quasi-likelihood score test that allows the analysis of related individuals and implemented in WISARD (<http://statgen.snu.ac.kr/wisard/>) using age and sex as covariates.

Identification of potential binding motifs

Potential transcription factor (TF) binding sites in the promoter area of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* genes were investigated using the Genomatix software (MatInspector, <http://www.genomatix.de>)¹⁶⁷ and TFBIND software (TFBIND, <http://tfbind.hgc.jp/>). These software programs use a position weight matrix to identify potential binding sites for TF according to the similarity of the weight matrix from the database TRANSFAC R.3.4. TF binding sites relevant to immunity and inflammation were considered when ≥ 0.95 matrix similarity was obtained.

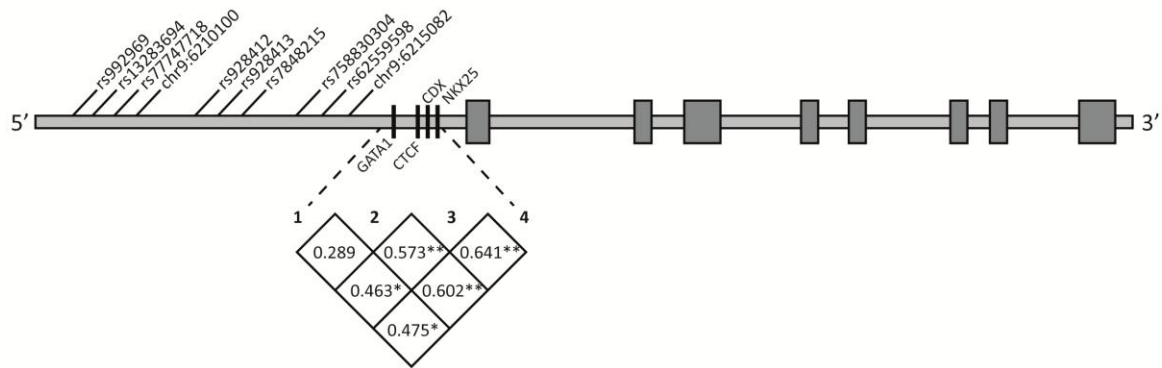
Statistical analyses

Normal distribution of each variable was assessed using Shapiro-Wilk tests. Phenotypic differences between groups for continuous data were assessed by one-way ANOVA or Kruskal-Wallis according to Shapiro-Wilk test results and Fisher exact test for dichotomous data. Spearman's correlation coefficients between *IL33* CpG sites 1 to 4, *IL1RL1* CpG sites 1 to 7 and *CCL26* CpG sites 1 to 4 were obtained and correlated CpG sites within a gene were further analyzed as a mean when $r > 0.5$ and $p < 0.05$.

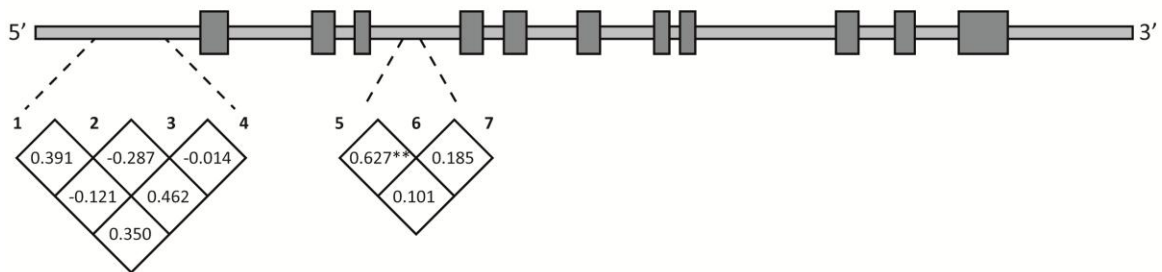
Generalized linear regression models were used to investigate the association between both DNA-me or mRNA levels and history of asthma, with age, sex and age*sex as covariates as these factors have been reported to associate with asthma¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ and that they are different between the phenotypic groups in this study. The same approach was used to investigate association between DNA-me or mRNA with FEV₁. Associations between DNA-me or mRNA levels and asthma severity were further tested using ANOVA or Kruskal-Wallis followed by

post-hoc tests (Tukey or Mann-Whitney respectively) when needed and Spearman's correlation test was used for their correlation with blood cell counts. Genotypic associations with asthma were done with Fisher exact test, whereas associations with DNA-me and mRNA levels were investigated with Student t tests or Mann-Whitney tests according to Shapiro-Wilk test results. The results were considered significant when $p < 0.05$ (two-sided). Lastly, Cohen's effect sizes (d) were calculated for significant analyses when applicable (when comparing mean between groups). Statistical analyses were performed with SPSS software v11.5.0 (IBM).

IL33



IL1RL1



CCL26

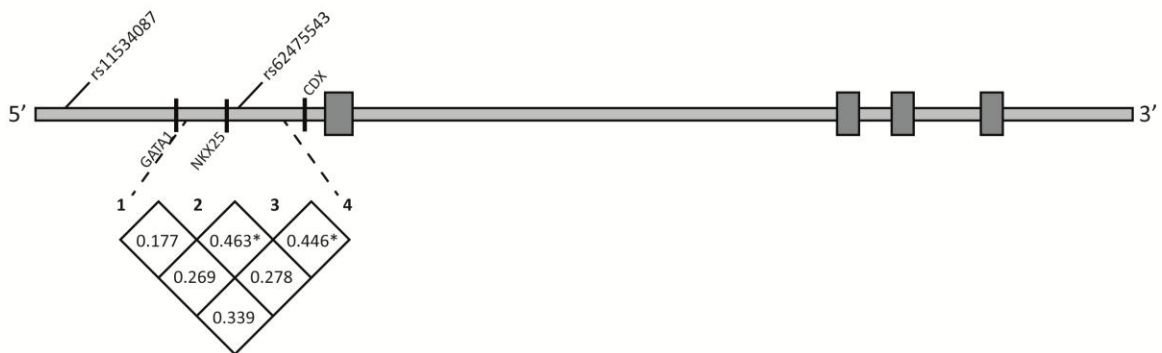


Figure 1. Schematic representation of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26*. Gene exons are represented by grey rectangles, sequenced polymorphisms in *IL33* and *CCL26* are identified with their respective rs numbers or their localisation in base pairs, binding sites for transcription factors are identified by black thick lines in the epigenotyped region and each area of epigenotyped regions are bordered by dotted lines. Correlations between CpG sites were assessed by Spearman's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

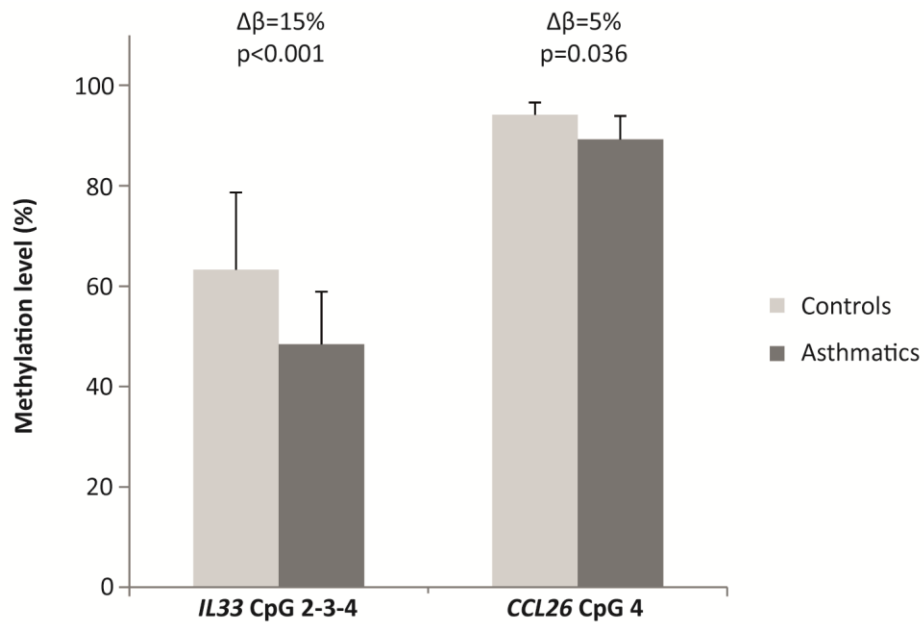


Figure 2. Difference in mean DNA methylation levels ($\Delta\beta$) at *IL33* CpG sites 2-3-4 and *CCL26* CpG site 4 between control and asthmatic individuals. Light bars represent BECs from the control group and dark bars from the asthmatic group. Results were analyzed using generalized linear model with age, sex and age*sex as covariates and results were considered significant when $p<0.05$.

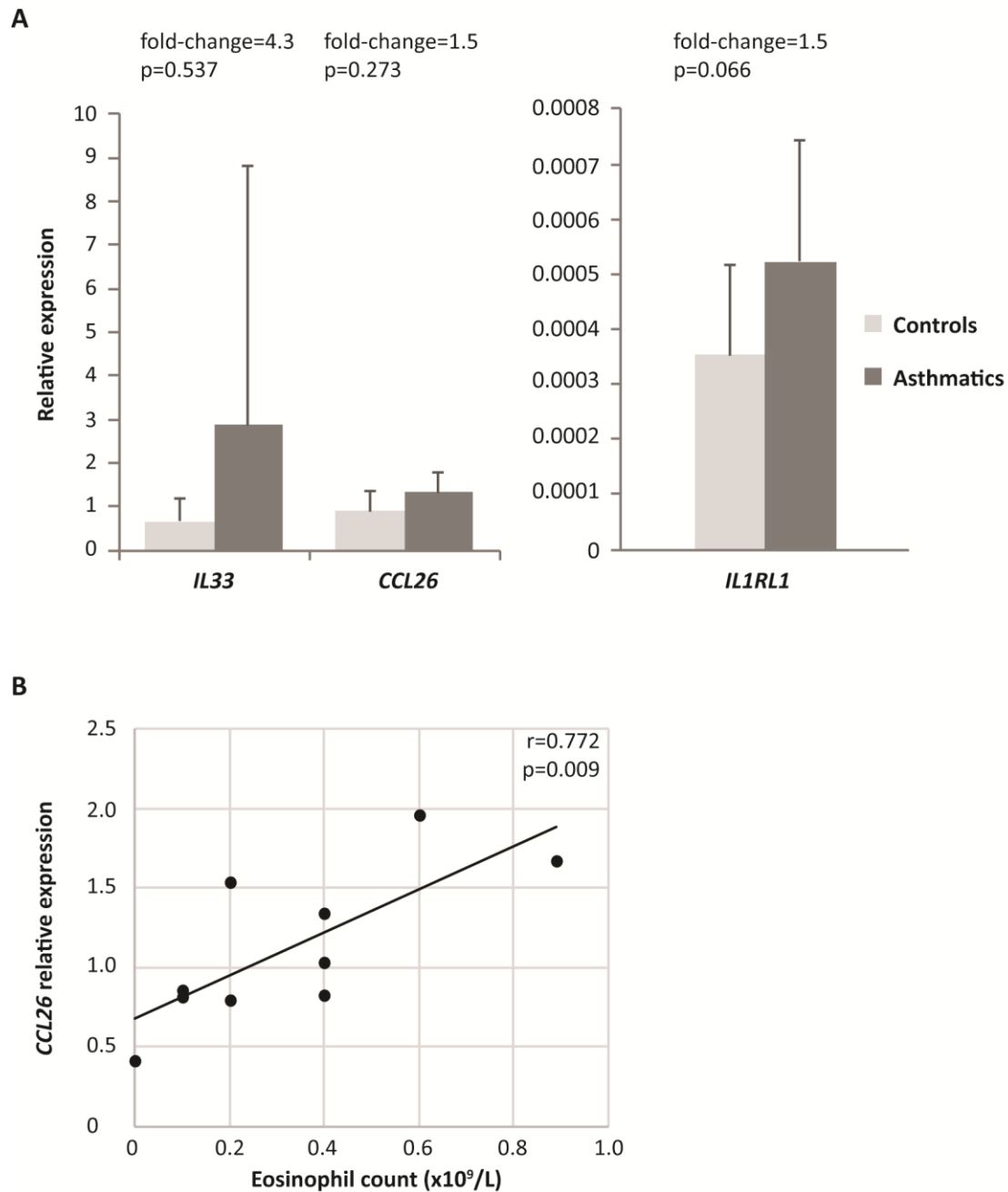


Figure 3. mRNA expression levels of *IL33*, *IL1RL1* and *CCL26* A) in control and asthmatic individuals and B) the correlation between *CCL26* and eosinophil counts in billion per liter ($\times 10^9/L$). In Figure 3A, pale bar represents the expression levels in bronchial epithelial cells from the control group and dark bar from the asthmatic group. The mRNA levels were analyzed with generalized linear model using age, sex and age*sex as covariates and results were significant when $p < 0.05$. In Figure 3B, correlation between mRNA levels and eosinophil counts was analyzed by Spearman's test and result was considered significant when $p < 0.05$.

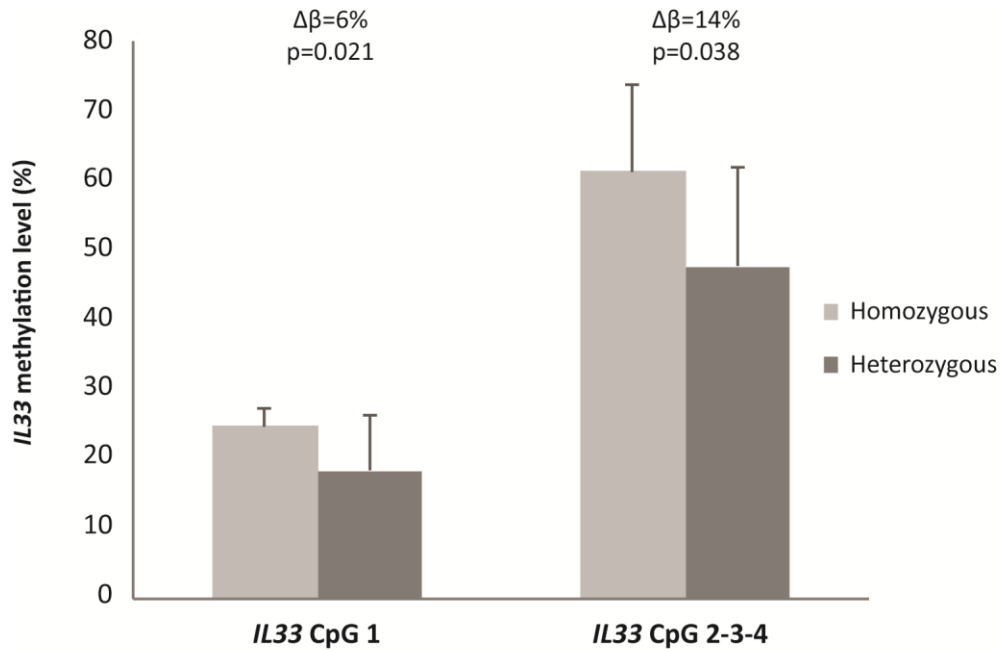


Figure 4. Association between DNA methylation levels and a haplotype (formed by chr9:6210100, rs928413 and rs7848215) within *IL33*. Mean methylation levels for CpG site 1 and sites 2-3-4 were measured and association with a 3 SNP haplotype was assessed (homozygous for frequent allele of the haplotype or heterozygous for all SNPs of the haplotype) considering all individuals and using a Student t tests. Results were considered significant when $p < 0.05$.

Table 1. Polymorphisms identified in analyzed DNA sequences

Localisation ^a	Geno type	rs	Association	p-value asthma ^b		p-value DNA-me ^c	
				20 BEC samples	SLSJ cohort	<i>IL33</i> CpG 1	<i>IL33</i> CpG 2-3-4
<i>IL33</i>							
chr9:6209697	GG/AG	rs992969	Asthma ¹⁶²	0.350	0.020	0.023	0.119
chr9:6209755	AA/AG	rs13283694		0.211	0.583	0.688	0.848
chr9:6210009	AA/AG	rs77747718		NA	NA	NA	NA
chr9:6210100	CC/CT	Unidentified		0.650	NA	0.021	0.038
chr9:6213148	GG/AG	rs928412	Asthma ²	0.350	0.039	0.023	0.119
chr9:6213387	AA/AG	rs928413		0.650	0.031	0.021	0.038
chr9:6213468	CC/CT	rs7848215	Alzheimer ¹⁷¹	0.650	0.022	0.021	0.038
chr9:6214300	GG/GC	rs758830304		NA	NA	NA	NA
chr9 :6214347 ^d	TT/CT/CC	rs62559598		0.370	NA	0.793	0.230
chr9:6215082	TT/AT	Unidentified		NA	NA	NA	NA
Small haplotype chr9: 6210100; rs928413; rs7848215				0.650	NA	0.021	0.038
Big haplotype rs992969, chr9:6210100, rs928412, rs928413 and rs7848215				0.350	NA	0.022	0.074
<i>CCL26</i>^e							
chr7:75790782	TT/CC	rs62475543		NA	NA	NA	NA
chr7:75790818	GG/GA	rs11534087		NA	NA	NA	NA

^agenomic localisations from build GRCh38; ^bp-values are results of Fisher exact tests for the 20 bronchial epithelial cell (BEC) samples and of MFQLS analyses with age and sex as covariates for the Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) cohort; ^cp-values are results of Student's t tests for DNA-me quantitative data; ^dgenotypes CT and CC were grouped for the analysis as only one individual has the CC genotype; ^eanalyses were not performed with *CCL26* polymorphisms as sequences of good quality have only been obtained for 11 samples.

1. Li X, Hastie AT, Hawkins GA, et al. eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes. *Allergy*. 2015 Oct;70(10):1309-18.
2. Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH, et al. Decoding asthma: translating genetic variation in *IL33* and *IL1RL1* into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Mar;131(3):856-65.
3. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, et al. Transcriptomic and genetic studies identify *IL-33* as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2009 Nov;14(11):1004-16.

Table 2. Clinical characteristics of the individuals who provided the primary BEC lines

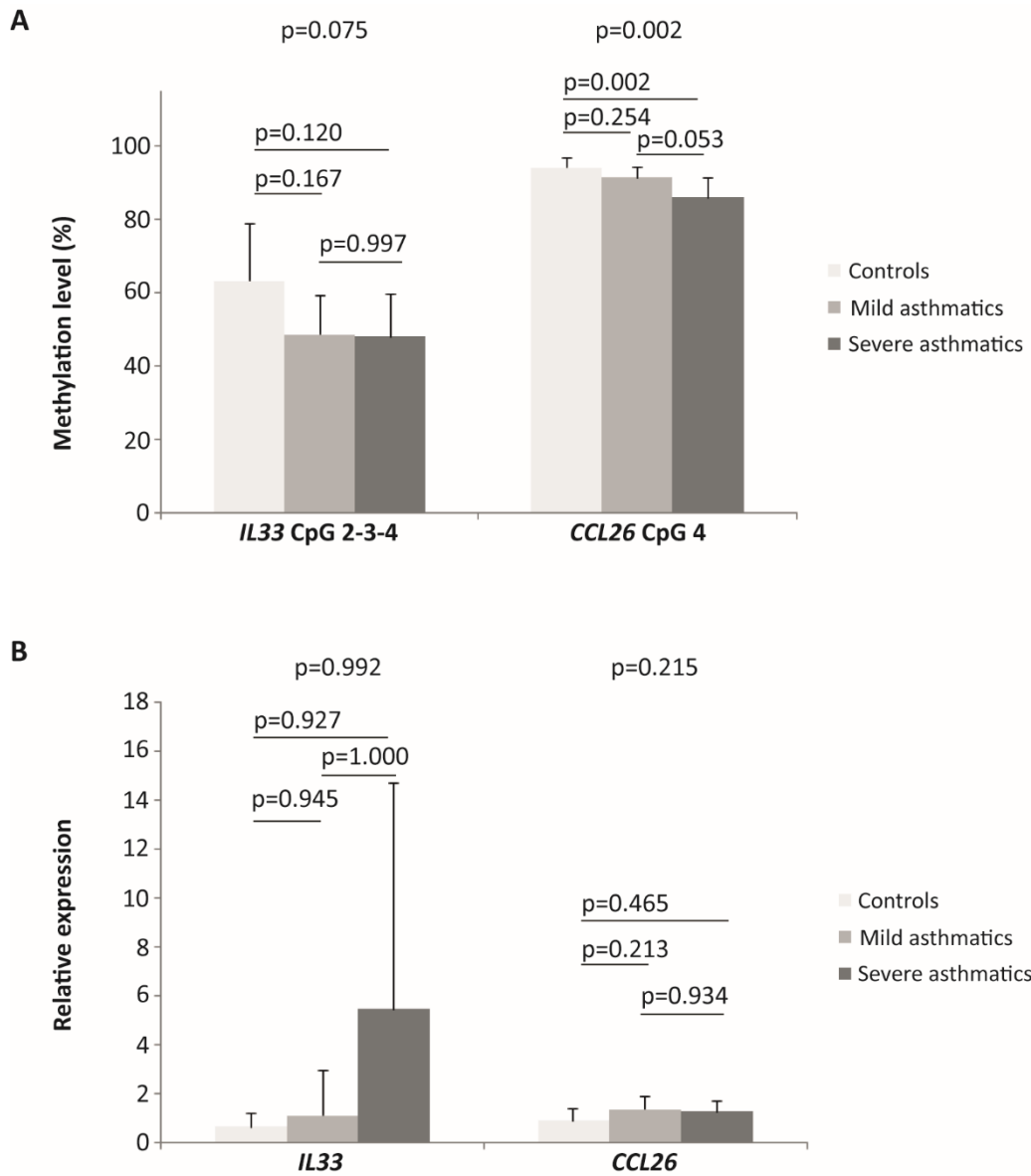
Subjects	Age, mean (range) ¹	Sex ratio (M/F) ¹	Atopy, n (%) ²	FEV ₁ , % pred, mean (sd) ³	PC ₂₀ , mg/mL, mean (sd) ⁴	Blood cell counts ⁵				
						Neutrophils x10 ⁹ /L, mean (%)	Lymphocytes x10 ⁹ /L, mean (%)	Monocytes x10 ⁹ /L, mean (%)	Eosinophils x10 ⁹ /L, mean (%)	Basophils x10 ⁹ /L, mean (%)
Healthy control subjects	30 (21-50) ^c	6/4	0 (0)	101 (13) ^c	97.4 (1.9) ^b	3.2 (55.6)	2.0 (34.0)	0.4 (6.9)	0.2 (3.1)	0.0 (0.4)
Patients with mild asthma	23 (20-26) ^c	0/6	6 (100)	93 (7) ^c	0.8 (3.9) ^a	4.7 (57.9)	2.4 (29.9)	0.6 (7.6)	0.3 (3.9)	0.1 (0.7)
Patients with severe eosinophilic asthma	63 (62-64) ^{a,b}	2/2	3 (75)	65 (9) ^{a,b}	NA	5.2 (62.0)	2.1 (23.3)	0.8 (7.1)	0.5 (5.2)	0.0 (0.2)

¹ Age and sex data were available for 10 controls, 6 mild asthmatics and 4 severe asthmatics, ² atopy was defined as individuals responding positively (wheal diameter \geq 3mm at 10 minutes) to at least one common allergen at skin prick test and data were available for 9 controls, 6 mild asthmatics and 4 severe asthmatics, ³ forced expiratory volume in 1 second (FEV₁) was available for 9 controls, 5 mild asthmatics and 4 severe asthmatics, ⁴ geometric mean for provocative methacholine concentration causing 20% fall in FEV₁, was available for 10 controls, 6 mild asthmatics and none severe asthmatics, ⁵ blood cell count data were available for 4 controls, 4 mild asthmatics and 4 severe asthmatics. Letters indicate significant differences between phenotypic groups (a: difference with the healthy control group, b: difference with the mild asthma group and c: difference with the severe eosinophilic asthma group). Differences have been calculated for relative cell counts.

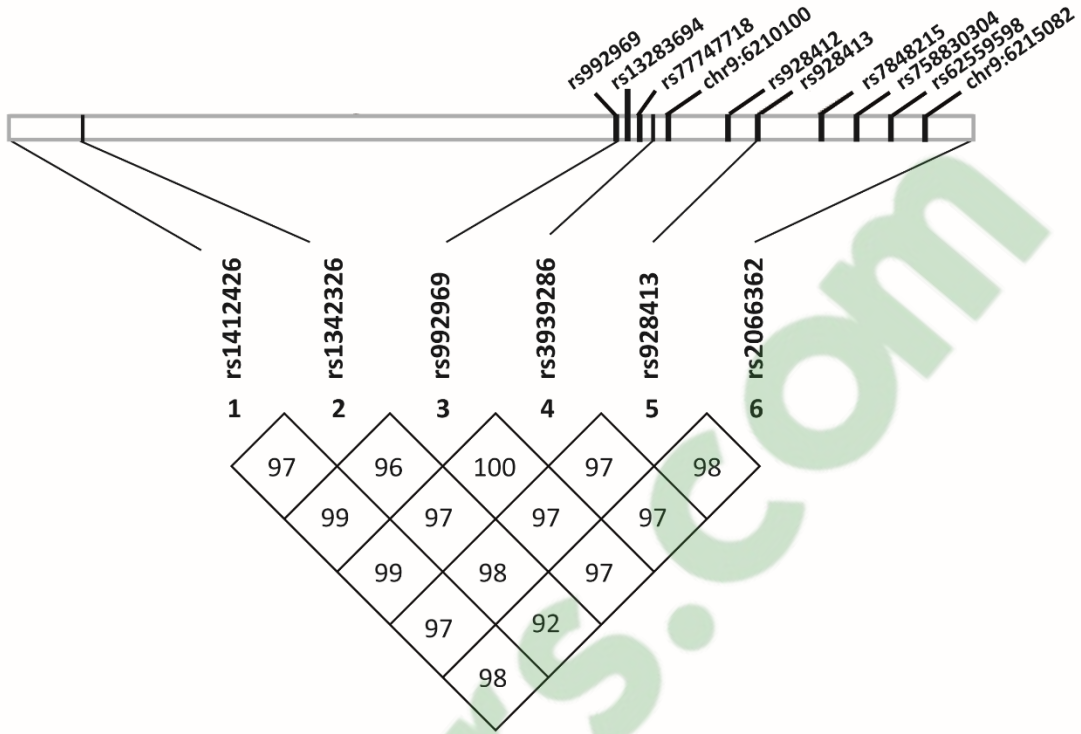
Table 3. Primers designed for the study of DNA methylation and DNA sequencing

<i>DNA methylation</i>			
Region^a	Forward^b	Reverse^b	Sequencing^c
<i>IL33</i>			
CpG1	5'-ATGTGGAATTAGTTTAAGTTTTAAAAGAGT-3'	5'-CTTCTTACCTCATAAAAAATTTTACTCC-3'	5'-TTTTTTTATTTTTTGTCTATAGATGTTAA-3'
CpG2	5'-AGAGGGTGAGTAGGAGTAAA-3'	5'-TCCTAATCCCCACTATTCATCTTTTCTTTC-3'	5'-ATTTGTTTTTGTGATAAAGTATTAT-3'
CpG3	5'-GTTGGAATATAGAGTATTTTAGAGTTTTTA-3'	5'-TATATTCACTTTTAACCCCTAACTTCTAATTTACAAAC-3'	5'-ATAGGTTAAAGGGGGT-3'
CpG4	5'-AGAGTTAAAAATATAAAGTTTAGGGGTAG-3'	5'-AAATTTAACAAAAACCCAAATTACCT-3'	5'-AAAATATTTAGATGGAGGG-3'
<i>IL1RL1</i>			
CpG1-3	5'-GGTTATTTAGGGTATGTGGAAAAAGTTTAG	5'-CCTCACTATATCACCCAAACTAAAA-3'	5'-AGTTTGGTGTATATTTAAG-3'
CpG4	5'-GGGAGAATGTGGTAAAAATTGAA-3'	5'-CTTTAAAAACCTCCCATTTTCTTATC-3'	5'-AAGTTAATATTTGTTAATAGTGTGA-3'
CpG5-7	5'-GGAGTTTTTTTGAGTGGTGGTTG-3'	5'-ATTTCCCTCTATTTTAAAATCAACTTCTC-3'	5'-GAAAGGTAGTTTTTAGGTT-3'
<i>CCL26</i>			
CpG1	5'-GGTTGGTTTTGAAATTTTGAATTTTATGTA-3'	5'-AACTCACACCAATAATCCCAACTATA-3'	5'-GAATTTTTGATTTTTAGTGATTG-3'
CpG2	5'-GGAGTGTAGTGGAGTAATTTTGGTTTAT-3'	5'-TCACACCAATAATCCCAACTATA-3'	5'-GGTTAATTTTTGTATTTTAAATAGA-3'
CpG3-4	5'-GGGAGAGAGTTGGGGAAGA-3'	5'-CTCCCATCCCACAAATTACCT-3'	5'-GGAGGGAGGGAGAAT-3'
<i>DNA sequencing</i>			
Region^a	Forward^b	Reverse^b	Sequencing^c
<i>IL33</i>			
rs992969	5'-CTACAGGCCTTTTAGACTCTGCTC-3'	5'-GATAACAACAACCCACTACAAGCA-3'	Same primers
rs928413	5'-CCCATATACCTTGCATCTACCC-3'	5'-TGTCTTTCATTCCCACAACAC-3'	Same primers
1kb upstream TSS	5'-AGGGGGACAAAATAGCAGAGAA-3'	5'-CAAGCCATAGTGTTCATTTGT-3'	Same primers
1kb upstream TSS	5'-GCAACACTATGGCTTGTAGCAG-3'	5'-CATCTCAAAAATCTCGCAGAAG-3'	Same primers
<i>CCL26</i>			
1kb upstream TSS	5'-CAGCAGAAGCCATTTATAGACAGA-3'	5'-CTTTTTCTTTTCTTTCAGTGGTG-3'	Same primers

^aCpG sites, single nucleotide polymorphism (SNP) or gene promotor regions (1 kb upstream transcription start site (TSS)) selected for pyrosequencing or sequencing analyses; ^bforward and reverse primers designed for the PCR step; ^cprimer designed for the sequencing step.



Supplementary figure 1. Severity-dependant association between DNA methylation levels and mRNA levels. **A.** Mean DNA methylation levels for *IL33* CpG2-3-4 and *CCL26* CpG4 were compared between controls, mild asthmatics and severe asthmatics. **B.** Expression levels in controls and mild asthmatics and severe asthmatics for *IL33* and *CCL26*. Results were analyzed by ANOVA with Tukey’s post-hoc tests for *CCL26* and by Kruskal-Wallis with Mann-Whitney post-hoc tests for *IL33* and considered significant when $p < 0.05$.



Supplementary figure 2. Representation of the haplotype block including the ten SNPs identified in the *IL33* promoter region (on top of figure). Among them, the five SNPs (rs992969, chr9:6210100, rs928412, rs928413 and rs7848215) associated with *IL33* DNA methylation. Linkage disequilibrium was assessed using data from a GWAS performed on the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma familial cohort. A 30kb block including six SNPs from the GWAS and all ten SNPs identified in this study was identified (coefficients (D') over 92).

Supplementary table 1. Association between *IL33* gene expression and SNPs identified in the bronchial epithelial cell samples

Localisation ^a	Genotype	rs	Association	p-value <i>IL33</i> expression ^b
chr9:6209697	GG/AG	rs992969	Asthma ¹⁶²	0.462
chr9:6209755	AA/AG	rs13283694		0.669
chr9:6210009	AA/AG	rs77747718		NA
chr9:6210100	CC/CT	Unidentified		0.669
chr9:6213148	GG/AG	rs928412	Asthma ²	0.462
chr9:6213387	AA/AG	rs928413		0.669
chr9:6213468	CC/CT	rs7848215	Alzheimer ¹⁷¹	0.669
chr9:6214300	GG/GC	rs758830304		NA
chr9 :6214347 ^c	TT/CT/CC	rs62559598		NA
chr9:6215082	TT/AT	Unidentified		NA
Small haplotype chr9:6210100;rs928413;rs7848215				0.669
Big haplotype chr9: rs992969, 6210100, rs928412, rs928413 and rs7848215				NA

^agenomic localisations from build GRCh38; ^bp-values are results of Mann-Whitney analyses; ^cgenotypes CT and CC were grouped for the analysis as only one individual has the CC genotype.

1. Li X, Hastie AT, Hawkins GA, et al. eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes. *Allergy*. 2015 Oct;70(10):1309-18.
2. Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH, et al. Decoding asthma: translating genetic variation in *IL33* and *IL1RL1* into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Mar;131(3):856-65.
3. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, et al. Transcriptomic and genetic studies identify *IL-33* as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2009 Nov;14(11):1004-16.

2.8. References

1. Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc.* 2009 Dec;6(8):678-82.
2. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med.* 2012 May 4;18(5):684-92.
3. Lambrecht BN, Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Sep;134(3):499-507.
4. Lloyd CM, Saglani S. Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2015 Jun;34:52-8.
5. Gandhi VD, Vliagoftis H. Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Front Immunol.* 2015;6:147.
6. Saluja R, Khan M, Church MK, et al. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy.* 2015;5:33.
7. Prefontaine D, Nadigel J, Chouiali F, et al. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Mar;125(3):752-4.
8. Tsicopoulos A, de Nadai P, Glineur C. Environmental and genetic contribution in airway epithelial barrier in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013 Oct;13(5):495-9.
9. Ahmadi Z, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, et al. An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis. *Inflammation.* 2016 Feb 9.
10. Jeong J, Kim YJ, Yoon SY, et al. PLAG (1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-3-Acetyl-rac-Glycerol) Modulates Eosinophil Chemotaxis by Regulating CCL26 Expression from Epithelial Cells. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151758.
11. Kazuyuki C, Akihiro T, Ryo A, et al. IL-33 Induces CCL26 From Primary Human Distal Bronchial Epithelial Cells. C31. INTERLEUKIN-33 BIOLOGY. American Thoracic Society International Conference Abstracts: American Thoracic Society; 2011. p. A4265-A4265.
12. Grotenboer NS, Ketelaar ME, Koppelman GH, et al. Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Mar;131(3):856-65.
13. Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev.* 2011 Jul;242(1):10-30.
14. Ullemar V, Magnusson PK, Lundholm C, et al. Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy.* 2016 Feb;71(2):230-8.
15. Savenije OE, Mahachie John JM, Granell R, et al. Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jul;134(1):170-7.
16. Chibana K, Takemasa A, Arai R, et al. IL-33 Induces CCL26 From Primary Human Distal Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2011;183.
17. Larose MC, Chakir J, Archambault AS, et al. Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Oct;136(4):904-13.
18. Provost V, Larose MC, Langlois A, et al. CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol.* 2013 Aug;94(2):213-22.
19. Shin HD, Kim LH, Park BL, et al. Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet.* 2003 Jun 01;12(11):1279-85.
20. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell.* 1999 Nov 24;99(5):451-4.

21. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000 Oct;9(16):2395-402.
22. Lee DU, Agarwal S, Rao A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity.* 2002 May;16(5):649-60.
23. White GP, Watt PM, Holt BJ, et al. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and Non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO(-) T cells. *Journal of Immunology.* 2002 Mar 15;168(6):2820-2827.
24. Jones B, Chen J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J.* 2006 Jun 7;25(11):2443-52.
25. Kumar RK, Hitchins MP, Foster PS. Epigenetic changes in childhood asthma. *Dis Model Mech.* 2009 Nov-Dec;2(11-12):549-53.
26. van Panhuys N, Le Gros G, McConnell MJ. Epigenetic regulation of Th2 cytokine expression in atopic diseases. *Tissue Antigens.* 2008 Aug;72(2):91-7.
27. Runyon RS, Cachola LM, Rajeshuni N, et al. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e48796.
28. Gagne-Ouellet V, Guay SP, Boucher-Lafleur AM, et al. DNA methylation signature of interleukin 1 receptor type II in asthma. *Clin Epigenetics.* 2015;7:80.
29. Soto-Ramirez N, Arshad SH, Holloway JW, et al. The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clin Epigenetics.* 2013 Jan 03;5(1):1.
30. White GP, Hollams EM, Yerkovich ST, et al. CpG methylation patterns in the IFN-gamma promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006 Dec;17(8):557-64.
31. Kwon NH, Kim JS, Lee JY, et al. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol.* 2008 Mar;28(2):139-46.
32. Barton SJ, Ngo S, Costello P, et al. DNA methylation of Th2 lineage determination genes at birth is associated with allergic outcomes in childhood. *Clin Exp Allergy.* 2017 Jul 30.
33. Brugha R, Lowe R, Henderson AJ, et al. DNA methylation profiles between airway epithelium and proxy tissues in children. *Acta Paediatr.* 2017 Aug 18.
34. Stefanowicz D, Hackett TL, Garmaroudi FS, et al. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One.* 2012;7(9):e44213.
35. Moussette S, Al Tuwaijri A, Kohan-Ghadr HR, et al. Role of DNA methylation in expression control of the IKZF3-GSDMA region in human epithelial cells. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172707.
36. Scantamburlo G, Vanoni S, Dossena S, et al. Interleukin-4 Induces CpG Site-Specific Demethylation of the Pendrin Promoter in Primary Human Bronchial Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(4):1491-1502.
37. Nicodemus-Johnson J, Myers RA, Sakabe NJ, et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight.* 2016 Dec 08;1(20):e90151.
38. Nicodemus-Johnson J, Naughton KA, Sudi J, et al. Genome-Wide Methylation Study Identifies an IL-13-induced Epigenetic Signature in Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 Feb 15;193(4):376-85.
39. Holgate ST. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev.* 2011 Jul;242(1):205-19.
40. Heyn H. A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front Genet.* 2014;5:113.
41. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med.* 2010 Sep 23;363(13):1211-21.

42. Poon AH, Eidelman DH, Martin JG, et al. Pathogenesis of severe asthma. *Clin Exp Allergy*. 2012 May;42(5):625-37.
43. Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3472-80.
44. Bouffi C, Rochman M, Zust CB, et al. IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF-kappaB-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J Immunol*. 2013 Oct 15;191(8):4317-25.
45. Hastie AT, Moore WC, Li H, et al. Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Jul;132(1):72-80.
46. Fowler SJ, Tavernier G, Niven R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Mar;135(3):822-4 e2.
47. Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. 2009 Jul 17;31(1):84-98.
48. Peine M, Marek RM, Lohning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2016 May;37(5):321-33.
49. Kurokawa M, Matsukura S, Kawaguchi M, et al. Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155 Suppl 1:12-20.
50. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:475.
51. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012 May 29;13(7):484-92.
52. Gordon ED, Palandra J, Wesolowska-Andersen A, et al. IL1RL1 asthma risk variants regulate airway type 2 inflammation. *JCI Insight*. 2016 Sep 08;1(14):e87871.
53. Queiroz GA, Costa RS, Alcantara-Neves NM, et al. IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. *Int J Immunogenet*. 2017 Apr;44(2):51-61.
54. Coleman JM, Naik C, Holguin F, et al. Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax*. 2012 Dec;67(12):1061-6.
55. Nakayama T, Watanabe Y, Oiso N, et al. Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol*. 2010 Dec 01;185(11):6472-9.
56. Lim E, Rothenberg ME. Demethylation of the human eotaxin-3 gene promoter leads to the elevated expression of eotaxin-3. *J Immunol*. 2014 Jan 01;192(1):466-74.
57. Choy DF, Modrek B, Abbas AR, et al. Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol*. 2011 Feb 01;186(3):1861-9.
58. Grundberg E, Meduri E, Sandling JK, et al. Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am J Hum Genet*. 2013 Nov 07;93(5):876-90.
59. Zhang H, Tong X, Holloway JW, et al. The interplay of DNA methylation over time with Th2 pathway genetic variants on asthma risk and temporal asthma transition. *Clin Epigenetics*. 2014;6(1):8.
60. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993 Apr;3(2):226-31.
61. Hu S, Wan J, Su Y, et al. DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife*. 2013 Sep 03;2:e00726.
62. Finotto S. T-cell regulation in asthmatic diseases. *Chem Immunol Allergy*. 2008;94:83-92.

63. Yang B, Wagner J, Damaschke N, et al. A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation. *PLoS One*. 2014;9(2):e88052.
64. Schaack J, Qiao LP, Walkiewicz MP, et al. Insertion of CTCF-binding sites into a first-generation adenovirus vector reduces the innate inflammatory response and prolongs transgene expression. *Virology*. 2011 Mar 30;412(1):136-145.
65. Salam MT, Zhang Y, Begum K. Epigenetics and childhood asthma: current evidence and future research directions. *Epigenomics*. 2012 Aug;4(4):415-29.
66. Sullivan GM, Feinn R. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ*. 2012 Sep;4(3):279-82.
67. Shukla S, Kavak E, Gregory M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*. 2011 Nov 03;479(7371):74-9.
68. consortium B. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat Biotechnol*. 2016 Jul;34(7):726-37.
69. Statement on Standards for the Diagnosis and Care of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma. *American Review of Respiratory Disease*. 1987 1987/07/01;136(1):225-244.
70. Chakir J, Dube J, Laviolette M, et al. Isolation and characterization of human airway fibroblasts in culture. *Methods Mol Med*. 2000;44:53-65.
71. Dommisch H, Winter J, Gotz W, et al. Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing. *Clin Oral Investig*. 2015 Mar;19(2):209-20.
72. He JQ, Sandford AJ, Wang IM, et al. Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J*. 2008 Sep;32(3):755-62.
73. Li X, Hastie AT, Hawkins GA, et al. eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes. *Allergy*. 2015 Oct;70(10):1309-18.
74. Laprise C. The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes Immun*. 2014 Apr;15(4):247-55.
75. Delaneau O, Marchini J, Zagury JF. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat Methods*. 2011 Dec 4;9(2):179-81.
76. O'Connell J, Gurdasani D, Delaneau O, et al. A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet*. 2014 Apr;10(4):e1004234.
77. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2009 Jun;5(6):e1000529.
78. Cartharius K, Frech K, Grote K, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005 Jul 1;21(13):2933-42.
79. Bjornson CL, Mitchell I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gend Specif Med*. 2000 Nov-Dec;3(8):57-61.
80. Meurer JR, George V, Subichin S, et al. Asthma severity among children hospitalized in 1990 and 1995. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2000 Feb;154(2):143-9.
81. Chen Y, Stewart P, Johansen H, et al. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol*. 2003 Feb;56(2):180-7.

3 - Chapitre 2 - Discussion générale

Cette section comprend des éléments de discussion plus approfondis que celle retrouvée dans l'article. En effet, un aperçu de l'évolution des modèles expérimentaux et des types d'approches sera présenté, les résultats de l'étude seront mis en relation avec des résultats antérieurs dans d'autres types cellulaires/populations d'étude, les limites seront exposées ainsi que les perspectives d'avenir mises en lumière par la présente documentation de la voie biologique de l'IL-33.

3.1. Modèles expérimentaux

Les premières études épigénétiques ont souvent été réalisées avec des modèles expérimentaux hétérogènes tels que le sang complet. Le sang complet d'individus était un choix privilégié vu la facilité d'obtention des échantillons en comparaison à d'autres tissus plus difficiles ou impossibles à atteindre. Par contre, l'utilisation de ce tissu dans les études ayant pour but de documenter une maladie affectant un autre tissu est controversée. En effet, l'interprétation des résultats doit être prudente et des validations strictes doivent être réalisées afin de tirer des conclusions significatives¹⁷².

Le sang est un modèle expérimental très hétérogène comportant plusieurs variétés de cellules, lesquelles se retrouvent en proportions variables d'un échantillon à l'autre. Comme la méthylation de l'ADN est spécifique au type cellulaire, le mélange hétérogène composant le sang présente différents profils de méthylation⁸⁶. Les différences de méthylation entre des individus atteints de la maladie à l'étude et des témoins peuvent donc être le résultat de la maladie en elle-même, ou des différentes distributions de chaque type cellulaire dans la composition sanguine. Des différences de méthylation peuvent même refléter le degré d'activation de certaines cellules immunitaires présentes dans le sang¹⁷². Afin de contrer ces désavantages dans un modèle hétérogène comme le sang complet, il est possible d'effectuer des corrections statistiques, mais celles-ci requièrent les données brutes concernant la proportion de chaque type cellulaire ou la disponibilité d'épigénome de référence spécifique à chaque type cellulaire¹⁷².

Le choix d'un tissu pour étudier une maladie précise doit aussi être fait en considérant l'implication de celui-ci dans la physiopathologie. En effet, la méthylation de l'ADN est spécifique à chaque tissu, ce qui implique un profil de méthylation différent d'un tissu ou d'un organe à un autre⁸⁶. Il est donc préférable que le patron de méthylation du tissu utilisé pendant une étude corrèle avec celui du tissu impliqué dans la pathologie étudiée. De même, il est indispensable que le tissu étudié réagisse de la même façon que le tissu impliqué à différentes expositions environnementales pouvant affecter la méthylation¹⁷². Étant donné la spécificité tissulaire de la méthylation de l'ADN, le choix d'un tissu de substitution est difficile en regard de nos connaissances actuelles et peut donc devenir discutable et problématique^{86,172}.

Ces limitations d'emploi des tissus hétérogènes pour l'étude d'une maladie a donc amené l'utilisation de tissus spécifiques impliqués directement dans la physiopathologie des maladies étudiées afin de mieux comprendre celles-ci. Dans le présent projet, les cellules épithéliales bronchiques ont été ciblées pour documenter la génétique et l'épigénétique dans un contexte d'asthme. Ces cellules représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les allergènes présents dans l'environnement. Le rôle immunologique de ce tissu est de plus en plus documenté dans certaines maladies telles que l'asthme allergique⁴⁰. Les cellules épithéliales comportent plusieurs récepteurs pouvant reconnaître les agents pathogènes permettant l'activation de la cascade inflammatoire caractéristique de l'asthme allergique^{37,40,43}. De plus, ce type cellulaire est étroitement lié à la majorité des gènes associés dans l'échantillon SLSJ, notamment à l'*IL33*, le gène au cœur de la présente étude. L'utilisation des cellules épithéliales bronchiques est donc un choix judicieux pour l'étude de la voie biologique de l'*IL33* dans l'asthme allergique.

3.2. Types d'approche expérimentale

Outre les modèles utilisés, les approches expérimentales ont aussi changé à travers le temps afin de parfaire les connaissances de l'asthme et de son développement. Tout d'abord, des études génétiques visaient à identifier des gènes d'intérêt de la maladie. Ces études d'association ont permis de mettre en lumière plus de 100 loci intéressants dans notre population. Par la suite, plus de 25 gènes ont été associés à l'aide de l'approche par

gène-candidat permettant d'identifier plus précisément les gènes responsables^{1,59}. L'apparition des Études d'association à l'échelle du génome (*Genome-Wide Association Studies* ou GWAS) a permis d'accélérer le travail en faisant l'étude du génome en entier à l'aide de micro-puces. De cette façon, plusieurs nouveaux loci ont été associés à l'asthme, puis ont pu être validés par l'approche par gène-candidat⁶⁴. L'arrivée du séquençage de l'ADN a permis de documenter l'impact de variants génétiques sur le phénotype d'asthme⁶⁷. De plus, l'étude de l'expression des gènes ajoute une autre méthode d'analyse. En effet, il est possible de faire des groupes selon le phénotype et d'étudier l'expression de certains gènes cibles afin d'analyser la signature moléculaire de ceux-ci. Les différences entre les groupes phénotypiques permettent de tirer des conclusions sur la surexpression ou de la sous-expression de gènes impliqués dans la maladie¹⁷³.

La survenue des études épigénétiques pourrait permettre d'expliquer une part de l'héritabilité « manquante » des traits complexes comme l'asthme. En effet, les traits complexes sont une interaction entre une composante génétique et une composante environnementale, jusque-là tenue à l'écart par les analyses purement génétiques⁵⁷. Les marques épigénétiques affectent l'expression des gènes, sans changer la séquence de l'ADN. Ces modifications sont typiques d'un tissu ou d'un type cellulaire, ce qui peut expliquer en partie les différences d'expression d'un tissu à un autre chez un même individu⁸⁶. Parmi toutes les marques épigénétiques, la méthylation de l'ADN est la plus étudiée dans les dernières années et celle qui a été utilisée lors du présent projet.

Les études des dernières années ont pu démontrer que l'utilisation d'une seule science omique (génomique, transcriptomique, épigénomique, etc.) donne des informations incomplètes par rapport à la biologie du trait étudié. En effet, en observant un seul de ces paramètres, les mécanismes biologiques, avec toutes les interactions qu'ils comportent, ne sont pas fidèlement représentés. Afin de mieux comprendre ces mécanismes et les voies biologiques impliquées, il est maintenant possible d'intégrer plusieurs sciences omiques dans une même étude. La forme la plus simple est de combiner deux types d'études (SNP-expression, SNP-méthylation, méthylation-expression, etc.). Il est aussi possible d'intégrer plusieurs sciences omiques avec des modèles statistiques plus complexes¹⁷⁴. Plus il y a de méthodes intégrées dans le modèle, plus celui-ci est représentatif de la réalité et permet de

tirer des conclusions significatives pour comprendre la physiopathologie d'un trait complexe. Dans la présente étude, les analyses ont considéré deux sciences omiques combinées. Le diagramme de Venne de la figure 9 démontre qu'en croisant des études génétiques, transcriptomiques et épigénétiques, *IL33* est un des gènes significatifs pour les 3 types d'approches, ce qui confirme son rôle important dans l'asthme et la pertinence de son étude. De plus, les différents gènes se retrouvant dans ce diagramme pointent vers deux types cellulaires en particuliers ; les éosinophiles et les cellules épithéliales. Le modèle choisi pour la présente étude est donc très pertinent lui aussi. Le type cellulaire ainsi que le type d'approche utilisés ont donc permis de tirer des conclusions intéressantes en ce qui concerne le gène *IL33* et deux gènes de sa voie biologique soit *IL1RL1* et *CCL26*.

3.3. Association épigénétique entre l'interleukine-33 et l'éotaxine-3 et l'asthme

Un résumé des résultats obtenus (figure 9) à l'aide de la génétique, de la transcriptomique et de l'épigénétique réalisées en asthme auprès d'un échantillon de la population du Saguenay–Lac-Saint-Jean, a permis de cibler le gène *IL33* pour les trois types d'analyses. Celui-ci a aussi été associé à l'asthme dans plusieurs études indépendantes, ce qui renforce son implication potentielle dans la maladie^{2,6,68-70,72}. Le présent projet avait pour but de documenter les patrons de méthylation et d'expression de ce gène et de deux autres gènes, *IL1RL1* et *CCL26*, qui sont directement impliqués dans sa voie biologique, dans un type cellulaire spécifiquement associé à l'asthme, soit les cellules épithéliales bronchiques. De plus, le projet visait aussi à évaluer l'impact de polymorphismes sur le phénotype d'asthme.

La première section reposait sur l'étude de la méthylation de l'ADN. Lorsque celle-ci se situe au niveau du promoteur, l'expression des gènes est théoriquement diminuée puisque les groupement méthyles bloqueraient l'accès aux sites de fixation des facteurs de transcription⁹³. Dans le présent projet, la méthylation considérée ciblait une région située à 1000 paires de bases devant le site d'initiation de la transcription. Des résultats significatifs ont été démontrés pour les gènes *IL33* et *CCL26*. En effet, les individus asthmatiques présentaient des patrons de méthylation plus faibles que les individus témoins. Ces résultats suggèrent que l'expression de ces deux gènes dans les cellules épithéliales bronchiques

pourrait être en partie régulée par la méthylation de l'ADN. En effet, une méthylation plus faible exposerait de manière accrue les sites de fixation des facteurs de transcription permettant la formation d'ARNm⁵⁷. Aucun résultat significatif n'a été démontré pour le gène *IL1RL1*, malgré une méthylation plus faible pour les cellules d'asthmatiques également.

La seconde partie du projet a été l'étude de l'expression des gènes afin de valider l'impact de la méthylation de l'ADN. Le niveau d'expression des trois gènes était à la hausse chez les individus asthmatiques en comparaison avec les individus témoins, mais l'absence de significativité n'a pas permis de tirer de conclusions claires pour *IL33* et *IL1RL1*. Par contre, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de chaque gène.

L'alarmine IL-33 est produite et relâchée par les cellules épithéliales bronchiques lors d'un stress mécanique, comme un contact avec un allergène par exemple⁷⁴. Comme les patients de cette étude étaient des asthmatiques allergiques, il est possible que cette cytokine soit en effet plus exprimée chez ceux-ci. Suite à l'activation d'IL-33, une cascade de signalisation impliquant des facteurs de transcription tels que AP-1 et NFκB mène à la transcription de différents médiateurs pro-inflammatoires comme les cytokines IL-4 et IL-13, très impliquées dans la réponse asthmatiques allergiques⁷⁶. L'IL-33 mène donc au remodelage des voies respiratoires, à l'augmentation de la survie et de l'adhésion de plusieurs cellules immunitaires, à la dégranulation des mastocytes et à l'augmentation de l'expression du CMHII donc une présentation d'antigènes plus grande^{69,70,76}.

La présente étude est la première documentant le patron de méthylation du gène *IL33* chez des individus asthmatiques et des individus témoins. Par contre, il est possible de comparer les résultats d'expression du gène avec d'autres études indépendantes réalisées sur la même pathologie. Le présent projet de recherche corrobore les résultats obtenus de plusieurs études selon lesquelles le niveau d'expression d'*IL33* est supérieur chez les individus asthmatiques. Des résultats significatifs ont été rapportés dans plusieurs types cellulaires dont les cellules épithéliales bronchiques, le sérum et les cellules musculaires lisses des voies respiratoires, ce qui permet de prédire un rôle important de cette cytokine dans la pathogénèse de l'asthme^{68,69}. Les résultats de méthylation obtenu corroborent donc

ceux d'expression étant donné les connaissances théoriques sur la régulation de l'expression génique par la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices⁵⁷ et ce en dépit de l'absence de corrélation dans la présente étude. En effet, une méthylation moins importante près du site d'initiation de la transcription permettrait aux facteurs de transcription de se fixer à l'ADN et de la transcrire en ARNm de manière plus significative. Il a aussi été possible de démontrer que le niveau d'expression du gène *IL33* était lié à la sévérité de la maladie comme dans les études de Préfontaine et ses collaborateurs^{78,175}. Ceux-ci ont pu démontrer une expression d'*IL33* plus élevée chez les individus asthmatiques dans les cellules épithéliales bronchiques ainsi que dans les cellules musculaires lisses des voies respiratoires, et ce particulièrement chez les gens atteints d'asthme sévère^{78,175}. Dans la présente étude, ces résultats se sont avérés significatifs et concordants avec ceux obtenus par Préfontaine et ses collaborateurs.

Le second gène ayant démontré des résultats significatifs pour la méthylation de l'ADN est le gène *CCL26*. Ce gène code pour une chimiokine présente entre autres dans les cellules épithéliales et dont la production est médiée par certaines cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-33⁸⁰⁻⁸². Le rôle principal de *CCL26* est d'induire la migration des éosinophiles au site inflammatoire, soit au niveau des bronches dans un contexte d'asthme. De plus, il stimule la production de ROS et de protéines cationiques entraînant des dommages aux cellules épithéliales des voies respiratoires^{80,84}. Dans une plus faible mesure, *CCL26* induirait aussi la migration de cellules NK, des lymphocytes T et de monocytes⁸¹. L'expression de *CCL26* augmenterait en fonction de la sévérité de l'asthme, ce qui en fait un bon candidat pour l'étude de cette maladie⁸⁵.

Les résultats obtenus lors de la présente étude au niveau de la méthylation et de l'expression du gène *CCL26* attestent ceux obtenus par Lim et Rothenberg¹⁴⁶. Ces derniers ont observé cette variation épigénétique et transcriptomique dans des cellules épithéliales obtenues d'individus sains et d'individus atteints d'œsophagite éosinophilique, une autre maladie inflammatoire pouvant comprendre une composante allergique. Ils ont pu démontrer une déméthylation au niveau du promoteur du gène chez les individus atteints qui corrèle avec une expression génique accrue¹⁴⁶. Les résultats obtenus dans la présente étude sont donc conformes aux leurs, puisque les individus asthmatiques avaient une

méthylation moins importante dans le promoteur de *CCL26* et une expression plus élevée. En ce qui concerne la méthylation, il s'agit de la première étude publiée pour le gène *CCL26*. Les résultats démontrant une baisse du niveau de méthylation au niveau du promoteur chez les individus asthmatiques allergiques renforcent le rôle de ce gène dans ce contexte et confirment la pertinence d'approfondir les connaissances de sa fonction dans la maladie. Par ailleurs, plusieurs études démontrent que l'expression de *CCL26* est reliée à l'asthme. En effet, une étude avance qu'une production d'IL-13 entraîne une augmentation de l'expression de *CCL26* et que cette augmentation est associée à la sévérité de la maladie dans les cellules épithéliales bronchiques⁸⁵. De plus, la quantité d'éosinophiles présents dans les expectorations de ces patients asthmatiques serait plus grande que chez les individus témoins. Les auteurs suggèrent donc que l'éotaxine-3 participerait à la migration des éosinophiles des tissus jusqu'à la lumière bronchique⁸⁵. Comme nos résultats vont dans le même sens pour l'expression génique, il serait intéressant de mesurer la quantité d'éosinophiles dans le tissu bronchique, dans le sang et dans les expectorations de nos patients ce qui permettrait de pouvoir confirmer ce mécanisme.

3.4. Associations génétiques et épigénétiques du gène *Interleukine 33*

Le séquençage de certaines régions des gènes *IL33* et *CCL26* a été réalisé dans le but de mieux documenter l'implication de variants génétiques dans la physiopathologie de l'asthme. Une revue de littérature a permis de cibler les régions à séquençer en fonction des associations précédentes. Au niveau du gène *IL33*, les rs928413 et rs992969 ont été associés à l'asthme et le dernier a aussi été associé à l'expression dans les cellules épithéliales^{2,162}. Pour ce qui est du gène *CCL26*, la région située 225pb devant le site d'initiation de la transcription a été associée à une méthylation plus faible chez des gens atteints de maladies allergiques dans une étude précédente¹⁴⁶. En plus de ces régions, le séquençage a été réalisé environ 1000pb devant le site d'initiation de la transcription, aux endroits où la méthylation de l'ADN a été mesurée.

Dans le gène *IL33*, 10 SNP ont été détectés, mais aucun de ceux-ci n'a démontré une association significative avec le phénotype d'asthme dans notre échantillon. Huit polymorphismes avaient déjà été documentés dans la littérature, alors que deux d'entre eux

sont des nouveaux SNP jamais documentés jusqu'à maintenant. Ces SNP se trouvent dans la région devant le site d'initiation de la transcription du gène. Par la suite, le séquençage a été mis en relation avec l'expression du gène ainsi que la méthylation de l'ADN. Aucun polymorphisme n'était relié à l'expression génique, mais trois SNP (chr9:6210100, rs928413, rs7848215) ont été associés à la méthylation du promoteur, au même site qui était significatif entre les individus asthmatiques et les contrôles pour la méthylation de l'ADN. Tous les individus étaient soit hétérozygotes, soit homozygotes pour les trois polymorphismes car ceux-ci étaient en fort déséquilibre de liaison ($D' > 0.92$). Les individus homozygotes ont démontré un patron de méthylation plus élevé que les individus hétérozygotes. Ces résultats semblent concordants avec ceux obtenus dans une étude précédente au sujet du rs928413. En effet, ce SNP a déjà été associé à l'asthme dans une étude par gènes-candidats dans une population de l'Italie du Nord-Est². Malgré l'absence de significativité de la présente étude avec le phénotype d'asthme, ce SNP est lié à une différence de méthylation de l'ADN, et cette composante est liée au phénotype d'asthme. Il est donc possible de suggérer que le génotype de ce SNP pourrait expliquer en partie la méthylation de l'ADN, et donc le phénotype d'asthme. Par contre, cette hypothèse devrait être testée plus en profondeur avec un échantillon d'une plus grande taille.

Pour le gène *CCL26*, deux SNP ont été identifiés devant le site d'initiation de la transcription, mais aucune association n'a été démontrée entre ceux-ci et le phénotype d'asthme, la méthylation de l'ADN ou l'expression génique. Tous deux étaient aussi déjà documentés dans la littérature, mais aucune association avec une maladie n'a été démontrée pour le moment. Il est donc impossible de spéculer sur un lien possible entre le génotype de variants génétiques et le développement de l'asthme dans l'échantillon étudié pour ce gène.

3.5. Limites et avantages de l'étude

La principale limite de l'étude est sans aucun doute la petite taille de l'échantillon utilisé. Par contre, pour obtenir des cellules épithéliales bronchiques, il faut procéder à une bronchoscopie qui nécessite la prise de plusieurs biopsies bronchiques, une technique qui doit être effectuée par un pneumologue sous anesthésie locale. Il s'agit d'une approche invasive et ce n'est donc pas facile d'obtenir le consentement des personnes pour cette

intervention à des fins de recherche, surtout chez les individus sans problème respiratoire. De plus, les cellules épithéliales bronchiques sont plus difficiles à garder en culture que d'autres types cellulaires comme par exemple les fibroblastes. Un échantillon de plus grande taille pour l'étude aurait pu permettre plusieurs ajustements méthodologiques et l'appariement pour l'âge et le sexe. Augmenter la taille de l'échantillon permettrait donc de diminuer les variabilités intra-groupe, ce qui permettrait par le fait même d'obtenir une meilleure reproductibilité¹⁷⁶. De plus, avec un petit échantillon, la différence entre les groupes doit être très grande et marquée afin de conclure à un effet¹⁷⁶. Il serait aussi possible d'avoir de plus grands effectifs dans chaque groupe lors de la stratification par sous-phénotypes (sains, asthmatiques légers, asthmatiques sévères), ce qui pourrait possiblement permettre de tirer des conclusions sur la sévérité de la maladie. Par contre, malgré cette limitation de taille de l'échantillon, tous les résultats statistiques ont démontré un coefficient de Cohen élevé ($d > 0,8$) au test de taille d'effet démontrant la pertinence des résultats.

L'utilisation de cellules en culture comme modèle expérimental peut amener quelques biais. En effet, la microdissection pour isoler les cellules de la biopsie entraîne la destruction des jonctions liant les cellules qui composent le tissu. Comme l'IL-33 est relâchée par les cellules épithéliales bronchique lors d'un stress mécanique, la destruction de ces jonctions et l'altération du tissu bronchique pourraient avoir des répercussions sur le niveau d'expression du gène ou sur le niveau protéique. Une étude de 2017 de Weissbein et associés a abordé ce sujet en démontrant une modification du niveau de méthylation lors de culture cellulaire¹⁷⁷. Par contre, la présente étude a pu éviter ce biais puisque les cellules recueillies étaient toutes cultivées dans les mêmes conditions et utilisées au même nombre de passages ce qui aurait modifié le patron épigénétique de la même manière, que les cellules proviennent de patients asthmatiques ou non.

Une autre limitation est l'utilisation du même modèle pour l'étude de l'ensemble des gènes. En effet, *IL33* et *CCL26* sont très exprimés dans les cellules épithéliales bronchiques, mais *IL1RL1* beaucoup moins^{75,83}. En effet, le récepteur de l'IL-33 ne se retrouve pas directement sur les cellules épithéliales, mais sur les cellules immunitaires afin d'induire la cascade inflammatoire. Il aurait donc été plus judicieux d'étudier ce gène dans

les cellules immunitaires où son expression est la plus grande telles que les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les cellules NK, de même que dans le sang, un mélange hétérogène contenant tous ces types cellulaires^{75,78}. Par contre, l'utilisation de ce type cellulaire pour l'étude d'*IL33* et *CCL26* était très pertinente puisque les dommages à l'épithélium bronchique est un aspect caractéristique de l'asthme allergique.

Le manque de renseignements cliniques et de mesures anthropométriques pour les patients constituent également une limite de l'étude. En effet, les variations épigénétiques reposent en partie sur la composante environnementale à laquelle les patients sont exposés. La méthylation de l'ADN peut varier en fonction de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que l'âge, le sexe, le statut socio-économique, l'ethnie, le tabagisme, l'exposition à un animal domestique, l'alimentation, etc⁵⁶. Comme ces variables n'étaient pas toutes contrôlées dans la présente étude, il est possible que certains changements épigénétiques soient dus à ces facteurs exogènes plutôt qu'à la maladie en elle-même. Il est donc nécessaire, dans les études épigénétiques, de documenter la composante environnementale le mieux possible afin de créer les groupes les plus homogènes possibles en regard de tout ce qui peut affecter la méthylation de l'ADN. Les données anthropométriques telles que l'ethnie peut aussi permettre de mieux caractériser des groupes d'individus et d'identifier des cibles génétiques ou épigénétiques variant d'une population à une autre.

Ensuite, tel que discuté plus haut, l'utilisation d'une seule science omique (génomique, transcriptomique, épigénomique, etc.) donne des informations limitées par rapport à un trait. En effet, un mécanisme biologique ne peut pas être expliqué seulement par une de ces composantes puisqu'elles interagissent ensemble dans l'organisme¹⁷⁴. Dans le but de représenter le plus fidèlement possible la réalité et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents d'une maladie, il est nécessaire d'intégrer le plus de sciences omiques dans une étude. Il est possible de le faire en mesurant plusieurs facteurs (séquençage, expression des gènes, variations épigénétiques, etc.), puis d'intégrer ces informations dans des modèles statistiques complexes¹⁷⁴. L'utilisation de l'intégration des approches omiques permet donc de tirer de meilleures conclusions intégrées et d'accroître la compréhension de cette voie biologique dans l'asthme. Étant donné que l'étude a permis

d'analyser des résultats génétiques, de transcription et épigénétiques, il a été possible d'envisager une interaction entre ces sciences omiques pour expliquer les impacts fonctionnels de la variabilité inter-individuelle dans l'asthme allergique.

La comorbidité constitue une autre limite importante et doit être prise en considération. La comorbidité est la présence de deux troubles, deux maladies, chez un même individu¹⁷⁸. Il est donc pertinent de pouvoir savoir si le phénotype observé est dû à la maladie étudiée ou plutôt à une autre maladie pouvant affecter les mêmes tissus ou les mêmes voies biologiques. Par exemple, en ce qui a trait à l'asthme, plusieurs phénomènes de comorbidité ont été observés avec des maladies telles que le diabète, l'obésité, la dermatite atopique, l'eczéma, la bronchite chronique et les infections respiratoires comme les pneumonies¹⁷⁹. Il pourrait donc être pertinent, dans le cadre de cette étude, d'analyser l'association entre la méthylation et les facteurs de comorbidité.

La prise de médicaments peut aussi être une avenue intéressante à explorer. Une étude de Tosca et ses collaborateurs a démontré que les médicaments peuvent inverser les patrons de cytokines dans l'organisme en exprimant plus fortement la voie T_H1 que la voie T_H2¹⁸⁰. De plus, il est possible d'observer une diminution du nombre de cellules exprimant le récepteur de certaines cytokines¹⁸⁰. De ce fait, la réduction de cellules inflammatoires pourrait entraîner une perte de matériel à étudier, liée à une diminution de l'expression et du niveau de la protéine. Finalement, des médicaments comme les corticostéroïdes peuvent augmenter le niveau des cytokines T_H1 telles qu'INF γ et IL-12 entraînant la suppression de la transcription d'*IL4*, un gène très impliqué dans l'asthme allergique¹⁸⁰. Ainsi, une période d'arrêt de prise de la médication de 72 heures ou l'inclusion de personnes sans traitement durant la période d'évaluation (asthmatiques légers) aurait permis de contrer cette limite. Dans la présente étude, des cellules épithéliales bronchiques d'asthmatiques légers n'étaient pas disponibles alors que les patients souffrant d'asthme sévère ne peuvent arrêter leur médication, rendant cette limite inévitable.

Finalement, la présente étude est la première rapportant des épivariations au niveau du promoteur du gène *IL33*. L'utilisation du pyroséquençage a permis d'obtenir des résultats intéressants puisqu'il s'agit d'une technique très robuste, précise et reproductible^{157,181}. L'étude était aussi la première à identifier des différences d'expression dans les cellules

épithéliales bronchiques humaines pour le gène *ILIRLI*. En effet, ce dernier avait été étudié uniquement chez des souris¹⁴¹. Les résultats permettent donc d'ouvrir la voie à de nouvelles études au niveau de cette voie biologique impliquée dans l'asthme allergique.

3.6. Perspectives

Le présent projet a permis de mettre en lumière le gène *IL33* et deux gènes dans la même voie biologique soit celui codant pour son récepteur ST2, *ILIRLI*, et celui codant pour la chimiokine CCL26. La méthylation de l'ADN dans le promoteur de ces gènes au niveau des cellules épithéliales bronchiques pourrait expliquer en partie leur plus grande expression chez les asthmatiques. Pour la poursuite de ce projet, plusieurs éléments intéressants pourraient être ajoutés afin de documenter encore plus finement le rôle de ces gènes dans la maladie.

Tout d'abord, l'augmentation de la taille de l'échantillon permettrait de tirer des conclusions plus claires au sujet des trois gènes en ce qui a trait à la méthylation de l'ADN, à l'expression des gènes et à l'implication des variants génétiques. En effet, la mesure de ces composantes a été réalisée, mais la faible taille de l'échantillon n'a pas toujours permis d'atteindre le seuil de significativité nécessaire. Avec un plus grand échantillon, la puissance de l'étude serait plus grande, ce qui permettrait de mieux cibler les groupes phénotypiques. Il serait par contre important d'avoir des données cliniques et anthropométriques plus fines pour les prochains individus de l'étude afin de mieux documenter la composante environnementale à laquelle ils sont exposés.

Par la suite, tel que discuté auparavant, il serait pertinent de faire l'étude du gène *ILIRLI* dans un autre type cellulaire que les cellules épithéliales bronchiques. Par exemple, on pourrait regarder dans le sang puisque les données de comptes cellulaires sont disponibles pour les individus. L'étude de ce gène pourrait aussi se faire dans les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles et les cellules NK puisqu'il s'agit des types cellulaires où ce gène est le plus exprimé^{75,78}. Suite à l'étude de ce gène dans un type cellulaire plus approprié, il serait intéressant de compléter l'étude avec une autre science omique, c'est-à-dire avec la protéomique. Il faudrait mesurer le niveau de protéines formées

de chacun des gènes afin de valider à quel point la méthylation de l'ADN peut expliquer l'expression des gènes et, finalement la traduction en protéines effectrices.

Étant donné que la méthylation de l'ADN est spécifique au type cellulaire, il serait intéressant de faire la même étude, mais avec différents types cellulaires tels que les lymphocytes T CD4+ et les éosinophiles. Les éosinophiles seraient très pertinents puisqu'il s'agit du type cellulaire, avec les cellules épithéliales bronchiques, le plus étroitement lié aux différents gènes associés à l'asthme dans l'échantillon SLSJ. Avec la mesure du génome, du méthylome et du transcriptome des mêmes individus du présent projet, il serait possible de mieux documenter le rôle des trois gènes dans le développement de l'asthme.

Plusieurs autres données pourraient être ajoutées au projet afin de le rendre plus complet. En effet, il a été démontré que *CCL26* avait une réponse tardive (12h à 18h) à un challenge allergénique⁸⁵. Il serait donc intéressant de mesurer la méthylation et l'expression de ce gène en fonction du temps. Il faudrait donc provoquer une réaction allergique contrôlée chez des patients et recueillir des tissus à différents temps pour observer les différences de méthylation de l'ADN et d'expression. L'étude d'autres marques épigénétiques pourrait aussi être pertinente puisque les miARN peuvent bloquer l'expression de certains gènes. Par exemple, une étude a démontré que miR155 pouvait bloquer l'expression du gène *CCL26* dans les cellules épithéliales bronchiques¹⁸². Les autres marques épigénétiques peuvent donc avoir un rôle important sur l'expression de certains gènes, pouvant influencer le mécanisme biologique dans lequel ils sont impliqués.

Toutes ces pistes d'études pourraient être explorées dans le but de mieux documenter la voie biologique de l'*IL33*. En effet, le rôle de plusieurs gènes et de plusieurs types cellulaires doit être précisé afin de mieux comprendre leur implication biologique et moléculaire dans la physiopathologie de l'asthme.

4 - Conclusion

Le présent projet a permis de documenter le patron de méthylation de l'ADN pour les gènes *IL33*, *IL1RL1* et *CCL26* dans les cellules épithéliales isolées de biopsies bronchiques d'individus asthmatiques ou sains. Les individus asthmatiques ont démontré une méthylation plus faible dans le promoteur des gènes *IL33* et *CCL26*. Par la suite, le séquençage des gènes *IL33* et *CCL26* a permis d'identifier des polymorphismes présents chez les individus étudiés. Pour *IL33*, 10 SNP ont été trouvés dont un qui n'avait jamais été documenté jusqu'à maintenant (chr9:6215082). Aucun d'entre eux n'étaient associés au phénotype d'asthme, mais trois (rs779375756, rs928413, rs7848215) ont été associés à la méthylation du promoteur, le même site qui était significatif entre les cellules d'asthmatiques et de contrôles au niveau de la méthylation de l'ADN. Pour le gène *CCL26*, deux SNP déjà identifiés ont été trouvés dans le promoteur, mais ils n'étaient pas associés à une autre composante. Ces résultats démontrent que, pour le gène *IL33*, le génotype peut expliquer en partie la méthylation de l'ADN, qui elle influe sur l'expression du gène. Cela démontre bien le lien indissociable entre la génétique et l'épigénétique et renforce l'idée d'intégrer toutes les sciences omiques afin d'obtenir une documentation plus fidèle des mécanismes biologiques qui sous-tendent l'asthme.

Références

1. Brasier, A.R. *Heterogeneity in Asthma*, (Springer Science+Business Media, New York, 2014).
2. Grotenboer, N.S., Ketelaar, M.E., Koppelman, G.H. & Nawijn, M.C. Decoding asthma: translating genetic variation in IL33 and IL1RL1 into disease pathophysiology. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 856-65 (2013).
3. Canada, S. Asthme, selon le sexe, provinces et les territoires. (2016).
4. Subbarao, P., Mandhane, P.J. & Sears, M.R. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* **181**, E181-90 (2009).
5. Loftus, P.A. & Wise, S.K. Epidemiology of asthma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **24**, 245-9 (2016).
6. Moffatt, M.F. *et al.* A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* **363**, 1211-21 (2010).
7. Handoyo, S. & Rosenwasser, L.J. Asthma phenotypes. *Curr Allergy Asthma Rep* **9**, 439-45 (2009).
8. Lajoie, S. *et al.* Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol* **11**, 928-35 (2010).
9. Boulet, L.P. *L'asthme: notions de base - éducation - intervention*, (Presses de l'Université Laval, 1997).
10. Dutau, G. *Allergologie*, (Masson, 2006).
11. Abbas, A.K. *et al.* *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*, (Elsevier Health Sciences France, 2013).
12. Janeway, C.A., Murphy, K., Travers, P., Masson, P.L. & Walport, M. *Immunobiologie*, (De Boeck Supérieur, 2009).
13. Furuse, M. *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* **123**, 1777-88 (1993).
14. Sulaiman, I., Lim, J.C.W., Soo, H.L. & Stanslas, J. Molecularly targeted therapies for asthma: Current development, challenges and potential clinical translation. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **40**, 52-68 (2016).
15. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. & Kuby, J. *Kuby Immunology*, (W. H. Freeman, 2007).
16. Bach, J.F. & Chatenoud, L. *Immunologie: 4ème édition*, (Flammarion médecine-sciences, 2002).
17. Sanders, N.L. & Mishra, A. Role of interleukin-18 in the pathophysiology of allergic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* **32**, 31-39 (2016).
18. Martin, C., Vallet, B. & Riou, B. *Physiologie humaine appliquée (2e édition)*, (ARNETTE, 2017).
19. Calas, A., Boulouis, H.J., Perrin, J.F., Plas, C. & Vanneste, P. *PRECIS DE PHYSIOLOGIE 2ED*, (JOHN LIBBEY EUROTEXT, 2016).
20. Texier, A.L. *Pharmacologie et médicaments - Métiers et sciences de la santé*, (Foucher, 2014).
21. Owen, J., Punt, J. & Stranford, S. *Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision*, (Dunod, 2014).

22. Singh, R.K., Gupta, S., Dastidar, S. & Ray, A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology* **85**, 336-49 (2010).
23. Stokes, J.R. & Casale, T.B. Characterization of asthma endotypes: implications for therapy. *Ann Allergy Asthma Immunol* **117**, 121-5 (2016).
24. Palgan, K. & Bartuzi, Z. Platelet activating factor in allergies. *Int J Immunopathol Pharmacol* **28**, 584-9 (2015).
25. Delves, P.J., Burton, D.R., Martin, S.J., Roitt, I.M. & Masson, P.L. *Les fondements de l'immunologie*, (De Boeck Supérieur, 2008).
26. Male, D. & Fonteneau, P. *Immunologie: Aide-mémoire illustré*, (De Boeck Supérieur, 2005).
27. Blaser, K. *T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases*, (Karger, 2008).
28. Brusselle, G.G. *et al.* Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* **24**, 73-80 (1994).
29. Temann, U.A., Laouar, Y., Eynon, E.E., Homer, R. & Flavell, R.A. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int Immunol* **19**, 1-10 (2007).
30. Robinson, D.S. *et al.* Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* **326**, 298-304 (1992).
31. Holgate, S.T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* **18**, 673-83 (2012).
32. Bowen, H., Kelly, A., Lee, T. & Lavender, P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clin Exp Allergy* **38**, 1422-31 (2008).
33. Renauld, J.C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* **54**, 577-89 (2001).
34. Hogan, S.P. *et al.* Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* **38**, 709-50 (2008).
35. Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L. & Sekerkova, A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci (Lond)* **126**, 593-612 (2014).
36. Jiang, Z. & Zhu, L. Update on the role of alternatively activated macrophages in asthma. *J Asthma Allergy* **9**, 101-7 (2016).
37. Hall, S. & Agrawal, D.K. Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *Int Immunopharmacol* **23**, 316-29 (2014).
38. Karimi, K. & Forsythe, P. Natural killer cells in asthma. *Front Immunol* **4**, 159 (2013).
39. Aktas, E. *et al.* Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol* **140**, 301-9 (2005).
40. Loxham, M., Davies, D.E. & Blume, C. Epithelial function and dysfunction in asthma. *Clin Exp Allergy* **44**, 1299-313 (2014).
41. Davies, D.E. Epithelial barrier function and immunity in asthma. *Ann Am Thorac Soc* **11 Suppl 5**, S244-51 (2014).
42. Shikotra, A. *et al.* Increased expression of immunoreactive thymic stromal lymphopoietin in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* **129**, 104-11 e1-9 (2012).
43. Saluja, R., Khan, M., Church, M.K. & Maurer, M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy* **5**, 33 (2015).
44. Ingram, J.L. & Kraft, M. IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies. *J Allergy Clin Immunol* **130**, 829-42; quiz 843-4 (2012).
45. Berair, R. & Brightling, C.E. Asthma therapy and its effect on airway remodelling. *Drugs* **74**, 1345-69 (2014).

46. Akdis, M. *et al.* Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* **138**, 984-1010 (2016).
47. Amin, K. The Role of the T lymphocytes and Remodeling in Asthma. *Inflammation* **39**, 1475-82 (2016).
48. Boulet, L.P. *Physiopathologie respiratoire appliquée*, (De Boeck Supérieur, 2013).
49. Kudo, M. *et al.* Mfge8 suppresses airway hyperresponsiveness in asthma by regulating smooth muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 660-5 (2013).
50. Brannan, J.D. & Loughheed, M.D. Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. *Front Physiol* **3**, 460 (2012).
51. Davis, B.E. & Cockcroft, D.W. Past, present and future uses of methacholine testing. *Expert Rev Respir Med* **6**, 321-9 (2012).
52. Borish, L. The immunology of asthma: Asthma phenotypes and their implications for personalized treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* **117**, 108-14 (2016).
53. Perlikos, F., Hillas, G. & Loukides, S. Phenotyping and Endotyping Asthma Based on Biomarkers. *Curr Top Med Chem* **16**, 1582-6 (2016).
54. Sheehan, W.J. & Phipatanakul, W. Indoor allergen exposure and asthma outcomes. *Curr Opin Pediatr* **28**, 772-777 (2016).
55. Sokol, K., Sur, S. & Ameredes, B.T. Inhaled environmental allergens and toxicants as determinants of the asthma phenotype. *Adv Exp Med Biol* **795**, 43-73 (2014).
56. Ho, S.M. Environmental epigenetics of asthma: an update. *J Allergy Clin Immunol* **126**, 453-65 (2010).
57. Durham, A.L., Wiegman, C. & Adcock, I.M. Epigenetics of asthma. *Biochim Biophys Acta* **1810**, 1103-9 (2011).
58. Lee, S.H., Park, J.S. & Park, C.S. The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy Asthma Immunol Res* **3**, 236-44 (2011).
59. Steinke, J.W., Rich, S.S. & Borish, L. 5. Genetics of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **121**, S384-7; quiz S416 (2008).
60. Clarke, J.R. *et al.* Evidence for genetic associations between asthma, atopy, and bronchial hyperresponsiveness: a study of 8- to 18-yr-old twins. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 2188-93 (2000).
61. Thomsen, S.F. *et al.* Risk factors for asthma in young adults: a co-twin control study. *Allergy* **61**, 229-33 (2006).
62. Khan, S.J., Dharmage, S.C., Matheson, M.C. & Gurrin, L.C. Is the atopic march related to confounding by genetics and early-life environment? A systematic review of sibship and twin data. *Allergy* **73**, 17-28 (2018).
63. Lefevre, T., Raymond, M. & Thomas, F. *Biologie évolutive*, (2016).
64. Vercelli, D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* **8**, 169-82 (2008).
65. NCBI. HapMap Resource. (2016).
66. Lander, E.S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
67. Park, S.T. & Kim, J. Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *Int Neurourol J* **20**, S76-83 (2016).
68. Raeiszadeh Jahromi, S. *et al.* Serum levels of IL-10, IL-17F and IL-33 in patients with asthma: a case-control study. *J Asthma* **51**, 1004-13 (2014).
69. Lloyd, C.M. IL-33 family members and asthma - bridging innate and adaptive immune responses. *Curr Opin Immunol* **22**, 800-6 (2010).

70. Poon, A.H., Eidelman, D.H., Martin, J.G., Laprise, C. & Hamid, Q. Pathogenesis of severe asthma. *Clin Exp Allergy* **42**, 625-37 (2012).
71. Gudbjartsson, D.F. *et al.* Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* **41**, 342-7 (2009).
72. Demenais, F. *et al.* Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet* **50**, 42-53 (2018).
73. Yagami, A. *et al.* IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol* **185**, 5743-50 (2010).
74. Moheimani, F. *et al.* The genetic and epigenetic landscapes of the epithelium in asthma. *Respir Res* **17**, 119 (2016).
75. Millar, N.L., O'Donnell, C., McInnes, I.B. & Brint, E. Wounds that heal and wounds that don't – The role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **61**, 41-50 (2017).
76. Oboki, K., Nakaie, S., Matsumoto, K. & Saito, H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res* **3**, 81-8 (2011).
77. GeneCards. The Human Gene Database. (Weizmann Institute of Science, 2017).
78. Prefontaine, D. *et al.* Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* **125**, 752-4 (2010).
79. Zhao, Q. & Chen, G. Role of IL-33 and its receptor in T cell-mediated autoimmune diseases. *Biomed Res Int* **2014**, 587376 (2014).
80. Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N. & Koochakzadeh, L. An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis. *Inflammation* (2016).
81. Nakayama, T. *et al.* Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol* **185**, 6472-9 (2010).
82. Chibana, K., Takemasa, A., Arai, R., Ishii, Y. & Fukuda, T. IL-33 Induces CCL26 From Primary Human Distal Bronchial Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **183**(2011).
83. Coleman, J.M. *et al.* Epithelial eotaxin-2 and eotaxin-3 expression: relation to asthma severity, luminal eosinophilia and age at onset. *Thorax* **67**, 1061-6 (2012).
84. Provost, V. *et al.* CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. *J Leukoc Biol* **94**, 213-22 (2013).
85. Larose, M.C. *et al.* Correlation between CCL26 production by human bronchial epithelial cells and airway eosinophils: Involvement in patients with severe eosinophilic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **136**, 904-13 (2015).
86. Salam, M.T., Zhang, Y. & Begum, K. Epigenetics and childhood asthma: current evidence and future research directions. *Epigenomics* **4**, 415-29 (2012).
87. de Planell-Saguer, M., Lovinsky-Desir, S. & Miller, R.L. Epigenetic regulation: the interface between prenatal and early-life exposure and asthma susceptibility. *Environ Mol Mutagen* **55**, 231-43 (2014).
88. Harb, H. & Renz, H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 15-24 (2015).
89. Stefanowicz, D. *et al.* Epigenetic modifying enzyme expression in asthmatic airway epithelial cells and fibroblasts. *BMC Pulm Med* **17**, 24 (2017).
90. Begin, P. & Nadeau, K.C. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol* **10**, 27 (2014).

91. Pierce, B.A. & Cunin, R. *L'essentiel de la génétique: Concepts and connections*, (De Boeck Supérieur, 2012).
92. Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A. & Blottière, L. *Génétique*, (Pearson Education France, 2006).
93. Heyn, H. A symbiotic liaison between the genetic and epigenetic code. *Front Genet* **5**, 113 (2014).
94. Renaudineau, Y. & Youinou, P. Epigenetics and autoimmunity, with special emphasis on methylation. *Keio J Med* **60**, 10-6 (2011).
95. Kabesch, M. Epigenetics in asthma and allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **14**, 62-8 (2014).
96. McLeish, A.C. & Zvolensky, M.J. Asthma and cigarette smoking: a review of the empirical literature. *J Asthma* **47**, 345-61 (2010).
97. Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259-60 (1989).
98. Stiemsma, L.T. & Turvey, S.E. Asthma and the microbiome: defining the critical window in early life. *Allergy Asthma Clin Immunol* **13**, 3 (2017).
99. Claassen-Weitz, S. *et al.* Current Knowledge and Future Research Directions on Fecal Bacterial Patterns and Their Association with Asthma. *Front Microbiol* **7**, 838 (2016).
100. Daley, D. *et al.* 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**, 1284-93 (2012).
101. Raoult, D. The globalization of intestinal microbiota. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 1049-50 (2010).
102. Sharma, S. & Litonjua, A. Asthma, allergy, and responses to methyl donor supplements and nutrients. *J Allergy Clin Immunol* **133**, 1246-54 (2014).
103. Ober, C. & Yao, T.C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* **242**, 10-30 (2011).
104. Ullemar, V. *et al.* Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy* **71**, 230-8 (2016).
105. Savenije, O.E. *et al.* Association of IL33-IL-1 receptor-like 1 (IL1RL1) pathway polymorphisms with wheezing phenotypes and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 170-7 (2014).
106. Davies, D.E. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 678-82 (2009).
107. Lambrecht, B.N. & Hammad, H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* **18**, 684-92 (2012).
108. Lambrecht, B.N. & Hammad, H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 499-507 (2014).
109. Lloyd, C.M. & Saglani, S. Epithelial cytokines and pulmonary allergic inflammation. *Curr Opin Immunol* **34**, 52-8 (2015).
110. Gandhi, V.D. & Vliagoftis, H. Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Front Immunol* **6**, 147 (2015).
111. Tsicopoulos, A., de Nadai, P. & Glineur, C. Environmental and genetic contribution in airway epithelial barrier in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13**, 495-9 (2013).
112. Jeong, J. *et al.* PLAG (1-Palmitoyl-2-Linoleoyl-3-Acetyl-rac-Glycerol) Modulates Eosinophil Chemotaxis by Regulating CCL26 Expression from Epithelial Cells. *PLoS One* **11**, e0151758 (2016).

113. Kazuyuki, C., Akihiro, T., Ryo, A., Yoshiki, I. & Takeshi, F. IL-33 Induces CCL26 From Primary Human Distal Bronchial Epithelial Cells. in *C31. INTERLEUKIN-33 BIOLOGY* A4265-A4265 (American Thoracic Society, 2011).
114. Shin, H.D. *et al.* Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet* **12**, 1279-85 (2003).
115. Bird, A.P. & Wolffe, A.P. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* **99**, 451-4 (1999).
116. Bestor, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-402 (2000).
117. Lee, D.U., Agarwal, S. & Rao, A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* **16**, 649-60 (2002).
118. White, G.P., Watt, P.M., Holt, B.J. & Holt, P.G. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and Non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO(-) T cells. *Journal of Immunology* **168**, 2820-2827 (2002).
119. Jones, B. & Chen, J. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J* **25**, 2443-52 (2006).
120. Kumar, R.K., Hitchins, M.P. & Foster, P.S. Epigenetic changes in childhood asthma. *Dis Model Mech* **2**, 549-53 (2009).
121. van Panhuys, N., Le Gros, G. & McConnell, M.J. Epigenetic regulation of Th2 cytokine expression in atopic diseases. *Tissue Antigens* **72**, 91-7 (2008).
122. Runyon, R.S. *et al.* Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PLoS One* **7**, e48796 (2012).
123. Gagne-Ouellet, V., Guay, S.P., Boucher-Lafleur, A.M., Bouchard, L. & Laprise, C. DNA methylation signature of interleukin 1 receptor type II in asthma. *Clin Epigenetics* **7**, 80 (2015).
124. Soto-Ramirez, N. *et al.* The interaction of genetic variants and DNA methylation of the interleukin-4 receptor gene increase the risk of asthma at age 18 years. *Clin Epigenetics* **5**, 1 (2013).
125. Kwon, N.H., Kim, J.S., Lee, J.Y., Oh, M.J. & Choi, D.C. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol* **28**, 139-46 (2008).
126. Brugha, R. *et al.* DNA methylation profiles between airway epithelium and proxy tissues in children. *Acta Paediatr* (2017).
127. Stefanowicz, D. *et al.* DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One* **7**, e44213 (2012).
128. Moussette, S. *et al.* Role of DNA methylation in expression control of the IKZF3-GSDMA region in human epithelial cells. *PLoS One* **12**, e0172707 (2017).
129. Scantamburlo, G. *et al.* Interleukin-4 Induces CpG Site-Specific Demethylation of the Pendrin Promoter in Primary Human Bronchial Epithelial Cells. *Cell Physiol Biochem* **41**, 1491-1502 (2017).
130. Nicodemus-Johnson, J. *et al.* DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight* **1**, e90151 (2016).
131. Nicodemus-Johnson, J. *et al.* Genome-Wide Methylation Study Identifies an IL-13-induced Epigenetic Signature in Asthmatic Airways. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 376-85 (2016).
132. White, G.P. *et al.* CpG methylation patterns in the IFNgamma promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics. *Pediatr Allergy Immunol* **17**, 557-64 (2006).

133. Barton, S.J. *et al.* DNA methylation of Th2 lineage determination genes at birth is associated with allergic outcomes in childhood. *Clin Exp Allergy* (2017).
134. Holgate, S.T. The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* **242**, 205-19 (2011).
135. Stolarski, B., Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Xu, D. & Liew, F.Y. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* **185**, 3472-80 (2010).
136. Bouffi, C. *et al.* IL-33 markedly activates murine eosinophils by an NF-kappaB-dependent mechanism differentially dependent upon an IL-4-driven autoinflammatory loop. *J Immunol* **191**, 4317-25 (2013).
137. Hastie, A.T. *et al.* Biomarker surrogates do not accurately predict sputum eosinophil and neutrophil percentages in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* **132**, 72-80 (2013).
138. Fowler, S.J., Tavernier, G. & Niven, R. High blood eosinophil counts predict sputum eosinophilia in patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 822-4 e2 (2015).
139. Luthi, A.U. *et al.* Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* **31**, 84-98 (2009).
140. Peine, M., Marek, R.M. & Lohning, M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol* **37**, 321-33 (2016).
141. Kurokawa, M. *et al.* Expression and effects of IL-33 and ST2 in allergic bronchial asthma: IL-33 induces eotaxin production in lung fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* **155 Suppl 1**, 12-20 (2011).
142. Griesenauer, B. & Paczesny, S. The ST2/IL-33 Axis in Immune Cells during Inflammatory Diseases. *Front Immunol* **8**, 475 (2017).
143. Jones, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* **13**, 484-92 (2012).
144. Gordon, E.D. *et al.* IL1RL1 asthma risk variants regulate airway type 2 inflammation. *JCI Insight* **1**, e87871 (2016).
145. Queiroz, G.A. *et al.* IL33 and IL1RL1 variants are associated with asthma and atopy in a Brazilian population. *Int J Immunogenet* **44**, 51-61 (2017).
146. Lim, E. & Rothenberg, M.E. Demethylation of the human eotaxin-3 gene promoter leads to the elevated expression of eotaxin-3. *J Immunol* **192**, 466-74 (2014).
147. Choy, D.F. *et al.* Gene expression patterns of Th2 inflammation and intercellular communication in asthmatic airways. *J Immunol* **186**, 1861-9 (2011).
148. Grundberg, E. *et al.* Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am J Hum Genet* **93**, 876-90 (2013).
149. Zhang, H. *et al.* The interplay of DNA methylation over time with Th2 pathway genetic variants on asthma risk and temporal asthma transition. *Clin Epigenetics* **6**, 8 (2014).
150. Tate, P.H. & Bird, A.P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 226-31 (1993).
151. Hu, S. *et al.* DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* **2**, e00726 (2013).
152. Finotto, S. T-cell regulation in asthmatic diseases. *Chem Immunol Allergy* **94**, 83-92 (2008).
153. Yang, B. *et al.* A novel pathway links oxidative stress to loss of insulin growth factor-2 (IGF2) imprinting through NF-kappaB activation. *PLoS One* **9**, e88052 (2014).
154. Schaack, J. *et al.* Insertion of CTCF-binding sites into a first-generation adenovirus vector reduces the innate inflammatory response and prolongs transgene expression. *Virology* **412**, 136-145 (2011).

155. Sullivan, G.M. & Feinn, R. Using Effect Size-or Why the P Value Is Not Enough. *J Grad Med Educ* **4**, 279-82 (2012).
156. Shukla, S. *et al.* CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, 74-9 (2011).
157. consortium, B. Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat Biotechnol* **34**, 726-37 (2016).
158. Statement on Standards for the Diagnosis and Care of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma. *American Review of Respiratory Disease* **136**, 225-244 (1987).
159. Chakir, J. *et al.* Isolation and characterization of human airway fibroblasts in culture. *Methods Mol Med* **44**, 53-65 (2000).
160. Dommisch, H. *et al.* Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing. *Clin Oral Investig* **19**, 209-20 (2015).
161. He, J.Q. *et al.* Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* **32**, 755-62 (2008).
162. Li, X. *et al.* eQTL of bronchial epithelial cells and bronchial alveolar lavage deciphers GWAS-identified asthma genes. *Allergy* **70**, 1309-18 (2015).
163. Laprise, C. The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes Immun* **15**, 247-55 (2014).
164. Delaneau, O., Marchini, J. & Zagury, J.F. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat Methods* **9**, 179-81 (2011).
165. O'Connell, J. *et al.* A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet* **10**, e1004234 (2014).
166. Howie, B.N., Donnelly, P. & Marchini, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* **5**, e1000529 (2009).
167. Cartharius, K. *et al.* MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933-42 (2005).
168. Bjornson, C.L. & Mitchell, I. Gender differences in asthma in childhood and adolescence. *J Gen Specif Med* **3**, 57-61 (2000).
169. Meurer, J.R., George, V., Subichin, S., Yauck, J. & Layde, P. Asthma severity among children hospitalized in 1990 and 1995. *Arch Pediatr Adolesc Med* **154**, 143-9 (2000).
170. Chen, Y., Stewart, P., Johansen, H., McRae, L. & Taylor, G. Sex difference in hospitalization due to asthma in relation to age. *J Clin Epidemiol* **56**, 180-7 (2003).
171. Chapuis, J. *et al.* Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **14**, 1004-16 (2009).
172. Michels, K.B. *et al.* Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods* **10**, 949-55 (2013).
173. Loxham, M. & Davies, D.E. Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 1736-1751 (2017).
174. Pineda, S. *et al.* Framework for the Integration of Genomics, Epigenomics and Transcriptomics in Complex Diseases. *Hum Hered* **79**, 124-36 (2015).
175. Prefontaine, D. *et al.* Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* **183**, 5094-103 (2009).
176. Ekanga, B. *Les fondements éthiques de la bioéthique*, (Bloomington, 2013).
177. Weissbein, U., Plotnik, O., Vershkov, D. & Benvenisty, N. Culture-induced recurrent epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *PLoS Genet* **13**, e1006979 (2017).

178. Feuerstein, M. & Ganz, P.A. *Health Services for Cancer Survivors: Practice, Policy and Research*, (Springer New York, 2011).
179. Heaney, L. & Menzies, A. *Clinical Focus Series: Difficult Asthma*, (Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited, 2013).
180. Tosca, M.A. *et al.* Medical treatment reverses cytokine pattern in allergic and nonallergic chronic rhinosinusitis in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol* **14**, 238-41 (2003).
181. Tost, J. & Gut, I.G. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* **2**, 2265-75 (2007).
182. Matsukura, S. *et al.* Overexpression of microRNA-155 suppresses chemokine expression induced by Interleukin-13 in BEAS-2B human bronchial epithelial cells. *Allergol Int* **65 Suppl**, S17-23 (2016).