



HAL
open science

Méthylation et IgE : approche méthylome dans une population de sujets asthmatiques

Anaïs Malpertuis

► **To cite this version:**

Anaïs Malpertuis. Méthylation et IgE : approche méthylome dans une population de sujets asthmatiques. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-02420646

HAL Id: dumas-02420646

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02420646>

Submitted on 20 Dec 2019

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

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



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2017/2018

**MÉTHYLATION ET IGE : APPROCHE MÉTHYLOME DANS UNE
POPULATION DE SUJETS ASTHMATIQUES**

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ÉTAT

Anaïs MALPERTUIS

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 13/10/2017

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Dr. BEDOUCH Pierrick

Membres :

Dr. CHANOINE Sébastien (directeur de thèse)

Dr. SIROUX Valérie (co-directrice de thèse)

Dr. SÈVE Michel

Dr. PIN Isabelle

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT*	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM - UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoît	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA - INSERM U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2 - INSERM U1042
MAST	BELLETT	Béatrice	D5	-
ATER	BOUCHERLE	Benjamin	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	BOURDIER	Guillaume	D5	
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2 - INSERM U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS - UMR 5075 CEA CNRS UJF
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoît	D1	IAB - CRI INSERM UJF U823
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM – UMR 5163 CNRS UJF
AHU	CHANOINE	Sébastien	D5	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
AHU	CHOVELON	Benoît	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX – TIMC IMAG UMR 5525 CNRS UJF
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	DELETRAZ- DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS -EAM 4128 UCB
MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA - INSERM U1055

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT*	LABORATOIRE
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI - UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	DURMORT - MEUNIER	Claire	D1	I.B.S – UMR 5075 CEA UJF CNRS
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2- INSERM U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
AHU	GARNAUD	Cécile	D4	LAPM - UMR CNRS 5163
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2- INSERM U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Émérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA - Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2- INSERM U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
ATER	KOTZKI	Sylvain	D5	HP2- INSERM U1042
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	LCBM, IRTSV CEA
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
DCE	LUNVEN	Laurent		
DCE	MARILLIER	Mathieu		
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
PU	MOINARD	Christophe		LBFA - Inserm U1055
DCE	MONTEMAGNO	Christopher		
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX - TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A – UMR CNRS 5553
DCE	MOULIN	Sophie		
DCE	NGUYEN	Kim-Anh		
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	PERES	Basile	D3	DPM- UJF/CNRS UMR 5063

D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »
D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »
D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »
D4 : Département « Bases Immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »
D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »
D6 : Département « Anglais »

Document mis à jour le 04/09/2017

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT*	LABORATOIRE
DCE	PERONNE	Lauralie		
DCE	PETIT	Pascal		
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.I.B - UMR E3 CEA/UJF
MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2- INSERM U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
ATER	TAHMASEBI	Faezeh		TIMC-IMAG
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMR 3265 UJF-EMBL- CNRS
DCE	TODOROV	Zlatomir		
DCE	TRABOULSI	Wael		-
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
DCE	VACHEZ	Yvan		
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS
DCE	VERNET	Céline		
DCE	VRAGNIAU	Charles		
PU	WOUESSIDJEWÉ	Denis	D2	DPM –UMR 5063 UJF CNRS

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
 et de Cognition et Ontogénèse »
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institut Albert Bonniot,
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 JR : Jean Roget
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques

MCU : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »
 D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »
 D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments »
 D4 : Département « Bases Immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »
 D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »
 D6 : Département « Anglais »

Document mis à jour le 04/09/2017

REMERCIEMENTS

À Sébastien CHANOINE,

Qui m'a consacré de son temps pour m'aider au cours de ce travail, me conseiller, m'orienter et qui a su faire preuve de compréhension. Un grand merci pour tes encouragements et le partage de tes connaissances.

À Valérie SIROUX,

Qui a pris de son temps pour m'encadrer tout au long de ce travail, pour m'expliquer tout un tas de notions et qui m'aura appris énormément de choses. Un grand merci pour tous ces compliments et encouragements.

À Pierrick BEDOUCHE,

Pour avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse et pour le temps accordé.

À Michel SÈVE,

Pour avoir accepté de prendre du temps pour commenter mon manuscrit et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

À Isabelle PIN,

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps que vous m'avez consacré.

À Dylan AISSI,

Pour le temps consacré à m'avoir aidée dans la manipulation de R, qui m'aura donné beaucoup de fil à retordre ainsi que pour les explications concernant la méthylation.

À Anne BOUDIER,

Qui a pris de son temps afin de m'expliquer l'étude EGEA et pour son accueil.

À ma famille et amis,

Qui m'ont soutenue tant bien que mal au cours de mes études et de la rédaction de ma thèse. Un clin d'œil spécial à Xavier sans qui je n'aurai très probablement jamais fini mes études et qui a dû s'armer de patience aux cours de cette dernière année d'étude.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	7
ABRÉVIATIONS.....	9
1. Introduction.....	10
1.1. L'allergie : définition, données épidémiologiques et mécanismes.....	10
1.2. L'asthme : définition, hétérogénéité phénotypique et traitements.....	11
1.3. Asthme et maladies allergiques : étiologie.....	12
1.4. Epigénétique et allergies.....	13
2. Hypothèses de travail et objectifs.....	17
3. Population et méthodes.....	18
3.1. Population.....	18
3.2. Description des principales variables.....	19
3.2.1. Taux d'IgE totales.....	19
3.2.2. Taux d'IgE spécifiques.....	19
3.2.3. Méthylation.....	20
3.3. Analyses statistiques.....	21
3.3.1. Stratégie d'analyse.....	21
3.3.2. Modèle de régression utilisé et tests.....	22
3.3.3. Facteurs de confusion.....	23
3.3.4. Correction pour les tests multiples.....	23
3.3.5. Analyses de sensibilité.....	23
4. Résultats.....	25
4.1. Description de la population.....	25
4.2. Impact de l'âge, du sexe et du tabac sur le taux d'IgE totales.....	26
4.3. Approche par gène candidat.....	27
4.3.1. Gène <i>LPCAT2</i>	27

4.3.2.	Gène <i>IL-5Ra</i>	28
4.3.3.	Gène <i>IL-4</i>	29
4.4.	Approche EWAS	30
4.4.1.	Résultats du modèle binomial mixte	30
4.4.2.	Analyse d'enrichissement.....	32
4.4.3.	Differentially methylated regions (DMR)	33
5.	Discussion	34
5.1.	Principaux résultats	34
5.2.	Forces et faiblesses de l'étude	34
5.3.	Interprétation des résultats	36
5.4.	Conclusion	40
6.	Conclusion.....	41
	BIBLIOGRAPHIE	43

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Description des trois gènes sur lesquels portent l'approche candidate	22
Tableau 2 : Description des sujets de l'étude avec les données de méthylation à EGEA1 et EGEA2.....	26
Tableau 3 : Description statistique des facteurs de confusion concernant les IgE totales dans la population d'étude	26
Tableau 4 : Résultats obtenus concernant les taux d'IgE totales et le niveau de méthylation des gènes LPCAT2, IL-5Ra et IL-4 pour l'approche par gène candidat.....	27
Tableau 5 : Résultats obtenus concernant la sensibilisation allergénique à Der p 1 et Der p 2 pour le gène LPCAT2	27
Tableau 6 : Résultats obtenus concernant la sensibilisation allergénique à Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1 pour le gène de l'IL-5Ra	28
Tableau 7 : Description des données de méthylation de la population pour les gènes LPCAT2, IL-5Ra et IL-4	29
Tableau 8 : Distribution des valeurs p et FDR obtenus suite à l'analyse EWAS	31
Tableau 9 : Description des 40 sites CpG qui avaient une valeur p comprise entre 10^{-5} et 10^{-7} lors de l'étude EWAS	31
Tableau 10 : Résultats obtenus lors de l'analyse d'enrichissement avec un seuil de valeur p de 10^{-4} suite à l'analyse EWAS.....	32
Tableau 11 : Résultats de l'analyse DMR obtenus sur les valeurs p du rapport de vraisemblance ayant un seuil de 10^{-4}	33

Figure 1 : Enzymes impliquées dans la méthylation de novo et héritée chez l'homme	13
Figure 2 : Fonction des îlots CpG présents dans le promoteur d'un gène.	14
Figure 3 : Exemple de régions composant l'ADN	24
Figure 4 : Ensemble des éléments constituant un îlot CpG.....	24
Figure 5 : Diagramme de flux de la population d'étude	25
Figure 6 : Plot du profil de méthylation en fonction du taux d'IgE totales pour le site CpG chr5 : 132009796	29
Figure 7 : Boxplot du profil de méthylation en fonction du taux d'IgE spécifique à l'allergène Der p 2 pour le site CpG chr5 : 132009796.....	30
Figure 8 : Manhattan plot obtenus pour l'étude EWAS du lien entre la méthylation et le taux d'IgE totales chez les adultes asthmatiques	31

ABRÉVIATIONS

ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	:	Acide RiboNucléique
CPA	:	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CpG	:	Di-nucléotide formé d'une Cytosine et d'une Guanine séparée par un phosphate (5'CpG'3)
DMR	:	Differentially Methylated Regions
EGEA	:	Etude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme, l'hyperréactivité bronchique et de l'Atopie
EVADA	:	Etude de l'évolution à long-terme de l'asthme de l'adulte
EWAS	:	Epigenome Wide Association Study
FDR	:	False Discovery Rate
GWAS	:	Genome Wide Association Study
IgE	:	Immunoglobuline E
IL	:	Interleukine
IFN	:	Interféron
ITS	:	Immunothérapie spécifique
LPCAT2	:	Lysophosphatidylcholine Acétyltransférase 2
MCC-Seq	:	Methyl-C Capture Sequencing
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
SNP	:	Single-Nucleotide Polymorphism
Th	:	Lymphocyte T helper
TNF α	:	Tumor Necrosis Factor α
VEMS	:	Volume Expiratoire Maximal Seconde

1. Introduction

1.1.L'allergie : définition, données épidémiologiques et mécanismes

La réaction allergique se définit comme : « *une réaction anormale, excessive de l'organisme, à une substance nommée allergène, auquel il est particulièrement sensible* » (1). Ces allergènes peuvent être répartis en trois classes : les pneumallergènes, les trophallergènes et les allergènes de contact (1). Dans les pays dont la prévalence des maladies allergiques est importante, comme le Royaume-Uni, jusqu'à 40% de la population serait sensibilisée aux allergènes communs, c'est-à-dire présente une production anormalement élevée en immunoglobulines E (IgE) spécifiquement dirigées contre un ou plusieurs allergènes de pollens, d'acariens ou encore d'animaux (2). Les IgE sont des anticorps composés de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères. Ils comportent 4 domaines constants spécifiques aux IgE et des domaines variables responsables de la spécificité antigénique (Annexe 1). Les IgE sont le principal médiateur des maladies allergiques qui peuvent se manifester par différents symptômes : dermatite atopique, eczéma, rhinite, asthme, allergie alimentaire, urticaire ou encore conjonctivite. L'allergie représente selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la 4^{ème} maladie au rang mondial. En France, il est estimé qu'un individu sur quatre dans la population générale serait allergique (3, 4).

Le mécanisme allergique survient en deux temps :

- Après le premier contact avec l'organisme, l'allergène est présenté aux lymphocytes T par une cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Cela induit la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T helper 1 (Th1) ou encore en lymphocytes T helper 2 (Th2) qui synthétisent notamment les interleukines (IL) 4, 5 et 13. Un déséquilibre dans la balance Th1/Th2 en faveur des Th2 serait impliqué dans la pathogénèse des maladies allergiques (5). Les Th1 ont la capacité de synthétiser de l'interféron γ (IFN) régulant négativement l'activation des Th2 (2). Quant aux lymphocytes Th3 et T reg, ils inhibent les sous-groupes Th1 et Th2 en synthétisant l'IL-10 et le *transforming growth factor* β . La production d'IL-4, 13 et l'interaction entre les lymphocytes B et T conduisent à la différenciation des lymphocytes B. Ces lymphocytes B différenciés produisent alors des IgE qui peuvent se fixer à deux types de récepteurs : le Fc ϵ RI de haute affinité (exprimé par les mastocytes, polynucléaires

basophiles et les CPA) et le FcεRII de basse affinité (présenté par les polynucléaires éosinophiles, macrophages, cellules dendritiques et les plaquettes) (6).

- Lors du second contact, l'allergène est reconnu par les IgE déjà présentes à la surface membranaire des cellules telles que les mastocytes. Après fixation de l'allergène, le récepteur va se dimériser, activant la cellule et libérant des médiateurs de l'inflammation ainsi que des cytokines (6) (Annexe 2). Par exemple, le *tumor necrosis factor α* (TNF), l'IL-13, 4 et 5 vont activer les éosinophiles et induire leur recrutement.

L'ensemble de ces mécanismes vont être responsables de la manifestation de symptômes qui prendront différentes formes, dont l'asthme qui fera l'objet de ce travail.

1.2.L'asthme : définition, hétérogénéité phénotypique et traitements

L'asthme est défini par « *des antécédents de symptômes tels que sifflements respiratoires, oppression thoracique, rhumes, qui varient dans le temps et en intensité avec un débit expiratoire limité* » (7). C'est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes caractérisée par des symptômes spécifiques de brève durée, spontanément réversibles ou sous l'effet d'un traitement (8). L'OMS estime que 300 millions de personnes souffrent d'asthme dans le monde. En France, la prévalence est estimée à 9 % pour les enfants et près de 7 % pour les adultes. L'asthme reste une maladie grave, responsable de 43 000 hospitalisations entre 2005 et 2007 en France (9).

L'asthme est une maladie hétérogène englobant plusieurs phénotypes dont certains, comme par exemple l'asthme allergique *versus* l'asthme non allergique, ont été identifiés depuis longtemps. L'asthme allergique survient majoritairement durant l'enfance où il est souvent associé à des antécédents personnels ou familiaux de maladies allergiques (7). Entre un tiers et la moitié des cas d'asthme de l'adulte seraient associés à la sensibilisation allergique, selon l'étude multicentrique *European Community Respiratory Health Study* (10). La présence d'une sensibilisation allergique peut être identifiée par un test cutané ou par une mesure des taux d'IgE spécifiques (avec un seuil de positivité fixé supérieure à 0,35 kU/l). Le taux d'IgE totales est quant à lui un mauvais test de dépistage de l'allergie chez les sujets asthmatiques (11).

La première mesure dans la prise en charge de l'asthme est l'éviction des allergènes puisque leurs expositions représentent un facteur de non contrôle (8, 12). La prise en charge thérapeutique de l'asthme est basée sur un traitement de crise, en cas de symptômes, et sur un traitement de fond afin de limiter la survenue et l'intensité des symptômes. En cas de crise ou d'exacerbation asthmatique, un traitement par agoniste β 2-mimétique d'action rapide sera utilisé en première intention. Le traitement de fond de l'asthme repose sur la prise quotidienne de glucocorticoïdes par voie inhalée associés ou non à d'autres médicaments (ex : agonistes β 2-mimétiques de longue durée d'action, antagonistes des récepteurs aux leucotriènes ou la théophylline) en fonction du niveau de contrôle de la maladie (Annexe 3). Le contrôle de l'asthme est évalué selon la présence de symptômes diurnes, nocturnes, la fréquence du recours au traitement de secours, des exacerbations, la limitation dans les activités et le volume expiratoire maximal seconde (VEMS) (Annexe 4). En cas d'asthme non contrôlé réfractaire aux autres traitements, il est possible d'avoir recours à la corticothérapie par voie orale ou encore à une thérapie ciblée. Deux thérapies ciblées ont actuellement une autorisation de mise sur le marché en France : l'omalizumab en cas d'asthme allergique et le mépolizumab en cas d'asthme hyperéosinophilique (13). L'omalizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible les IgE circulantes permettant de réduire la fréquence des exacerbations ainsi que les symptômes chez les asthmatiques allergiques (14).

Dans l'asthme allergique, il est possible d'utiliser l'immunothérapie spécifique (ITS). L'ITS par voie sous-cutanée vis-à-vis d'allergènes sélectionnés peut représenter une stratégie thérapeutique efficace sur les symptômes de l'asthme et la consommation de médicaments. Cependant, des réactions locales (ex : éruption cutanée) et systémiques (ex : urticaire, choc anaphylactique) potentiellement graves peuvent survenir (15). Une alternative, visant à utiliser la voie sublinguale, permettrait de réduire la fréquence des effets indésirables graves tout en restant efficace sur l'amélioration des symptômes (16).

1.3.Asthme et maladies allergiques : étiologie

L'asthme et les maladies allergiques résultent d'interactions complexes entre des facteurs environnementaux, comportementaux et génétiques mais leurs identifications et leurs rôles respectifs restent mal compris (1, 17). L'exposition à des facteurs environnementaux, à différents âges de la vie, est impliquée dans le développement et les manifestations de

l'asthme. Des facteurs délétères (ex : le tabagisme actif ou passif, les expositions professionnelles ou les allergènes de l'environnement intérieur) et des facteurs protecteurs (ex : l'environnement à la ferme) ont été identifiés (18). Les nombreuses études de liaison et d'association génétique sur l'asthme ont permis d'apporter des éléments de compréhension de cette maladie. De nouveaux *loci* associés à l'asthme ont été mis en évidence par les études d'association pangénomique (GWAS). Ainsi, une trentaine de gènes seraient candidats pour l'asthme dont l'*IL-4* (5q31–33), *HLA-D*, *TNFA* (6p21), *FceRIβ* (11q13) ou encore *PHF-11* (13q14). De même, certains variants (*single-nucleotide polymorphism* (SNP)), comme celui identifié sur le gène de l'*IL-4* (IL4C–589T), seraient associés à un taux élevé d'IgE chez les asthmatiques (19). Ces variants génétiques confèrent une faible augmentation du risque et n'expliquent qu'une part de la composante familiale de l'asthme, moins de 5% selon la plus large étude pangénomique réalisée à ce jour (20). « L'héritabilité manquante » (soit la part de la contribution des facteurs génétiques pour un phénotype donné [héritabilité], qui n'est pas retrouvée) pourrait en partie résider dans les facteurs environnementaux partagés au sein des familles, avec des interactions gène-gène et gène-environnement.

Les mécanismes épigénétiques, qui contrôlent l'expression des gènes et qui peuvent être associés à des expositions environnementales, peuvent être également une source d'héritabilité manquante (21). Ces mécanismes, qui sont connus pour jouer un rôle dans la différenciation et la régulation des cellules T, sont particulièrement pertinents dans la pathogénie de l'asthme et de l'allergie (22–25).

1.4. Epigénétique et allergies

L'épigénétique est défini comme toute modification de l'activité des gènes non causée par une altération de la séquence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (25).

L'épigénétique intervient à travers les principaux mécanismes suivants : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les micro acide ribonucléiques (ARN) non codants (26). La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl sur un résidu cytosine appartenant à un di nucléotide formé d'une

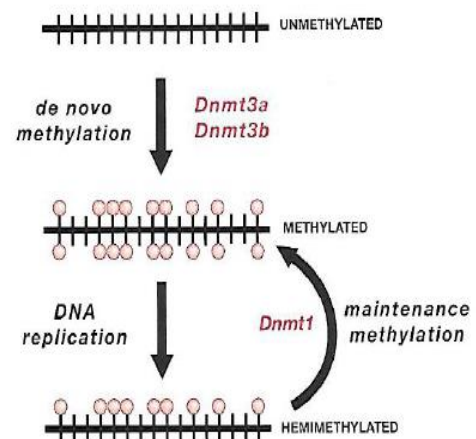


Figure 1 : Enzymes impliquées dans la méthylation de novo et héritée chez l'homme (25)

cytosine et d'une guanine séparée par un phosphate (5'CpG3' communément appelé site CpG) par un groupe d'enzymes, les ADN méthyl transférases (DNMT) (27). Soit ce mécanisme se réalise *de novo* (DNMT3a et 3b), soit il est hérité (DNMT1) (Figure 1). L'héritabilité de la méthylation de l'ADN permet au génome d'être stable dans le temps et constitue une forme de mémoire cellulaire (25).

Les fonctions de la méthylation dépendent de la localisation du site CpG dans le génome. Les sites CpG sont trouvés tout au long du génome, notamment au niveau des îlots CpG (régions composées de sites CpG répétés) où ils sont majoritairement non méthylés (25). Lorsque les îlots contenus dans les promoteurs ne sont pas méthylés, ils vont pouvoir interagir avec des facteurs de transcription permettant la transcription du gène en ARN messager (ARNm) et *vice versa* (Figure 2). La fonction des îlots CpG présents en dehors des promoteurs de gènes n'est pas totalement comprise (26, 27).

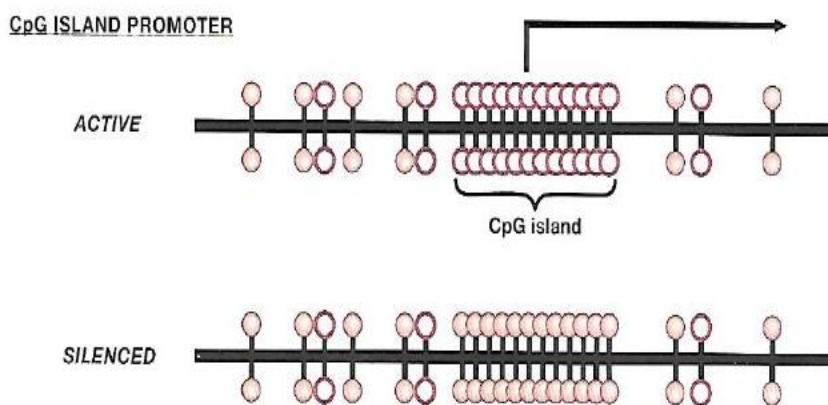


Figure 2 : Fonction des îlots CpG présents dans le promoteur d'un gène. Ce schéma montre que lorsque l'îlot CpG d'un promoteur est plutôt non méthylé (figure du haut), le gène sera actif et inversement quand l'îlot CpG est méthylé (figure du bas) (25).

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique principalement étudié. Ceci est lié à la facilité de mesure du niveau de méthylation de l'ADN notamment avec l'existence de biopuces. La biopuce Illumina, la plus utilisée à ce jour, permet d'analyser, selon les versions de cette puce, entre 450 000 et 900 000 sites CpG concourant au développement d'études portant sur l'épigénome (23). Dans la littérature, la méthylation de sites CpG associée à l'asthme portait sur des gènes comme l'*IL-4*, l'*IL-2*, l'*IFN-γ* ou encore *FOXP3*. Par exemple, une hyperméthylation de certains sites CpG du gène de l'*IFN-γ* serait associée à une diminution du niveau de production d'*IFN-γ* par les cellules T chez les sujets asthmatiques (24).

Les niveaux de méthylation de certains gènes ont d'ores et déjà été retrouvés comme étant associés aux taux d'IgE totales (Annexe 5). Une étude portant sur 355 sujets dont 175 sujets

asthmatiques a identifié 36 *loci* situés dans 34 gènes comme étant significativement associés aux taux d'IgE totales. Les six sondes CpG les plus fortement liées se situaient sur les gènes de *LPCAT2*, *IL-5Ra*, *ZNF22*, *L2HGDH*, *IL-4* et *SLC25A33*. Le niveau de méthylation a été étudié plus en détail sur ces gènes en comparant 24 sujets dont 16 sujets asthmatiques ayant un taux élevé ou faible d'IgE totales et 8 sujets témoins. Le niveau de méthylation était plus faible pour les sujets asthmatiques ayant un taux d'IgE élevé comparativement aux témoins. Seuls les gènes *LPCAT2* et *ZNF22* étaient associés à l'asthme, indépendamment du taux d'IgE totales (28). Une autre étude, portant sur la méthylation de 367 adultes sensibilisés a répliqué 12 sites CpG en lien avec un taux élevé d'IgE totales (défini comme étant supérieur à 200 kU/L) dont neuf associés à la sensibilisation allergique. Les deux principaux gènes identifiés étaient *ZFPM1* et *ACOT7* (29). Le gène *PRG2* (protéoglycane 2) a été identifié dans plusieurs études d'association avec les taux d'IgE totales (28–30) et le statut atopique (défini par un seuil d'IgE supérieur à 0,35 UI/ml pour au moins un allergène) (29, 30). Une autre étude, allant dans ce sens, a montré que *PRG2* était surexprimé lors d'une exposition aux allergènes d'acariens (31).

Au-delà de l'approche qui consiste à étudier de façon indépendante la méthylation de chacun des sites CpG, il est possible d'identifier des *differentially methylated regions* (DMR), en combinant les résultats de l'étude d'association pour différents sites CpG sur des intervalles définis *a priori*. En suivant cette approche, 11 DMR ont été trouvées significativement associées à un taux d'IgE totales élevé chez 97 enfants (6-12 ans) présentant un asthme allergique (32). Lors de cette même étude, 81 DMR étaient significativement associées à l'asthme. La région la plus fortement associée aux taux d'IgE totales était située sur le gène *TRMT12*, également identifié dans l'analyse sur l'asthme. Dans une autre étude, 16 autres DMR, incluant une région autour du gène *ACOT7*, étaient associées aux taux d'IgE totales chez des patients ayant une maladie allergique (29).

D'autres études d'association ont porté non pas sur les IgE totales, mais sur les IgE spécifiques. Une étude d'association comparant les niveaux de méthylation de l'ADN dans les lymphocytes B entre des sujets asthmatiques allergiques aux acariens et des témoins a identifié 451 sites CpG, dont un situé dans une région promotrice du gène *CYP26A1* (33). Pour cette région, il était observé un niveau élevé de méthylation ainsi qu'un faible niveau d'expression du gène *CYP26A1* chez les sujets allergiques. Ce gène code pour un cytochrome qui joue un rôle dans le métabolisme de l'acide rétinoïque, un régulateur du système immunitaire (33). L'équipe de Ek *et al* ont mis en évidence 331 *loci* associés aux

IgE spécifiques dont 22 de manière significative avec notamment *ZFPM1* et *ACOT7*, mais aucun n'était lié à l'asthme allergique ou à une autre maladie allergique (30).

La méthylation de l'ADN peut jouer un rôle non négligeable dans les maladies multifactorielles, comme l'allergie. L'étude de Liang *et al* indique que les trois sites CpG majeurs associés aux taux d'IgE totales (*SLC25A33*, *LPCAT2* et *L2HGDH*) expliquaient environ 13% de la variation du taux IgE totales dans leur étude (28). Il a été observé qu'une hypométhylation du gène *STAT6* (dont le rôle est connu dans la régulation du taux d'IgE totales) augmentait le taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques (34).

En conclusion, cette revue de la littérature met en évidence un rôle de la méthylation de l'ADN de plusieurs gènes sur le taux d'IgE totales. Certains gènes identifiés étaient *a priori* candidats dans l'asthme et l'allergie compte tenu de leurs rôles biologiques, tandis que d'autres gènes, tels que *LPCAT2*, *a priori* non candidats, ont été mis en évidence par des approches méthylome. L'épigénétique offre ainsi de nouvelles perspectives pour mieux comprendre et prendre en charge les pathologies multifactorielles comme l'asthme allergique.

2. Hypothèses de travail et objectifs

Ce travail de thèse repose sur l'hypothèse que les différents phénotypes de l'asthme, en particulier l'asthme allergique et l'asthme non allergique, seraient associés à des signatures épigénétiques spécifiques.

L'objectif général de la thèse était d'identifier les sites de méthylation associés aux taux d'IgE totales dans une population de sujets asthmatiques.

Les objectifs spécifiques étaient d'identifier des sites de méthylation différentiellement méthylés avec le taux d'IgE totales, en suivant deux approches complémentaires :

- **Approche pangénomique**, *Epigenome-Wide Association Study* (EWAS), qui présente l'avantage de pouvoir générer de nouvelles hypothèses.
- **Approche région candidate**, qui repose sur les résultats de la littérature, en ciblant les sites de méthylation au sein des gènes *a priori* candidats (*LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4*). Pour cette approche, les réponses IgE-spécifiques aux allergènes majeurs, soit acariens (Der p 1, Der p 2), phléole (Phl p 1) et chat (Fel d 1), ont également été étudiées.

3. Population et méthodes

3.1. Population

L'étude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme, l'hyperréactivité bronchique et de l'Atopie (EGEA) combine une étude cas-témoin et une étude familiale qui comprend au total 2047 sujets répartis en trois groupes : des cas asthmatiques, leurs apparentés au premier degré et des témoins. L'étude EGEA a été initiée au début des années 1990 (EGEA1, 1992-1995) ; 388 cas asthmatiques, enfants et adultes, ont été recrutés lors d'une consultation en pneumologie dans un des cinq centres français participant à l'étude (Paris, Lyon, Marseille, Montpellier et Grenoble). Les sujets ont été définis comme asthmatiques en cas de réponse positive à quatre questions du questionnaire : « avez-vous déjà eu des crises d'étouffement au repos avec des sifflements dans la poitrine ? », « avez-vous déjà eu des crises d'asthme ? », « si oui, ce diagnostic a-t-il été confirmé par un médecin ? », « avez-vous eu une crise dans les 12 derniers mois ? » (18). Leurs 1244 apparentés au premier degré ont été invités à participer à l'étude, 415 témoins ont été sélectionnés sur liste électorale pour les adultes et en consultation aux urgences pour les enfants. En moyenne 11 ans plus tard, la population a été invitée à participer à un premier suivi de l'étude (EGEA2, 2004-2007) ; 92% de la cohorte a complété un bref auto-questionnaire et 1601 participants (soit 77,1% de la cohorte initiale et 58 nouveaux apparentés) ont participé à un nouvel examen. À EGEA1 et EGEA2 le protocole incluait des questionnaires sur la santé et l'environnement posés par un enquêteur ainsi qu'un examen comprenant une prise de sang (numération formule sanguine, IgE totales et spécifiques, constitution d'une biobanque), des tests cutanés à 11 allergènes (12 à EGEA2), une exploration fonctionnelle respiratoire et un test d'hyperréactivité bronchique. Un nouveau suivi par auto-questionnaire a été réalisé entre 2011 et 2013, soit environ 20 ans après le recrutement (EGEA3). Un excellent taux de participation a été atteint (79%).

Ce travail portait sur 357 adultes asthmatiques à EGEA2 sélectionnés *a priori* dans le cadre du projet EVADA « Etude de l'évolution à long-terme de l'asthme de l'adulte » (PHRC 2012 ; PI : I Pin et V Siroux), pour lesquels les données de méthylation à l'échelle du génome étaient disponibles. Le projet EVADA ayant pour objectif d'étudier l'évolution au long cours de l'asthme de l'adulte, 241 adultes asthmatiques à EGEA1, revus à l'occasion des deux

suivis (EGEA2 et EGEA3) et ayant de l'ADN disponible à EGEA1 et EGEA2 ont été sélectionnés. Compte tenu de la possibilité d'étendre les mesures de méthylation à près de 600 échantillons, la méthylation a été déterminée pour 116 adultes asthmatiques supplémentaires à EGEA2. Ainsi, le méthylome a été mesuré pour 599 échantillons chez 357 adultes asthmatiques, soit pour 241 sujets à deux reprises (EGEA1 et EGEA2) et pour 116 sujets une seule fois à EGEA2.

3.2. Description des principales variables

3.2.1. Taux d'IgE totales

Les taux d'IgE totales ont été mesurés dans le même laboratoire d'analyses. Ils ont été exprimés en unités internationales (1 UI = 2,4 ng) puis transformés en logarithme compte tenu de la distribution statistique log-normale de ce paramètre (6). L'analyse principale a été réalisée avec le taux d'IgE totales considéré en variable continue.

3.2.2. Taux d'IgE spécifiques

Les taux d'IgE spécifiques ont été mesurés avec la biopuce multi-allergénique développée dans le cadre du projet Européen PRCD7 Medall (35). Cette biopuce permet de mesurer les taux d'IgE sériques spécifiques à 150 allergènes dont 70 pneumallergènes (acariens, animaux, pollens) et 76 allergènes alimentaires. Ce dosage a été réalisé exclusivement pour la population EGEA2.

Dans cette étude, l'analyse a porté plus précisément sur les taux d'IgE spécifiques à certains allergènes, identifiés comme facteurs de risque d'asthme (4, 12) et sélectionnés car associés à une forte sensibilisation allergénique dans notre population d'étude :

- **Der p 1** (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) et **Der p 2** sont les allergènes majeurs de l'acarien domestique appartenant respectivement au groupe 1 (cystine protéase qui permet le passage membranaire au niveau des alvéoles) et 2. Ils sont présents au sein des particules fécales des acariens. Leur taille est d'environ 10 µm de diamètre, ce qui leur permet d'atteindre les voies respiratoires. En France, il est estimé que 85

à 100 % des patients allergiques ont des IgE anti-Der p 1 et 63 à 96% ont des IgE anti-Der p 2 (36).

- **Fel d 1** (*Felis domesticus*) est l'allergène majeur du chat. Il est produit par les glandes salivaires et sébacées et se retrouve sur la peau et les follicules pileux. Cet allergène est très répandu, il a été trouvé à des niveaux quantifiables dans toutes les maisons sans chat. Environ 23% des particules d'allergène Fel d 1 ont un diamètre inférieur à 5 µm et sont donc susceptibles d'être inhalés jusqu'aux alvéoles (37). Le rôle de Fel d 1 reste controversé dans le développement de l'asthme (10, 12).
- **Phl p 1** (*Phleum pratense*) est l'allergène majeur de la phléole des prés. Il provient du pollen de phléole de la famille des *Poaceae* (graminée) et il possède une réactivité croisée avec les autres espèces appartenant aux *Poaceae*. Ainsi les IgE anti-Phl p 1 sont identifiés dans 90 % des cas sensibilisés. La sensibilisation à la phléole des prés est courante et concernerait plus de 20% de la population mondiale (38).

L'analyse principale a été faite sur les taux d'IgE spécifiques en variable binaire. Le seuil de 0,3 UI/ml (<0,3 vs. ≥0,3 UI/ml) a été choisi à partir des études antérieures (39).

3.2.3. Méthylation

Les données de méthylation ont été obtenues par MethylC-Capture Sequencing (MCC-Seq) sur sang total. Cette méthode permet d'obtenir un séquençage du méthylome sur l'ensemble du génome pour près de quatre millions de sites CpG incluant des régions régulatrices telles que des *enhancers*. Le MCC-Seq intègre également les sites CpG de la biopuce Illumina 450k, qui est la puce la plus utilisée dans les études de méthylome (40).

La méthode d'analyse utilisée consistait en la séparation d'ADN en fragments de 300 à 400 paires de bases. Ces fragments ont ensuite été traités par bisulfite permettant aux cytosines non méthylées d'être converties en thymines (celles méthylées restaient inchangées). Une amplification des séquences traitées par *polymerase chain reaction* (PCR) a été réalisée et les *reads* ont été alignés sur le génome de référence. Une phase d'amplification et de séquençage a été réalisée. Durant ces différentes étapes, un nettoyage des données a été effectué afin de réduire les biais expérimentaux (40). Au final, cela a permis d'obtenir le nombre de *reads* méthylés et non méthylés pour chaque site CpG et chaque individu.

L'analyse statistique a été conduite sur les sites CpG pour lesquels les données de méthylation étaient disponibles pour plus de 100 sujets.

3.3. Analyses statistiques

3.3.1. Stratégie d'analyse

Une analyse descriptive a été réalisée sur l'ensemble de la population de l'étude : âge, sexe, indice de masse corporelle (rapport de la masse en kg sur la taille en m² permettant d'apprécier la corpulence des sujets : maigreur si <20 ; normal si [20-25[; surpoids voire obésité si ≥ 25), tabagisme (fumeurs *versus* non-fumeurs) et activité de la maladie asthmatique (crises d'asthme ou traitement pour l'asthme au cours des 12 derniers mois). Des tests bilatéraux de comparaison de moyennes (test de Student), de corrélation (test de Pearson), d'indépendance (test du Chi 2) ont été utilisés pour analyser les facteurs de confusion.

Dans le cadre de cette étude, deux approches ont été suivies :

- sur **l'épigénome entier** (EWAS), qui consiste à estimer successivement pour chaque site CpG, l'association entre le niveau de méthylation et le taux d'IgE totales. Ici, la méthylation a été étudiée sur l'ensemble du génome des cellules du sang afin d'identifier une association entre le niveau de méthylation des sites CpG et le taux d'IgE totales. Cette analyse a été réalisée sur les données de méthylation issues des sujets asthmatiques adultes à EGEA2 ainsi que sur leurs données de méthylation obtenues à EGEA1 afin d'augmenter la puissance statistique.
- par **gène candidat**, qui consistait en la sélection et l'analyse de gènes dont les propriétés ou les produits protéiques sont supposés jouer un rôle dans un comportement physiologique particulier voire une maladie génétique (ici les taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques). Les gènes ont été sélectionnés en se basant sur les résultats obtenus par l'équipe de Liang *et al.* Cette étude met en avant des sites CpG fortement associés aux taux d'IgE totales (28). Les sondes correspondant aux gènes *LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4* à ± 10 kb ont été retenues

(Tableau 1). L'analyse a été réalisée sur les taux d'IgE totales et spécifiques aux allergènes Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1.

Tableau 1 : Description des trois gènes sur lesquels portent l'approche candidate

Gène	Chr	Sonde	Site CpG de l'équipe de Liang <i>et al</i> (Build 36)	Intervalle étudié dans l'étude (Build 37)
LPCAT 2	16	cg01998785	55 542 709	55 533 736 – 55 619 692
IL-4	5	cg26787239	132 008 525	131999808 – 132028185
IL-5Ra	3	cg08404225, cg10159529	3 151 900, 3 152 530	3102 321 – 3161516

3.3.2. Modèle de régression utilisé et tests

Un modèle binomial mixte a été utilisé pour tester l'association entre la méthylation d'un site CpG et les taux d'IgE totales (mis sous forme de log décimal) ou spécifiques (sous forme binaire). Ce modèle permet de prendre en compte dans l'analyse le nombre de *reads* (qui varie d'un site à un autre) et estime ainsi la probabilité de succès (nombre de *reads* méthylés vs. nombre de *reads* total). Un modèle mixte à effet aléatoire sur l'intercept a été utilisé pour prendre en compte la dépendance des observations (données répétées pour certains sujets et données familiales). Les variables quantitatives continues (taux d'IgE totales, âge et proportion de leucocytes) ont été centrées-réduites pour la convergence du modèle. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 3.2.2). La fonction `glmer` du package `lme4` a été utilisée pour le modèle binomial.

L'analyse de la méthylation a été réalisée sur les cellules du sang total. Le niveau de méthylation de l'ADN variant en fonction du type cellulaire, les données de méthylation ont été ajustées en fonction de la proportion des différents types de leucocytes (neutrophiles, basophiles, lymphocytes, éosinophiles et monocytes) pour s'affranchir de ce biais potentiel. Ainsi, la proportion de leucocytes a été incluse dans le modèle en tant que covariable. Le modèle utilisé est le suivant :

`glmer (méthylation & non méthylation ~ taux d'IgE + (1 | parenté) + (1 | individu) + âge + sexe + tabac + proportion de leucocytes).`

Un test de rapport de vraisemblance a été réalisé entre le modèle binomial mixte avec et sans le taux d'IgE. Ce test est plus puissant pour de faibles effectifs que le test de Wald. Le test de Wald a également été effectué afin d'évaluer la significativité de la valeur β . Ces deux

tests permettent de tester statistiquement l'association entre les IgE et le niveau de méthylation. Les valeurs p présentées par la suite correspondent à celles issues du test de rapport de vraisemblance. Les résultats des analyses sont exprimés en valeur β (avec leur écart-type). La valeur β estime la variation de la méthylation pour l'augmentation d'une unité du taux d'IgE (cela signifie qu'une augmentation du taux d'IgE totales est associée à une hyperméthylation du site CpG quand $\beta > 0$, et, inversement à une hypométhylation du site CpG quand $\beta < 0$). Le niveau de méthylation, présentée dans les figures, a été calculé selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Nombre de reads méthylés}}{(\text{Nombre de reads méthylés} + \text{nombre de reads non méthylés})}$$

3.3.3. Facteurs de confusion

L'âge, le sexe et le tabac sont connus pour influencer la méthylation et les taux d'IgE totales (4, 6, 18, 24, 27). C'est pourquoi, ils ont été définis comme facteurs de confusion et ont été ajoutés comme covariables dans le modèle de régression. Le tabac a été considéré comme variable binaire en fonction du statut fumeur ou non-fumeur. L'âge a été utilisé sous forme de variable quantitative continue.

3.3.4. Correction pour les tests multiples

Les valeurs p obtenues à partir du modèle binomial mixte (rapports de vraisemblance) ont été corrigées en fonction du nombre de sites CpG testés pour chaque analyse en utilisant la méthode *false discovery rate* (FDR) de Benjamini & Hochberg (41). Par conséquent, pour l'approche par gène candidat (*LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4*), les valeurs p ont été corrigées sur respectivement 120, 60 et 79 sites et pour l'approche EWAS sur 2 815 708 sites. Le seuil de significativité a été fixé à 0,05.

3.3.5. Analyses de sensibilité

Une analyse de sensibilité a été réalisée pour l'approche par gène candidat avec la variable taux d'IgE totales considérée en tant que binaire selon la médiane. Au total, six analyses statistiques par site CpG ont été exécutées au cours de cette approche.

Pour l'approche EWAS, deux tests supplémentaires ont été conduits :

- Une **analyse d'enrichissement** portant sur les régions génomiques a été réalisée en utilisant un test exact de Fischer. L'ADN est composé de plusieurs régions telles que les *enhancers*, les îlots CpG, les introns ou encore les exons (Figure 3). Les îlots CpG comportent eux-mêmes différents éléments comme les *shores* (Figure 4).

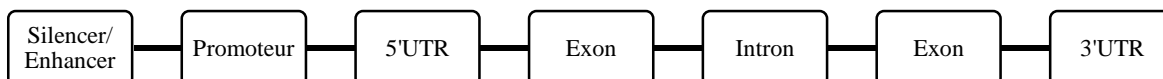


Figure 3 : Exemple de régions composant l'ADN



Figure 4 : Ensemble des éléments constituant un îlot CpG

Ce test permet d'évaluer la probabilité d'obtenir la configuration observée dans le tableau de contingence comprenant les deux entrées suivantes : le nombre de valeurs $p < 10^{-4}$ issues de l'analyse EWAS et la région à laquelle appartient le site CpG. Au final, ce test a permis d'estimer si les sites identifiés (ici avec p non corrigé $< 10^{-4}$) sont sur- ou sous-représentés dans certaines régions génomiques.

- Une **analyse des DMR** a été réalisée pour investiguer les sites CpG en amont des régions dans lesquelles un site CpG était associé (p non corrigé $< 10^{-4}$) dans l'EWAS. Cette analyse permet de calculer une valeur p (SLK Sidak- p) globale pour la région (250 paires de bases) qui prend en compte la corrélation entre les sites CpG. Ces valeurs p globales ont été corrigées pour des tests multiples en utilisant la correction Sidak (qui tient compte de la taille de la région et du nombre de régions) (42). Les DMR identifiées contenant une seule sonde ont été exclues *a posteriori*. Au final, cette approche DMR a permis de résumer l'information sur une région, en estimant l'effet conjoint de plusieurs sites CpG proches.

4. Résultats

4.1. Description de la population

Au total, 357 adultes asthmatiques ont été inclus dans l'étude, représentant 599 échantillons (pour 241 sujets, le méthylome a été évalué à 2 reprises, à EGEA1 et EGEA2). Le taux d'IgE totales était disponible pour tous les sujets. Les analyses portant sur les IgE spécifiques ont été réalisées sur 338 sujets correspondant à ceux pour lesquels le dosage des IgE spécifiques était disponible, sachant que ce dosage a été réalisé à EGEA2 exclusivement (Figure 5).

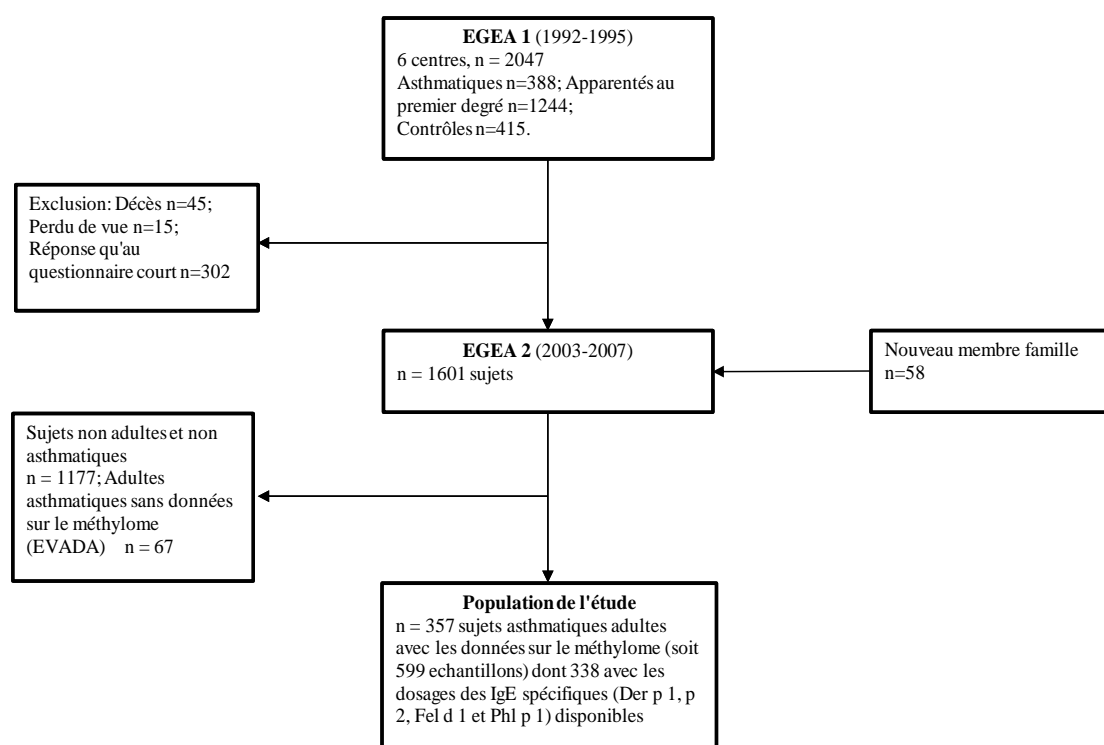


Figure 5 : Diagramme de flux de la population d'étude

La moyenne d'âge de la population d'étude à EGEA2 était de $43,1 \pm 15,8$ ans (de 20,2 à 75,9 ans) ; 48,9% étaient des femmes et 51,4% des fumeurs. Quant à la moyenne géométrique du taux d'IgE totales, elle était de 124,1 UI/ml à EGEA2. La proportion de sujets sensibilisés aux antigènes Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1 était respectivement de 38,8%, 42,3%, 35,5% et 43,5% (Tableau 2).

Tableau 2 : Description des sujets de l'étude avec les données de méthylation à EGEA1 et EGEA2

Variables	EGEA1		EGEA2	
	n total	Statistique	n total	Statistique
Nombre de sujets		242		357
Femme, n (%)	242	126 (52,1)	358	175 (48,9)
Age (moyenne ± écart-type)	241	38,1 ± 13,2	358	43,1 ± 15,8
Intervalle		15,5 - 64,5		20,2 - 75,9
Indice Masse Corporelle kg/m ² , n (%),	240		355	
< 20		45 (18,8)		42 (11,8)
[20-25[134 (55,8)		177 (49,9)
≥ 25		61 (25,4)		136 (38,3)
Fumeur, n (%),	240		358	
Non-fumeur		120 (50,0)		174 (48,6)
Fumeur		120 (50,0)		184 (51,4)
Asthme actif, n (%),	231		356	
Crise ou traitement au cours des 12 mois		199 (86,1)		340 (95,5)
IgE totales (log décimal), GM (IC95%)	242	182,8 (8,4 - 3062,0)	358	124,1 (7,5 - 2053,5)
IgE spécifiques (UI/ml) ≥ 0,3 UI/ml, n (%),	-	-	338	
Der p 1 IgE				131 (38,8)
Der p 2 IgE				143 (42,3)
Fel d 1 IgE				120 (35,5)
Phl p 1 IgE				147 (43,5)

GM correspond à la moyenne géométrique et IC95% correspond à l'intervalle de confiance à 95%

4.2. Impact de l'âge, du sexe et du tabac sur le taux d'IgE totales

Dans la population, les taux d'IgE totales diminuaient légèrement (coefficient de corrélation = -0,21, $p < 10^{-4}$) avec l'âge, tandis qu'ils étaient significativement plus élevés chez les hommes que chez les femmes (158,5 vs. 95,5 UI/ml, $p = 0,0009$) (Tableau 3). Il n'y avait pas de différence significative concernant les taux d'IgE totales entre les fumeurs et les non-fumeurs.

Tableau 3 : Description statistique des facteurs de confusion concernant les IgE totales dans la population d'étude

Variables	n total	IgE totales, GM (IC95%)	Valeur p
Sexe,	358		0,0009
Homme		158,5 (11,6 – 2172,7)	
Femme		95,5 (5,1 – 1794,7)	
Tabac,	358		0,29
Non-fumeur		104,7 (7,6 – 1435,5)	
Fumeur		144,5 (7,7 – 2716,4)	

GM correspond à la moyenne géométrique et IC95% correspond à l'intervalle de confiance à 95%

4.3.Approche par gène candidat

4.3.1. Gène *LPCAT2*

Dans notre étude, 121 sites CpG couvraient le gène *LPCAT2*, dont 116 ont été détectés chez plus de 100 sujets (Tableau 7). Le site CpG (55542709) n'était pas associé aux taux d'IgE totales ($p = 0,51$). Cinq sites CpG avaient une valeur p non corrigée inférieure à 5% mais la significativité disparaissait après correction pour les tests multiples (Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats obtenus concernant les taux d'IgE totales et le niveau de méthylation des gènes *LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4* pour l'approche par gène candidat.

Site CpG	n	Beta	SE	Valeur p non corrigée	Valeur p corrigée par le FDR
LPCAT2					
55543150	554	-0,54	0,20	0,008	0,64
55542709*	448	0,03	0,04	0,51	0,99
IL-5Ra					
3152486	434	0,10	0,03	0,002	0,14
3151899*	375	0,01	0,03	0,9	0,97
3152530*	452	0,05	0,04	0,24	0,93
IL-4					
132009796	413	-0,15	0,04	0,0001	0,009
132008525*	328	-0,13	0,08	0,10	0,71

SE correspond à l'écart-type et FDR (false discovery rate) correspond à la méthode de correction des valeurs p . * marque la sonde qui est trouvée comme associée aux taux d'IgE totales par l'équipe de Liang et al. Seuls les résultats obtenus concernant les sondes CpG de l'article de Liang et al et celles ayant la plus faible valeur p non corrigée sont présentés.

Aucune association au $FDR < 5\%$ n'a été mise en évidence concernant les quatre allergènes mais respectivement 6 et 7 sites CpG montraient des tendances (p non corrigé $< 5\%$) avec la sensibilisation allergénique à Der p 1 et Der p 2 dont 3 sites CpG (55537055, 55543225 et 55602957) étaient communs (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats obtenus concernant la sensibilisation allergénique à Der p 1 et Der p 2 pour le gène *LPCAT2*

Site CpG	Allergène	n	Beta	SE	Valeur p non corrigée	Valeur p corrigée par le FDR
IgE spécifique à l'allergène Der p 1						
55534253	Der p 1	310	0,36	0,15	0,02	0,50
55540720	Der p 1	124	-0,50	0,26	0,05	0,69
55573614	Der p 1	235	0,21	0,08	0,005	0,29
IgE spécifique à l'allergène Der p 2						
55533885	Der p 2	218	-0,24	0,12	0,05	0,75
55543727	Der p 2	334	0,43	0,20	0,03	0,75
55573318	Der p 2	139	-0,33	0,16	0,04	0,75
55600644	Der p 2	215	0,48	0,23	0,03	0,75

Sites CpG communs aux allergènes Der p 1 et 2						
55537055	Der p 1	224	-0,33	0,15	0,03	0,56
	Der p 2		-0,30	0,15	0,05	0,75
55543225	Der p 1	292	1,14	0,45	0,01	0,43
	Der p 2		1,08	0,45	0,02	0,75
55602957	Der p 1	185	0,78	0,26	0,003	0,29
	Der p 2		0,57	0,26	0,03	0,75

4.3.2. Gène *IL-5Ra*

Pour le gène de l'*IL-5Ra* l'analyse a porté sur 60 sites CpG détectés chez plus de 100 sujets (Tableau 7). Aucune association avec le taux d'IgE totales était significative au FDR<5%, y compris pour les deux sondes identifiées dans les travaux de Liang *et al*, mais une tendance était observée pour 3 sites CpG (3103016, 3152486 et 3160994) (Tableau 4).

Concernant la sensibilisation allergénique à Der p 1, Der p 2, aucune association au FDR<5% n'a été mise en évidence mais 4 sites CpG communs à Der p 1 et Der p 2 sites CpG montraient des tendances (p non corrigé <5%) (Tableau 6). La méthylation de respectivement 4 et 3 sites CpG était associée à la sensibilisation allergénique à Fel d 1 et Phl p 1, mais le FDR était non significative (Tableau 6).

Tableau 6 : Résultats obtenus concernant la sensibilisation allergénique à Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1 pour le gène de l'*IL-5Ra*

Site CpG	Allergène	n	Beta	SE	Valeur p non corrigée	Valeur p corrigée par le FDR
3102812	Der p 1	210	-0,20	0,09	0,03	0,39
	Der p 2		-0,20	0,09	0,03	0,26
3106771	Der p 1	336	-0,19	0,09	0,04	0,39
	Der p 2		-0,20	0,09	0,03	0,26
3123308	Der p 1	198	0,20	0,09	0,04	0,39
	Der p 2		0,23	0,09	0,01	0,26
3151679	Der p 1	125	0,36	0,17	0,03	0,39
	Der p 2		0,35	0,16	0,03	0,26
3102812	Fel d 1	210	-0,19	0,09	0,04	0,59
3106844	Fel d 1	263	-0,22	0,09	0,02	0,59
3151679	Fel d 1	125	0,36	0,17	0,04	0,59
3152916	Fel d 1	283	-0,53	0,25	0,03	0,59
3106801	Phl p 1	246	0,22	0,08	0,01	0,45
3106838	Phl p 1	279	0,20	0,09	0,04	0,61
3106842	Phl p 1	283	0,23	0,09	0,02	0,45

4.3.3. Gène *IL-4*

L'analyse a été conduite sur 79 sites CpG situés sur le gène *IL-4* (Tableau 7).

Tableau 7 : Description des données de méthylation de la population pour les gènes *LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4*

Variables	n total	Statistique
LPCAT2	121	
Sites CpG avec N détecté > 100, n (%)		116 (95,9)
Sites CpG avec N non 0, n (%)		121 (100)
Sites CpG avec N non 100, n (%)		121 (100)
Sites CpG avec N non 0 & 100, n (%)		121 (100)
IL-5Ra	60	
Sites CpG avec N détecté > 100, n (%)		60 (100)
Sites CpG avec N non 0, n (%)		60 (100)
Sites CpG avec N non 100, n (%)		60 (100)
Sites CpG avec N non 0 & 100, n (%)		60 (100)
IL-4	79	
Sites CpG avec N détecté > 100, n (%)		79 (100)
Sites CpG avec N non 0, n (%)		79 (100)
Sites CpG avec N non 100, n (%)		79 (100)
Sites CpG avec N non 0 & 100, n (%)		79 (100)

Un site CpG (132009796) était significativement associé aux taux d'IgE totales au seuil $FDR < 5\%$ ($FDR = 0,009$) (Tableau 4). Le site CpG 132009796, présent sur le chromosome 5, était majoritairement hyperméthylé et la répartition de la méthylation mesurée par MCC-Seq pour chaque sujet en fonction de son taux d'IgE totales est illustrée par la Figure 6. Le niveau de méthylation du site CpG 132009796 était inversement corrélé aux taux d'IgE totales.

Profil de méthylation en fonction du taux d'IgE totales pour le site CpG chr5 : 132009796

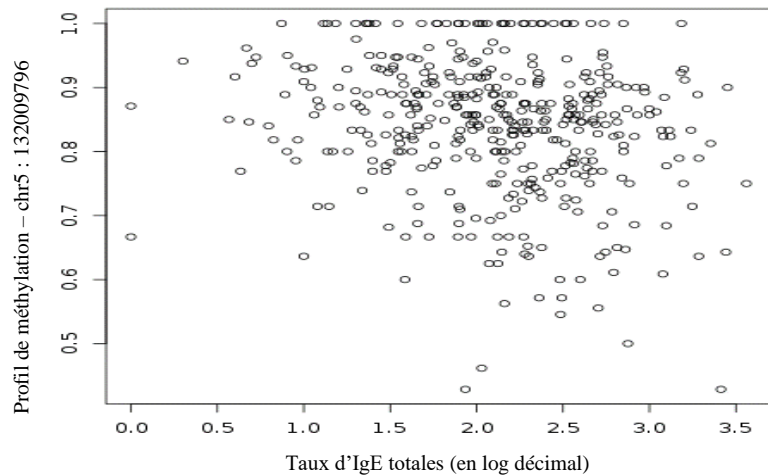


Figure 6 : Plot du profil de méthylation en fonction du taux d'IgE totales pour le site CpG chr5 : 132009796

Pour les quatre allergènes, aucune association au FDR<5% n'a été trouvée mais respectivement 9 et 10 sites CpG montraient des tendances (p non corrigé <5%) avec la sensibilisation allergénique à Der p 1 et Der p 2 dont 5 sites CpG (132009796 à 132010649) qui se trouvaient au sein de la même région du chromosome 5 (Annexe 6). Le niveau de méthylation du site 132009796 mesuré par MCC-Seq pour chaque sujet était légèrement inférieur lorsque le taux d'IgE spécifique à Der p 2 était supérieur ou égal à 0,3 UI/ml mais cela de manière non significative au FDR<5 (Figure 7). Une tendance, lorsque p est non corrigé, a été observée concernant la sensibilisation allergénique à Fel d 1 et Phl p 1 pour respectivement 3 et 2 sites CpG (Annexe 6).

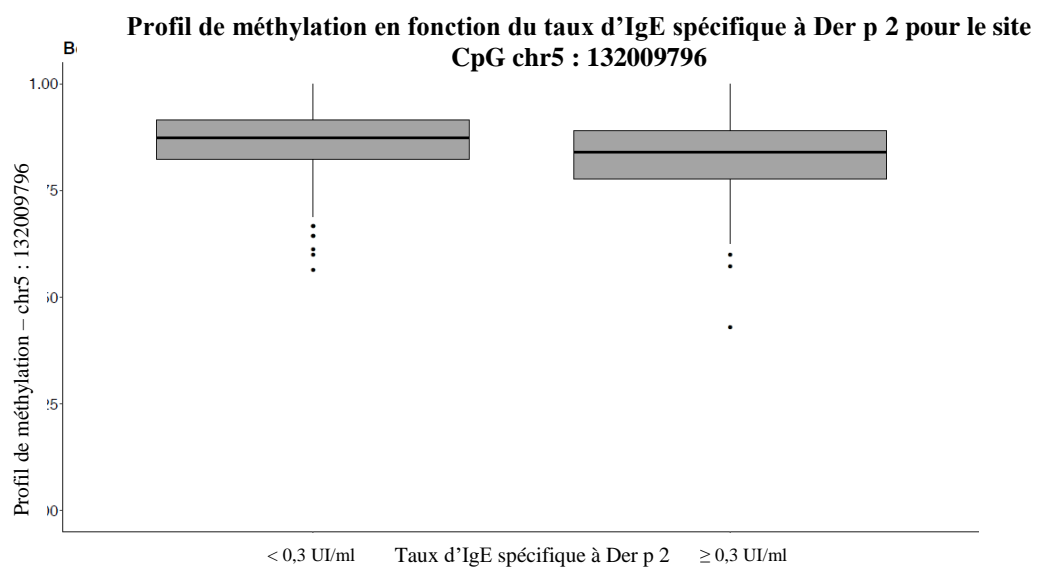


Figure 7 : Boxplot du profil de méthylation en fonction du taux d'IgE spécifique à l'allergène Der p 2 pour le site CpG chr5 : 132009796

4.4.Approche EWAS

4.4.1. Résultats du modèle binomial mixte

Avant correction des tests multiples, 140 038 sondes (Figure 8) ont été retrouvées associées aux taux d'IgE totales dont 5 qui avaient une valeur de p comprise entre 10^{-6} et 10^{-7} et 35 entre 10^{-5} et 10^{-6} (Tableau 8). Une description de ces 40 sites CpG figure dans le Tableau 9. Aucun site CpG n'a été retrouvé associé aux taux d'IgE totales après correction des tests multiples.

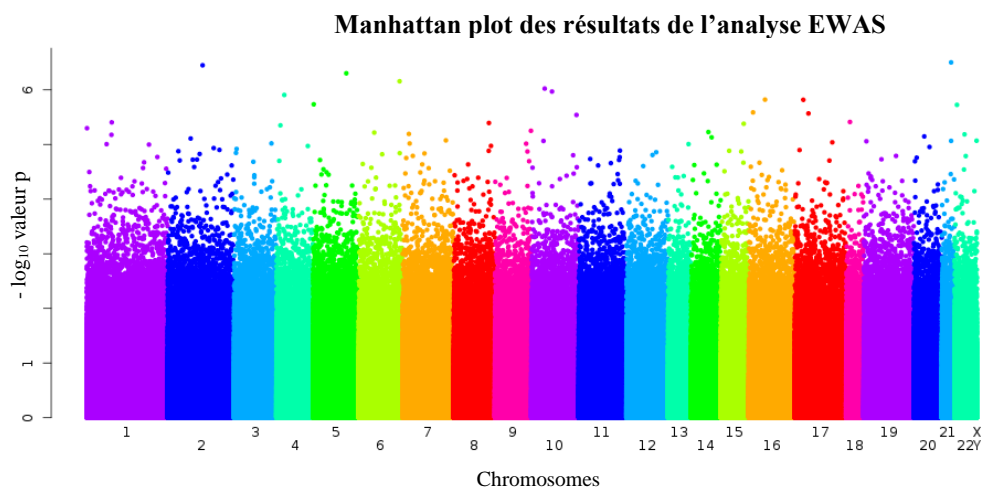


Figure 8 : Manhattan plot obtenu pour l'étude EWAS du lien entre la méthylation et le taux d'IgE totales chez les adultes asthmatiques

Tableau 8 : Distribution des valeurs p et FDR obtenus suite à l'analyse EWAS

Seuils	Valeur p non corrigée	Valeur p corrigée par le FDR
$[10^{-8} - 10^{-7}]$	0	0
$[10^{-7} - 10^{-6}]$	5	0
$[10^{-6} - 10^{-5}]$	35	0
$[10^{-5} - 10^{-4}]$	272	0
$[10^{-4} - 10^{-3}]$	2 547	0
$[10^{-3} - 10^{-2}]$	25 117	0
$[0,01 - 0,05]$	112 062	0
< 0,05	2 675 670	2 815 708

Tableau 9 : Description des 40 sites CpG qui avaient une valeur p comprise entre 10^{-5} et 10^{-7} lors de l'étude EWAS

Chr	Site CpG	Beta	SE	Valeur p	Gène	Localisation
Chr21	45628025	0,19	0,04	3,15E-07	-	-
Chr2	122018008	-0,59	0,12	3,55E-07	TFCP2L1	Intron
Chr5	149104715	0,23	0,05	4,98E-07	-	-
Chr6	168228753	0,33	0,07	6,96E-07	MLLT4	Intron
Chr10	38069784	0,37	0,08	9,47E-07	ZNF248	Intron
Chr10	74489461	-0,14	0,03	1,07E-06	MCU	Intron
Chr4	6198775	0,33	0,07	1,24E-06	JAKMIP1	Intron, 5'UTR
Chr16	23598601	0,49	0,10	1,51E-06	NDUFAB1	Exon
Chr17	8703364	0,14	0,03	1,52E-06	-	TTS1000
Chr5	433237	-0,26	0,05	1,84E-06	AHRR	Intron
Chr22	20863398	-0,13	0,03	1,88E-06	MED15	Intron, <i>south shore</i>
Chr16	1393793	0,20	0,04	2,59E-06	BAIAP3	Intron, îlot CpG, <i>south shore</i>
Chr17	21415527	-0,53	0,11	2,71E-06	C17orf51	Îlot CpG, <i>north shore</i>
Chr10	134703376	0,21	0,05	2,88E-06	TTC40	Intron
Chr18	13437903	0,13	0,03	3,88E-06	LDLRAD4	Intron

Chr1	26692028	0,16	0,04	3,94E-06	ZNF683	Intron
Chr8	142597651	0,13	0,03	4,04E-06	-	-
Chr15	90892480	0,46	0,10	4,17E-06	-	Exon, <i>north shelf</i>
Chr4	1949925	0,30	0,07	4,46E-06	WHSC1	Exon, intron, 3'UTR
Chr1	871620	-0,21	0,05	5,04E-06	SAMD11	Intron, îlot CpG
Chr9	140507021	-0,19	0,04	5,62E-06	ARRDC1	Intron
Chr14	92923543	-0,19	0,04	5,92E-06	SLC24A4	Intron
Chr6	40722349	0,13	0,03	6,06E-06	-	-
Chr7	2197717	0,16	0,03	6,40E-06	MAD1L1	Intron, <i>south shore</i>
Chr22	37603361	0,38	0,08	6,53E-06	SSTR3	Exon, îlot CpG
Chr1	26421442	-0,20	0,05	6,65E-06	-	-
Chr20	33133505	-0,41	0,09	7,11E-06	-	-
Chr14	99726688	-0,14	0,03	7,41E-06	BCL11B	Intron
Chr2	74618156	0,31	0,07	7,79E-06	DCTN1	Intron, 5'UTR, <i>north shore</i>
Chr7	150756322	0,34	0,08	8,41E-06	SLC4A2	Intron, 5'UTR, <i>north et south shore</i>
Chr22	50976581	-0,18	0,04	8,52E-06	-	-
Chr21	45628029	0,17	0,04	8,59E-06	-	-
Chr10	31924487	-0,28	0,06	8,62E-06	-	-
Chr19	1133446	-0,21	0,05	8,73E-06	SBNO2	Intron, TTS1500
Chr17	73823917	-0,22	0,05	9,13E-06	UNC13D	Exon, 3'UTR
Chr3	184504152	-0,11	0,03	9,56E-06	-	-
Chr7	2635408	0,11	0,02	9,58E-06	IQCE	Intron, <i>south shelf</i>
Chr9	138628097	-0,19	0,04	9,67E-06	KCNT1	Intron, îlot CpG, <i>south shore</i>
Chr13	113745560	-0,43	0,01	9,83E-06	MCF2L	Intron, îlot CpG, <i>south shelf</i>
Chr1	19209845	0,24	0,05	9,86E-06	ALDH4A1	Exon, îlot CpG

4.4.2. Analyse d'enrichissement

L'analyse d'enrichissement a permis de mettre en évidence que les sites CpG pour lesquels une association était suggérée ($p < 10^{-4}$) étaient plus souvent situés dans des introns ($p = 0,0003$) alors que les autres catégories étaient indépendantes de la valeur de p (Tableau 10). L'intégralité des résultats obtenus pour l'analyse d'enrichissement est présentée dans l'Annexe 7.

Tableau 10 : Résultats obtenus lors de l'analyse d'enrichissement avec un seuil de valeur p de 10^{-4} suite à l'analyse EWAS.

Localisation	Valeur p	Localisation cible et valeur $p \leq 10^{-4}$	Localisation cible et valeur $p > 10^{-4}$	Autre localisation et valeur $p \leq 10^{-4}$	Autre localisation et valeur $p > 10^{-4}$
Introns	0,0003	169	1249115	143	1566281
South shelf	0,09	34	240461	278	2574935
North shelf	0,16	32	240562	280	2574834

North shelf et south shelf sont les régions présentes à proximité d'un îlot CpG (Figure 4)

4.4.3. Differentially methylated regions (DMR)

L'analyse par région a permis d'identifier 11 DMR significativement associées aux taux d'IgE totales (Tableau 11). Parmi celles-ci, la région concernant le gène de l'*IL-17Ra* sur le chromosome 22 (SLK-Sidak $p = 0,0002$), une région régulatrice en lien avec l'histone H3K27 sur le chromosome 21 (SLK-Sidak $p = 5,32E-08$) et une région sur le chromosome 13 en amont du gène *TUBGCP3* (SLK-Sidak $p = 0,0002$) ont été identifiées. Un descriptif de chaque site CpG composant ces 3 DMR se trouve en Annexe 8.

Tableau 11 : Résultats de l'analyse DMR obtenus sur les valeurs p du rapport de vraisemblance ayant un seuil de 10^{-4}

Chr	Début	Fin	n sondes	SLK-Sidak p	Gène	Localisation
chr1	167013485	167013543	5	0,006	*MAEL	-
chr4	640439	640511	8	0,0007	PDE6B	Intron
chr7	154863058	154863098	6	0,001	HTR5A	Exon
	2548187	2548224	5	0,016	*GRIFIN	-
	2635350	2635409	5	2,98E-05	IQCE	Intron, <i>south shelf</i>
chr12	10096031	10096144	9	4,59E-10	CLEC2A	Exon
chr13	113242878	113242945	10	0,0002	*TUBGCP3	<i>South shore</i>
chr17	19627944	19628013	6	0,0007	*SLC47A2	Îlot CpG
chr19	17434538	17434569	4	0,03	ANO8	Exon, <i>north shelf</i>
chr21	45628003	45628075	6	5,32E-08	*C21orf33	H3K27Ac
chr22	17587749	17587798	6	0,0002	IL17RA	Intron, <i>north shore</i>

* correspond au gène qui est situé juste en amont de la région. SLK-Sidak p sont les valeurs p corrigées.

5. Discussion

5.1. Principaux résultats

Notre étude, basée sur une approche de séquençage permettant de mesurer la méthylation de façon plus précise que dans les études antérieures (4 millions de sites CpG), a permis d'identifier 11 nouvelles régions différentiellement méthylées en lien avec le taux d'IgE totales. Parmi les gènes situés dans ou proche de ces DMR, l'*IL-17Ra* et *TUBGCP3* sont des gènes particulièrement intéressants compte tenu de leurs rôles biologiques. L'analyse d'enrichissement a mis en évidence que les sites CpG, pour lesquels une association était suggérée avec le taux d'IgE totales (p non corrigée $< 10^{-4}$), seraient surreprésentés dans les introns.

À l'issue de l'approche candidate ciblant trois gènes (*LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4*) précédemment identifiés dans des études antérieures, un site CpG situé sur *IL-4* a été répliqué (FDR = 0,009) dans notre étude. L'approche candidate appliquée aux IgE spécifiques des allergènes Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1 n'a pas mis en évidence d'association statistiquement significative entre méthylation et taux d'IgE.

5.2. Forces et faiblesses de l'étude

Cette étude a été conduite sur une population de sujets asthmatiques caractérisée finement sur le plan individuel, phénotypique et biologique. Le dosage des IgE totales était disponible pour tous les sujets de l'analyse. Les IgE spécifiques ont quant à eux été mesurées avec une nouvelle technologie permettant le dosage simultané de 150 allergènes (35). Les données de méthylation ont été obtenues avec une nouvelle méthode de séquençage, couvrant une plus grande partie du génome (environ 5 fois plus) comparativement aux méthodes classiques (40). Cette méthode de séquençage offre l'opportunité d'explorer de nouvelles sondes notamment dans des régions régulatrices et ainsi de découvrir des régions jusqu'alors non investiguées dans les études d'associations sur le taux d'IgE totales et sur les IgE spécifiques.

Au cours de cette étude, deux approches complémentaires ont été réalisées : une analyse par gène candidat et une analyse sur l'épigénome entier. L'approche par gène candidat a permis d'étudier dans une population d'asthmatiques 3 gènes (*LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4*) identifiés

dans la littérature comme étant associés aux taux d'IgE totales (28). Pour aller plus loin, les sites CpG de ces 3 gènes ont également été analysés en lien avec la réponse IgE-spécifique aux allergènes les plus fréquemment retrouvés dans notre population (Der p 1, Der p 2, Fel d 1 et Phl p 1). L'approche EWAS permet quant à elle d'investiguer l'épigénome entier, offrant ainsi le potentiel de générer de nouvelles hypothèses, d'autant plus que cette étude est la première à être menée dans une population composée d'asthmatiques exclusivement. Une analyse d'enrichissement a été conduite en complément de l'approche EWAS afin de mieux caractériser l'emplacement au sein du génome de l'ensemble des sondes associées aux taux d'IgE totales. Une analyse DMR, permettant de combiner les résultats observés sur différents marqueurs physiquement proches, a par ailleurs été effectuée dans le but d'évaluer l'effet global de régions sur le taux d'IgE totales.

Les résultats obtenus n'ont pas été répliqués dans une population indépendante. Bien qu'une partie des résultats obtenus soit cohérent avec ceux déjà présents dans la littérature, notamment en ce qui concerne la méthylation de l'*IL-4* et *TUBGCP3* (28, 43, 44), les études réalisées jusqu'à présent ont été faites en suivant un *design* différent de la nôtre, en termes de méthode de mesure de la méthylation, de sites CpG analysés ou encore de population étudiée. Nos résultats nécessitent donc d'être répliqués dans une autre population.

Une limite, qui n'est pas propre à cette étude, est la difficulté d'interprétation des modifications épigénétiques observées. Il est connu que la méthylation d'un îlot CpG au sein d'un promoteur serait en faveur d'une absence d'expression du gène qui y est associé. Néanmoins, les choses sont à nuancer et plus complexes que cela. Les fonctions de la méthylation de l'ADN varient selon le type cellulaire ou encore la localisation du site CpG au sein du génome (intron, exon, promoteur, etc.). Des sites CpG, présents parmi des régions régulatrices, ont été mis en évidence dans cette étude mais le rôle de la méthylation en leur sein n'est pas encore élucidé. De ce fait, améliorer les connaissances sur le mécanisme de la méthylation de l'ADN permettrait de mieux interpréter les résultats obtenus lors d'analyses portant sur le méthylome.

5.3. Interprétation des résultats

Les résultats de notre étude révèlent 11 DMR, pour lesquelles l'association avec les taux d'IgE totales seraient suggérées, dont une région liée au gène de l'*IL-17Ra*, à notre connaissance, jamais identifiée précédemment. Cette région est située dans un intron et se compose de 6 sites CpG faiblement méthylés voire non-méthylés. Les résultats suggèrent qu'une hyperméthylation sur ce site s'accompagnerait d'une élévation du taux d'IgE totales. Il est à souligner qu'un polymorphisme (rs2241049) présent sur un site CpG situé juste en amont de cette région influence le niveau de méthylation de ce dernier (45). Néanmoins, il n'a pas été rapporté dans la littérature de lien entre ce polymorphisme et le taux d'IgE totales. Si ces résultats sont répliqués dans une autre étude, la méthylation d'une nouvelle région impliquant le gène de l'*IL-17Ra* pourrait être associée aux taux d'IgE totales chez les asthmatiques.

La voie de l'IL-17 posséderait un rôle clé dans certain phénotype d'asthme. Le gène de l'*IL-17Ra* (*Interleukin 17 Receptor A*) code pour une protéine transmembranaire ubiquitaire qui lie les cytokines de la famille de l'IL-17 (IL-17A et IL-17E). Cette fixation induirait le relargage de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6, l'IL-1 β , TNF- α , *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) ainsi que le recrutement et l'activation des polynucléaires neutrophiles (5, 46). Il a également été démontré que l'IL-17E (aussi appelée IL-25) stimulerait l'expression de l'IL-5, l'IL-13 et augmenterait le taux d'IgE totales sériques 24h après l'inhalation d'allergènes au niveau de la muqueuse bronchique chez des sujets asthmatiques allergiques (47). De manière intéressante, une étude suggère que les allergènes possédant une activité protéase induisent la production d'IL-25 par les cellules pulmonaires (48). Quant à l'IL-17A, il a été observé qu'elle était nécessaire au développement de l'asthme (49). Néanmoins, chez des modèles de souris asthmatiques allergiques, l'administration exogène d'IL-17 lors d'un test de provocation (exposition à des allergènes) régulerait négativement les effecteurs présents dans l'asthme allergique en diminuant le recrutement des polynucléaires éosinophiles et n'aurait pas d'impact sur les concentrations d'IgE (50).

Lors de l'administration d'un antagoniste de l'IL-17Ra sur des modèles de souris présentant une inflammation pulmonaire allergique, une diminution de l'inflammation pulmonaire, du taux d'IgE sérique et de l'hyper réactivité bronchique a été observée (51). Cette même étude a montré que le blocage de l'IL-17Ra sur des cellules musculaires lisses pulmonaires

humaines réduisait leurs contractions lors d'une exposition à l'acétylcholine. Chez l'homme, l'expression de l'IL-17Ra a été trouvée significativement plus élevée dans les polynucléaires éosinophiles de sujets asthmatiques allergiques que ceux de sujets allergiques ou contrôle (52). Ainsi, les données de la littérature laissent sous-entendre un rôle physiopathologique de la famille des IL-17 et de leurs récepteurs dans l'asthme allergique (53).

L'implication de l'IL-17Ra dans l'asthme allergique offre de nouvelles perspectives dans la prise en charge thérapeutique de ces patients. Le brodalumab, un traitement antagonisant l'IL-17Ra, est en cours d'étude chez des sujets asthmatiques ayant un asthme modéré à sévère non contrôlé. Pour évaluer son intérêt, une étude contrôlée randomisée en double aveugle a été conduite chez 302 sujets pour lesquels l'impact du brodalumab a été évalué sur l'expression clinique de l'asthme et sur la fonction ventilatoire avant et après bronchodilatation (54). Bien que le brodalumab ne présentait pas d'effet cliniquement significatif, un sous-groupe de sujets asthmatiques présentant une forte amélioration du VEMS post-bronchodilatation avait tendance à répondre positivement au brodalumab d'un point de vue clinique (54). De manière intéressante, ce sous-groupe était majoritairement composé de sujets atopiques. Si les résultats de cette étude se confirment, l'identification, par l'utilisation d'un biomarqueur de la voie de l'IL-17, des patients potentiellement répondeurs permettrait de proposer, comme pour l'omalizumab et le mépolizumab, une alternative thérapeutique reposant sur une thérapie ciblée pour un phénotype spécifique d'asthme.

Dans notre étude, la méthylation d'une région située en amont du gène *TUBGCP3* (*Tubulin Gamma Complex Associated Protein 3*) était inversement corrélée aux taux d'IgE totales et cela de manière significative. Le gène *TUBGCP3* code pour une protéine qui fait partie du complexe de la γ tubuline impliquée dans le cytosquelette. L'utilisation du gène *TUBGCP3* (entre autres) en tant que marqueur épigénétique prédictif de l'allergie respiratoire dans les cellules sanguines est actuellement protégée par un brevet (43). La méthylation de ce gène pourrait être un marqueur de l'asthme allergique, mais le lien entre ce DMR, l'expression du gène *TUBGCP3* et les IgE totales n'est pas totalement clair et doit être investigué plus précisément.

La méthylation du gène de l'*IL-4* semble liée aux taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques. Dans notre étude, le site CpG 132009796, présent sur le chromosome 5 au

niveau d'un exon du gène de l'*IL-4*, était majoritairement hyperméthylé, et inversement associé aux taux d'IgE totales. Les données de la littérature portent sur d'autres sites CpG au sein du gène de l'*IL-4* pour lesquels les associations semblent aller dans le même sens (28).

À propos des IgE spécifiques aux allergènes d'acariens Der p 1 et 2, il a été observé pour le site CpG 132009796 que la méthylation serait légèrement plus faible chez les sujets asthmatiques ayant un seuil d'allergènes $\geq 0,3$ UI/ml vs. un seuil de $< 0,3$ UI/ml mais cela de manière non significative. Cette même tendance a été observée dans la littérature chez des sujets présentant un asthme allergique (44). Le gène *IL-4* était moins méthylé chez les sujets asthmatiques par rapport aux cas contrôle et cette différence augmentait après exposition aux allergènes d'acariens mais n'était pas significative. De manière intéressante, la concentration d'*IL-4* était positivement corrélée au pourcentage de non-méthylation du promoteur (44).

Le gène *IL-4* code pour une cytokine, l'*IL-4* qui est produite par les lymphocytes T activés. L'*IL-4* possède plusieurs fonctions dans le système immunitaire qui s'exprimeraient notamment par l'intermédiaire de STAT6 et GATA3. Par exemple, elle est un cofacteur essentiel pour le switch isotypique vers la production d'IgE par les lymphocytes B (55). D'un point de vue clinique, l'expression de l'*IL-4* au niveau de la muqueuse bronchique serait positivement corrélée aux taux d'IgE totales mais non corrélée à la sévérité dans l'asthme allergique (56).

Des molécules ciblant l'*IL-4* comme l'altrakinecept ou le pascolizumab sont en cours d'évaluation dans le traitement de l'asthme (57,58). Au total, l'*IL-4* est connue pour jouer un rôle physiologique dans la synthèse des IgE et la méthylation de ce gène serait inversement corrélée aux taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques.

L'analyse d'enrichissement a permis de mettre en évidence que les sites CpG associés aux taux d'IgE totales (p non corrigé $< 10^{-4}$) étaient surtout présents au niveau des introns. Les introns, représentant la fraction non codante d'un gène, sont transcrits en ARNm puis excisés lors de l'épissage de l'ARNm immature. Le rôle de la méthylation des îlots CpG au sein du corps d'un gène n'est pas encore totalement élucidé. En général, il y a peu d'îlots CpG et ceux-ci sont non-méthylés (26). Il semblerait que la méthylation intervenant dans le corps d'un gène soit positivement corrélée à la transcription. En ce qui concerne les sites CpG en dehors des îlots, les introns seraient moins méthylés à hauteur de 5 à 17% que les exons (59). Une transition concernant le niveau de méthylation semble avoir lieu entre la limite exon-

intron, suggérant un rôle potentiel de la méthylation dans la régulation de l'épissage (26). Cette différence de méthylation permettrait de distinguer les introns des exons lors de l'épissage induisant la synthèse de variants d'épissage (59). Au final, la fonction de la méthylation des introns n'est pas encore connue même si des pistes se dégagent. Des études sont nécessaires pour éclaircir ce point.

Il existe des différences dans la méthodologie suivie entre notre étude et celle de la littérature notamment dans la mesure de la méthylation. Une étude comparant les résultats obtenus par la biopuce Illumina et par MCC-Seq observe qu'il y aurait une légère différence dans la corrélation du niveau de méthylation pour les deux méthodes (40). Or, la biopuce Illumina est principalement utilisée dans la littérature car plus simple à mettre en œuvre. L'équipe de Liang *et al*, utilisant la puce Illumina, a identifié les gènes *LPCAT2* et *IL-5* comme gènes associés aux taux d'IgE totale. Le gène *LPCAT2* (*lysophosphatidylcholine acétyltransférase*) code pour une enzyme essentielle à la formation du *platelet activating factor*, un médiateur lipidique pro-inflammatoire, tandis que le gène de l'*IL-5Ra* code pour le récepteur à l'*IL-5* stimulant la production et l'activation des polynucléaires éosinophiles. Dans notre étude, la méthylation d'aucune sonde codant pour ces gènes n'était associée aux taux d'IgE totales. Une des explications de ces résultats contradictoires pourrait résider dans les différences méthodologiques et le fait que la population de notre étude était composée exclusivement de sujets asthmatiques, une population *up*-régulée en ce qui concerne les IgE totales.

L'étude de la méthylation dans cette population de sujets asthmatiques révèle des signatures épigénétiques qui pourraient représenter une nouvelle approche pour la prise en charge de ces patients. Il pourrait être envisageable que des médicaments ciblant les mécanismes épigénétiques dans l'asthme à l'instar de certains médicaments à visée anti-cancéreuse (comme par exemple l'azacitidine ou le decitabine) voient le jour. Les épi-médicaments ont pour cible la famille des *histones déacétylases* (HDAC), les *histones méthytransférases*, les DNMT et les *bromodomain-containing proteins* (60). La majorité des médicaments en développement sont des inhibiteurs plus ou moins sélectifs d'une classe des HDAC pour le traitement de cancers. Néanmoins, certaines substances actives, comme le RVX-208 actuellement en essai clinique de phase II, cible le diabète de type 2 et l'athérosclérose (60). En parallèle de l'évaluation de ces nouvelles substances actives, les industriels développent des tests de diagnostic compagnon permettant de sélectionner les candidats au traitement. Par conséquent, il n'est pas exclu que la méthylation pourrait également servir de

biomarqueurs afin de définir des sous-groupes de sujets asthmatiques. Au final, cibler les mécanismes épigénétiques s'inscrit dans la logique d'une médecine personnalisée.

5.4. Conclusion

Notre étude a permis de mettre en évidence, à travers deux approches complémentaires, de nouvelles régions différentiellement méthylées impliquées dans le taux d'IgE totales ainsi qu'un nouveau site de méthylation concernant le gène de l'*IL-4* chez les sujets asthmatiques ; mais aucun site de méthylation n'a été identifié concernant les IgE spécifiques. Ces résultats appuient l'hypothèse de l'existence de signatures épigénétiques spécifiques à différents phénotypes d'asthme, en particulier, l'asthme allergique.

6. Conclusion

THÈSE SOUTENUE PAR : Anaïs MALPERTUIS

TITRE :

MÉTHYLATION ET IGE : APPROCHE MÉTHYLOME DANS UNE POPULATION DE SUJETS ASTHMATIQUES

CONCLUSION :

L'allergie, considérée comme la 4^{ème} maladie dans le monde selon l'Organisation mondiale de la santé, est une réaction excessive de l'organisme, principalement médiée par l'immunoglobuline E (IgE), vis-à-vis d'allergènes pouvant prendre différentes formes comme l'asthme. L'asthme est une maladie hétérogène englobant plusieurs phénotypes (ex : asthme allergique vs. non allergique) dont la prévalence en France est de 7% pour les adultes. Entre un tiers à la moitié des cas seraient associés à la sensibilisation allergique. L'asthme et les maladies allergiques résultent d'interactions complexes entre des facteurs environnementaux, comportementaux et génétiques mais leur identification et leurs rôles respectifs restent mal compris. « L'héritabilité manquante » pourrait en partie résider dans les facteurs environnementaux partagés au sein des familles, avec des interactions gène-gène et gène-environnement. Les mécanismes épigénétiques, définis comme toute modification de l'activité de gènes non causées par une altération de la séquence de l'ADN, contrôlent l'expression des gènes et peuvent être également une source d'héritabilité manquante. La méthylation de certains gènes, un des mécanismes épigénétiques connus, a d'ores et déjà été retrouvée comme étant associée aux taux d'IgE totales, telle que la méthylation des gènes *SLC25A33*, *LPCAT2* et *L2HGDH* qui permettrait d'expliquer 13% de la variation du taux d'IgE totales.

L'objectif de ce travail était d'identifier les sites de méthylation associés aux taux d'IgE totales et spécifiques dans une population de sujets asthmatiques. L'étude a été conduite chez 357 adultes asthmatiques issus de la cohorte EGEA pour lesquels, la méthylation a été mesurée par methylC capture-sequencing. Deux approches complémentaires ont été réalisées : d'une part, une approche par gène candidat reposant sur les données de la littérature qui ont permis de sélectionner les gènes *LPCAT2*, *IL-5Ra* et *IL-4* et d'étudier l'association entre leur niveau de méthylation et le taux d'IgE totales et spécifiques d'acariens (Der p 1, 2), de chat (Fel d 1) et de pollen de la phléole (Phl p 1) ; d'autre part, une approche sur l'épigénome entier (EWAS) au cours de laquelle une analyse d'enrichissement ainsi qu'une analyse des régions différentiellement méthylées (DMR) ont été réalisées.

L'approche EWAS a mis en évidence 11 DMR significativement liées aux taux d'IgE totales dont une concernant le gène *IL-17Ra* et une autre en amont de *TUBGCP3*. Des modèles animaux d'asthme allergique allouent un rôle à l'IL-17Ra dans la synthèse des IgE ainsi que dans l'inflammation bronchique. L'analyse d'enrichissement a montré que les sites CpG ayant une valeur p (non corrigée) inférieure à 10^{-4} seraient majoritairement présents au sein d'introns. L'approche candidate a trouvé un nouveau site CpG (132009796) associé aux taux d'IgE totales au sein du gène *IL-4*. Les données de la littérature confèrent un rôle à l'IL-4 dans la production d'IgE par les lymphocytes B et sa concentration serait positivement corrélée aux taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques.

Ce travail a permis d'identifier de nouveaux sites de méthylation impliqués dans le taux d'IgE totales mais aucun en lien avec la réponse IgE spécifique. Ces résultats appuient l'hypothèse de l'existence de signatures épigénétiques spécifiques à différents phénotypes d'asthme. Si ces résultats sont confirmés par d'autres études, l'épigénétique offrirait de nouvelles perspectives pour le traitement de l'asthme et l'utilisation de biomarqueurs ciblant des sous-groupes de sujets asthmatiques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 26/09/17

LE DOYEN

Pour le Président
et par délégation
Le Doyen de Pharmacie
Pr. Michel SÈVE

Pr. Michel SÈVE

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. Pierrick BEDOUCH

BIBLIOGRAPHIE

1. Didier A, Dutau G. Les allergies respiratoires en questions. Médicales. Paris : Phase 5; 2007. 71 p.
2. Holgate ST. The epidemic of asthma and allergy. J R Soc Med. mars 2004;97(3):103-10.
3. [En ligne]. Allergies; [cité le 10 août 2017]. Disponible: <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/allergies>
4. Burney P, Malmberg E, Chinn S, Jarvis D, Luczynska C, Lai E. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. J Allergy Clin Immunol. mars 1997;99(3):314-22.
5. Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. Clin Exp Immunol. août 2001;125(2):177-83.
6. Girodet P-O. Immunoglobuline E et maladies respiratoires. Rev Mal Respir. déc 2005;22(6):967-81.
7. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2017 update) [En ligne]. Global Initiative for Asthma; 2017. Disponible: www.ginasthma.org
8. Raheison C, Bourdin A, Bonniaud P, Deslée G, Garcia G, Leroyer C, et al. Updated guidelines (2015) for management and monitoring of adult and adolescent asthmatic patients (from 12 years and older) of the Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) (Full length text). Rev Mal Respir. avr 2016;33(4):279-325.
9. Delmas M-C, Fuhrman C. L'asthme en France: synthèse des données épidémiologiques descriptives. Rev Mal Respir. févr 2010;27(2):151-9.
10. Sunyer J, Jarvis D, Pekkanen J, Chinn S, Janson C, Leynaert B, et al. Geographic variations in the effect of atopy on asthma in the European Community Respiratory Health Study. J Allergy Clin Immunol. nov 2004;114(5):1033-9.
11. SPLF. [SPLF Guidelines on Asthma and Allergy]. Rev Mal Respir. févr 2007;24(2):223-32.
12. Baxi SN, Phipatanakul W. The role of allergen exposure and avoidance in asthma. Adolesc Med State Art Rev. avr 2010;21(1):57-71, viii-ix.
13. Pavord ID, Korn S, Howarth P, Bleecker ER, Buhl R, Keene ON, et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Lond Engl. 18 août 2012;380(9842):651-9.

14. Solèr M, Matz J, Townley R, Buhl R, O'Brien J, Fox H, et al. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur Respir J*. août 2001;18(2):254-61.
15. Pilette C. Efficacy of immunotherapy in asthma: Comparison of subcutaneous and sublingual therapy. *Rev Fr Allergol*. 2009;49(6):481-6.
16. Calamita Z, Saconato H, Pelá AB, Atallah AN. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. *Allergy*. oct 2006;61(10):1162-72.
17. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature*. 25 nov 1999;402(6760 Suppl):B5-11.
18. Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, et al. [Epidemiological study of genetic and environmental factors in asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Protocol and potential selection bias]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. sept 2001;49(4):343-56.
19. Demoly P, Godard P, Bousquet J. Une synthèse de l'épidémiologie de l'asthme. *Rev Fr Allergol*. 2005;45(6):464-75.
20. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med*. 23 sept 2010;363(13):1211-21.
21. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 8 oct 2009;461(7265):747-53.
22. Kabesch M. Early origins of asthma (and allergy). *Mol Cell Pediatr*. déc 2016;3(1):31.
23. DeVries A, Vercelli D. Epigenetics in allergic diseases. *Curr Opin Pediatr*. déc 2015;27(6):719-23.
24. Alizadeh Z, Mortaz E, Adcock I, Moin M. Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. avr 2017;16(2):82-91.
25. Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. *Epigenetics*. First. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007. 502 p.
26. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 29 mai 2012;13(7):484-92.
27. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. janv 2015;135(1):15-24.
28. Liang L, Willis-Owen SAG, Laprise C, Wong KCC, Davies GA, Hudson TJ, et al. An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. *Nature*. 30 avr 2015;520(7549):670-4.

29. Everson TM, Lyons G, Zhang H, Soto-Ramírez N, Lockett GA, Patil VK, et al. DNA methylation loci associated with atopy and high serum IgE: a genome-wide application of recursive Random Forest feature selection. *Genome Med.* 21 août 2015;7:89.
30. Ek WE, Ahsan M, Rask-Andersen M, Liang L, Moffatt MF, Gyllensten U, et al. Epigenome-wide DNA methylation study of IgE concentration in relation to self-reported allergies. *Epigenomics.* avr 2017;9(4):407-18.
31. Sordillo JE, Kelly R, Bunyavanich S, McGeachie M, Qiu W, Croteau-Chonka DC, et al. Genome-wide expression profiles identify potential targets for gene-environment interactions in asthma severity. *J Allergy Clin Immunol.* oct 2015;136(4):885-892.e2.
32. Yang IV, Pedersen BS, Liu A, O'Connor GT, Teach SJ, Kattan M, et al. DNA methylation and childhood asthma in the inner city. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2015;136(1):69-80.
33. Pascual M, Suzuki M, Isidoro-Garcia M, Padrón J, Turner T, Lorente F, et al. Epigenetic changes in B lymphocytes associated with house dust mite allergic asthma. *Epigenetics.* 1 sept 2011;6(9):1131-7.
34. DeVries A, Vercelli D. Epigenetic Mechanisms in Asthma. *Ann Am Thorac Soc.* mars 2016;13 Suppl 1:S48-50.
35. Lupinek C, Wollmann E, Baar A, Banerjee S, Breiteneder H, Broecker BM, et al. Advances in allergen-microarray technology for diagnosis and monitoring of allergy: the MeDALL allergen-chip. *Methods San Diego Calif.* 1 mars 2014;66(1):106-19.
36. Bessot J-C, Pauli G. [House dust mites and their allergens]. *Rev Mal Respir.* févr 2011;28(2):227-39.
37. Custovic A, Simpson A, Pahdi H, Green RM, Chapman MD, Woodcock A. Distribution, aerodynamic characteristics, and removal of the major cat allergen Fel d 1 in British homes. *Thorax.* janv 1998;53(1):33-8.
38. Sekerkova A, Polackova M, Striz I. Detection of Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 and Phl p 12 specific IgE antibodies in the sera of children and adult patients allergic to Phleum pollen. *Allergol Int Off J Jpn Soc Allergol.* juin 2012;61(2):339-46.
39. Bousquet J, Anto JM, Just J, Keil T, Siroux V, Wickman M. The multimorbid polysensitized phenotype is associated with the severity of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2017;139(4):1407-8.
40. Allum F, Shao X, Guénard F, Simon M-M, Busche S, Caron M, et al. Characterization of functional methylomes by next-generation capture sequencing identifies novel disease-associated variants. *Nat Commun.* 29 mai 2015;6:7211.
41. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B.* 1995;57(1):289-300.
42. Pedersen BS, Schwartz DA, Yang IV, Kechris KJ. Comb-p: software for combining, analyzing, grouping and correcting spatially correlated P-values. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 nov 2012;28(22):2986-8.

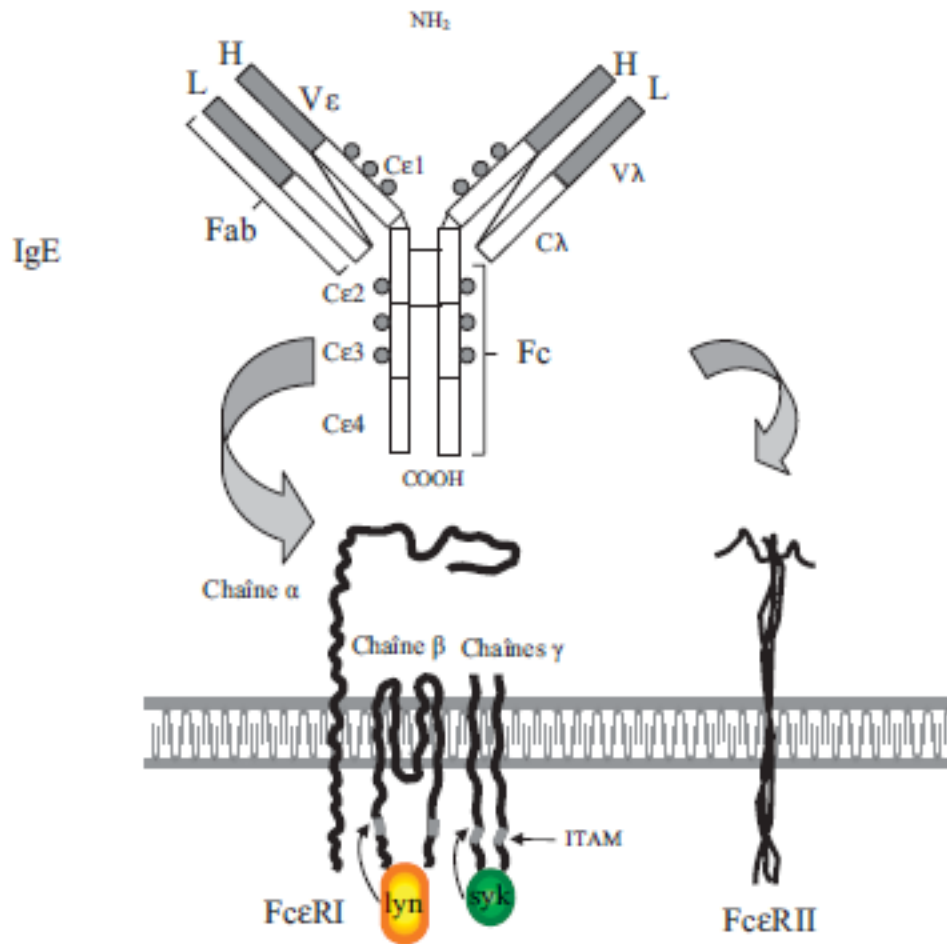
43. Boever P, Langie S, inventeur. Epigenetic markers for respiratory allergy. WO2016193151A1, 8 déc 2016.
44. Kwon N-H, Kim J-S, Lee J-Y, Oh M-J, Choi D-C. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. *J Clin Immunol.* mars 2008;28(2):139-46.
45. Lemire M, Zaidi SHE, Ban M, Ge B, Aïssi D, Germain M, et al. Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci. *Nat Commun [En ligne].* 26 févr 2015 [cité le 29 juill 2017];6. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351585/>
46. Morishima Y, Ano S, Ishii Y, Ohtsuka S, Matsuyama M, Kawaguchi M, et al. Th17-associated cytokines as a therapeutic target for steroid-insensitive asthma. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:609395.
47. Corrigan CJ, Wang W, Meng Q, Fang C, Eid G, Caballero MR, et al. Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol.* juill 2011;128(1):116-24.
48. Yu HS, Angkasekwinai P, Chang SH, Chung Y, Dong C. Protease Allergens Induce the Expression of IL-25 via Erk and p38 MAPK Pathway. *J Korean Med Sci.* juin 2010;25(6):829-34.
49. Wang Y-H, Liu Y-J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol.* déc 2008;20(6):697-702.
50. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med.* 27 nov 2006;203(12):2715-25.
51. Willis CR, Siegel L, Leith A, Mohn D, Escobar S, Wannberg S, et al. IL-17RA Signaling in Airway Inflammation and Bronchial Hyperreactivity in Allergic Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* déc 2015;53(6):810-21.
52. Tang W, Smith SG, Beaudin S, Dua B, Howie K, Gauvreau G, et al. IL-25 and IL-25 receptor expression on eosinophils from subjects with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;163(1):5-10.
53. Ballantyne SJ, Barlow JL, Jolin HE, Nath P, Williams AS, Chung KF, et al. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* déc 2007;120(6):1324-31.
54. Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 déc 2013;188(11):1294-302.
55. Brown MA. IL-4 production by T cells: you need a little to get a lot. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 sept 2008;181(5):2941-2.

56. Humbert M, Corrigan CJ, Kimmitt P, Till SJ, Kay AB, Durham SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* sept 1997;156(3 Pt 1):704-8.
57. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol.* mars 2008;8(3):218-30.
58. Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB, et al. Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* juin 2001;107(6):963-70.
59. Lev Maor G, Yearim A, Ast G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet TIG.* mai 2015;31(5):274-80.
60. DeWoskin VA, Million RP. The epigenetics pipeline. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2013;12(9):661-2.

TABLE DES ANNEXES

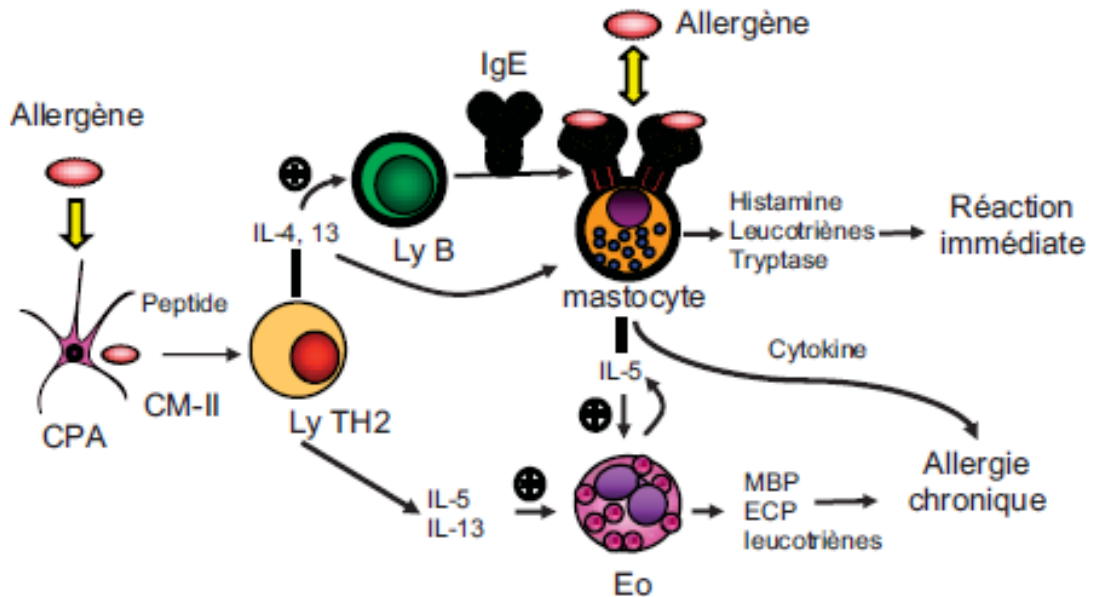
Annexe 1 : Schéma d'une immunoglobuline E.....	49
Annexe 2 : Schéma descriptif du mécanisme intervenant lors de la sensibilisation à un allergène.....	50
Annexe 3 : Schéma récapitulant la stratégie de la prise en charge de l'asthme selon le niveau de contrôle	51
Annexe 4 : Classification du niveau de contrôle de l'asthme	52
Annexe 5 : Etudes réalisées qui évaluent l'association entre la méthylation de l'ADN et les taux d'IgE totales chez les asthmatiques	53
Annexe 6 : Résultats obtenus concernant les IgE spécifiques à Der p 1, 2, Fel d 1 et Phl p 1 pour le gène IL-4	55
Annexe 7 : Tableau descriptif de l'ensemble des résultats obtenus pour l'analyse d'enrichissement.....	56
Annexe 8 : Tableau descriptif des 3 DMR significativement associées aux taux d'IgE totales	57

Annexe 1 : Schéma d'une immunoglobuline E



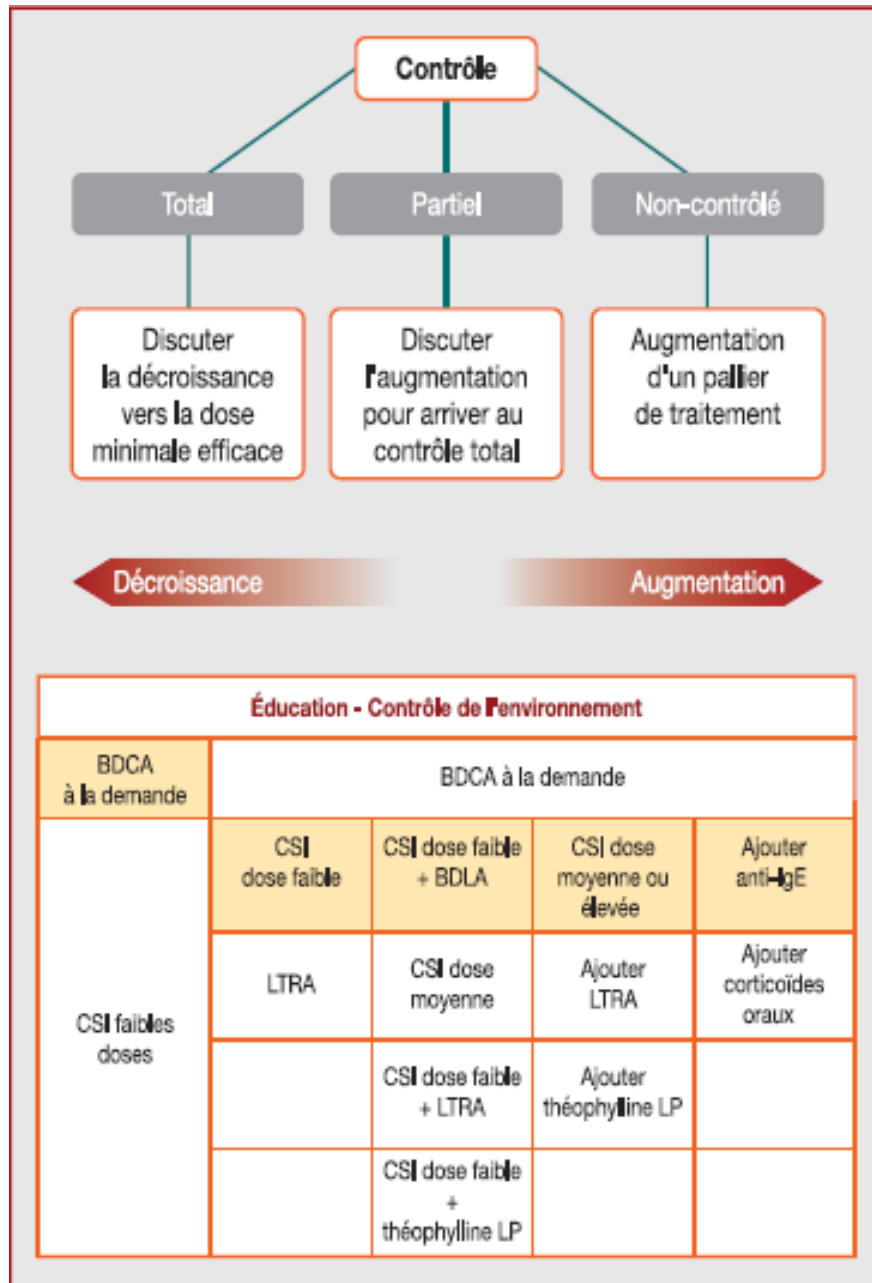
Représentation schématique d'une immunoglobuline E avec ses 2 chaînes lourdes (H) et légère (L), de 4 domaines constants (Ce) et variables (V). Ainsi que son interaction avec le récepteur de haute affinité FcεRI et de faible affinité FcεRI (6).

Annexe 2 : Schéma descriptif du mécanisme intervenant lors de la sensibilisation à un allergène.



Ce schéma représente la place des IgE dans la phase immédiate de la réaction allergique avec notamment la libération de médiateurs comme l'histamine par les mastocytes. Ainsi que son rôle dans l'allergie chronique (6).

Annexe 3 : Schéma récapitulatif de la stratégie de la prise en charge de l'asthme selon le niveau de contrôle



Description de la stratégie de prise en charge de l'asthme ainsi que de ses alternatives à mettre en place en fonction du niveau de contrôle (8).

Annexe 4 : Classification du niveau de contrôle de l'asthme

Tableau 1 Niveaux de contrôle de l'asthme.			
Évaluer le contrôle			
Critères	Asthme contrôlé	Asthme partiellement contrôlé	Asthme non contrôlé
Symptômes diurnes	Aucun (deux ou moins/semaine)	Plus de 2 fois par semaine	
Symptômes ou réveils nocturnes	Aucun	Au moins 1 fois par semaine	
Fréquence du traitement de secours	Aucun (deux ou moins/semaine)	Plus de 2 fois par semaine	Au moins 3 critères d'asthme partiellement contrôlé
Retentissement sur les activités	Aucun	Au moins une fois	
Exacerbations	Aucun	Au moins une exacerbation	
VEMS ou DEP	Normale	< 80 % valeur théorique ou de la meilleure valeur personnelle si connue	
Évaluation des facteurs de risque lié à l'asthme : lors du diagnostic et régulièrement lors du suivi			
Évaluation de la fonction respiratoire au début du traitement et ensuite 3 à 6 mois après traitement de fond			
Évaluation du risque futur du patient			
Risque d'exacerbations			
Risque de trouble ventilatoire obstructif fixé			
Risque d'effets indésirables			

Tableau descriptif montrant l'ensemble des critères pris en compte pour évaluer le niveau de contrôle de l'asthme ainsi que leurs définitions. Ces critères permettent de définir si l'asthme est contrôlé, partiellement contrôlé ou non contrôlé (8).

Annexe 5 : Etudes évaluant l'association entre la méthylation de l'ADN et les taux d'IgE totales chez les sujets asthmatiques

Auteur	Journal	Expression des résultats	Population	Méthodes	Principaux résultats
Liang et al.	Nature (2015)	-Sites CpG associés aux taux d'IgE totales -Variation du taux d'IgE totales en fonction du niveau de méthylation	-355 sujets dont 175 asthmatiques de l'étude MRCA âgés de 2 à 61 ans. -149 sujets dont 34 asthmatiques de l'étude PAPA âgés de 18 à 30 ans (première réplique). -160 sujets dont 69 asthmatiques de l'étude SLSJ âgés de 5 à 79 ans (seconde réplique).	Modèle linéaire mixte Cellules du sang total. Méthylation obtenue avec la biopuce Illumina	-La méta-analyse pour ces 3 panels révèle 36 loci associés aux taux d'IgE totales avec un FDR < 10 ⁻⁴ dont <i>LPCAT2</i> , <i>IL-5Ra</i> , <i>ZNF22</i> , <i>L2HGDH</i> , <i>IL-4</i> et <i>SLC25A33</i> . - Pour ces 6 sites CpG, le niveau de méthylation diminuait avec le taux d'IgE totales. Pour le panel MRCA, le top 3 des sites CpG (<i>SLC25A33</i> , <i>LPCAT2</i> et <i>L2HGDH</i>) explique 13.5% de la variation du taux d'IgE totales.
Everson et al.	Genome Medicine (2015)	Sites CpG associés à la sensibilisation allergique et à un taux élevé d'IgE totales.	-367 sujets atopiques de la cohorte IOW âgés de 18 ans. -464 enfants de l'étude BAMSE (réplique)	- Étape 1 : utilisation d'une méthode Random Forest pour sélectionner les cas atopiques puis une régression logistique analyser l'association entre la méthylation et la sensibilisation allergique - Étape 2 et réplique : évaluation de chaque site CpG en lien avec la sensibilisation allergique et le taux d'IgE totales par régression logistique multiple Cellules du sang total. Méthylation obtenue avec la biopuce Illumina 450k	-Pour l'étape 1, 62 sites CpG ont été sélectionnés - Étape 2 (IOW): Sur les 62 sites, 22 sites dont 12 sites étaient significativement associés à la sensibilisation allergique et à un taux d'IgE élevé - Réplique: 19 sites ont été répliqués dont 9 associés à la sensibilisation allergique et à un taux d'IgE élevé come <i>PRG2</i> .
Yang et al.	J Allergy Clin Immunol (2015)	-DMR associés à l'asthme en comparaison aux cas contrôles - DMR associée aux taux d'IgE totales chez les asthmatiques uniquement	97 sujets asthmatiques allergiques âgés de 6 à 12 ans 97 sujets contrôles	Modèle linéaire puis utilisation de la méthode comb-p pour calculer la corrélation des valeurs p dans un intervalle de 300 bases et correction des valeurs p par SLK-sidak Cellules du sang total.	- 81 DMR étaient associées à l'asthme dont 4 également associées aux taux d'IgE totales. 73 étaient majoritairement hypométhylées dont <i>IL-13</i>

				Méthylation obtenue avec la biopuce Illumina 450k	- 11 DMR étaient liés aux taux d'IgE totales chez les asthmatiques dont <i>TRMT12</i>
Ek et al	Epigenomics (2017)	-Sites CpG associés aux taux d'IgE totales -Sites CpG liés aux IgE-spécifiques obtenus par Phadiatop (chat, chien, cheval, acariens, phléole, bouleau) et Fx5 (œuf, chat, lait, poisson) -DMR associés aux IgE totales	-728 sujets âgés de 14 à 94 ans dont 356 ayants une maladie allergique et 372 contrôles de la NSPHS population -355 sujets âgés de 2 à 61 ans issus de MRCA pour la réplication	-Modèle mixte et correction Bonferroni pour les tests multiples -Pour les DMR : méthode comb-p pour calculer la corrélation des valeurs p dans un intervalle de 200 bases et correction des valeurs p par SLK-sidak Cellules du sang total. Méthylation obtenue avec la biopuce Illumina 450k	-15 sites CpG ont été répliqués en lien avec les taux d'IgE totales dont <i>ACOT7</i> , <i>IL-5Ra</i> , <i>PRG2</i> . Six passaient la correction des tests multiples dont <i>LPCAT2</i> , <i>ZNF22</i> et <i>IL-5Ra</i> -331 sites CpG associés aux IgE-spécifiques dont 23 qui passent la correction des valeurs p mais aucun n'était lié à une maladie allergique -16 DMR ont été mises en évidence concernant les taux d'IgE totales dont <i>ACOT7</i>

BAMSE, Children Allergy Milieu Stockholm Epidemiology ; IOW, Isle of Wight ; MRCA, Medical Research Council Asthma; NSPHS, Northern Swedish Population Health Study ; PAPA, Poblogaeth Asthma Prifysgol Abertawe, SLSJ, Saguenay-Lac-Saint-Jean region of Quebec,

Annexe 6 : Résultats obtenus concernant les IgE spécifiques à Der p 1, 2, Fel d 1 et Phl p 1 pour le gène *IL-4*

Site CpG	n	Beta	SE	Valeur p non corrigée	Valeur p corrigée par le FDR
Der p 1					
131999991	134	-0,21	0,09	0,02	0,20
132008595	111	0,91	0,39	0,02	0,20
132009796	234	-0,23	0,09	0,02	0,20
132009811	242	-0,25	0,09	0,01	0,20
132009823	255	-0,25	0,11	0,03	0,28
132010005	185	-0,21	0,08	0,01	0,20
132010649	230	-0,19	0,08	0,01	0,20
132010825	208	-0,22	0,09	0,02	0,20
Der p 2					
131999991	234	-0,17	0,09	0,04	0,35
132001742	278	0,41	0,19	0,03	0,33
132005791	297	0,38	0,15	0,01	0,17
132008595	111	1,04	0,39	0,01	0,17
132009796	234	-0,23	0,09	0,02	0,20
132009811	242	-0,24	0,09	0,01	0,17
132009947	219	-0,13	0,06	0,04	0,35
132010649	230	-0,20	0,07	0,01	0,17
132010825	208	-0,24	0,09	0,01	0,17
132024718	321	-0,44	0,20	0,03	0,32
Fel d 1					
132005824	300	0,31	0,15	0,03	0,69
132008595	110	0,79	0,37	0,03	0,69
132010934	194	0,18	0,09	0,04	0,69
Phl p 1					
132005824	300	0,27	0,14	0,04	0,60
132008595	110	0,79	0,35	0,03	0,60

Annexe 7 : Tableau descriptif de l'ensemble des résultats obtenus pour l'analyse d'enrichissement

Localisation	Valeur p	Localisation cible et valeur p $\leq 10^{-4}$	Localisation cible et valeur p $> 10^{-4}$	Autre localisation et valeur p $\leq 10^{-4}$	Autre localisation et valeur p $> 10^{-4}$
Intron	0,0003	169	1249115	143	1566281
South shelf	0,09	34	240461	278	2574935
North shelf	0,16	32	240562	280	2574834
TES 200	0,24	3	15355	309	2800041
Eosinophile lmr	0,38	36	306248	276	2509148
SNP auto-immun (200)	0,42	1	4977	311	2810419
H3K4me1.H3K27ac	0,46	3	22502	309	2792894
Blood lmr	0,47	40	353136	272	2462260
Th1	0,59	5	46505	307	2768891
3' UTR	0,60	9	84673	303	2730723
5' UTR	0,61	34	317425	278	2497971
TES 1000	0,78	6	68774	306	2746622
TTS 1000	0,78	24	247461	288	2567935
TES 1500	0,80	9	102424	303	2712972
CD34	0,84	21	228620	291	2586776
South shore	0,85	37	385501	275	2429895
H3K4me3.H3K27ac	0,87	3	44744	309	2770652
TTS 1500	0,88	28	305213	284	2510183
CD20	0,90	16	190781	296	2624615
TTS 200	0,94	3	53739	309	2761657
CD3	0,95	3	57432	309	2757964
CD14	0,96	19	240131	293	2575265
Th2	0,97	23	293896	289	2521500
CD8	0,97	14	197078	298	2618318
CD3	0,98	16	226623	296	2588773
CD56	0,99	8	138915	304	2676481
Exon	0,99	36	447456	276	2367940
CD4	0,99	9	153939	303	2661457
North shore	1,00	30	392033	282	2423363
Premier exon	1,00	8	149898	304	2665498
CD19	1,00	12	214136	300	2601260
Ilot CpG	1,00	44	602645	268	2212751
Blood umr	1,00	52	810431	260	2004965
Eosinophile umr	1,00	45	781824	267	2033572
SNP auto-immun	1,00	0	3	312	2815393

Umr : unmethylated region ; *lmr* : low methylated region; *TTS* : transcriptional start site; *TES* : transcriptional end site; *UTR* : untranscribed region

Annexe 8 : Tableau descriptif des 3 DMR significativement associées aux taux d'IgE totales

	Site CpG	Béta	Ecart-type	Valeur p non corrigée (LRT)	Gène
Chr13	113242878	-0,09	0,04	0,01325	*TUBGCP3
	113242893	-0,09	0,04	0,02684	
	113242899	-0,10	0,04	0,02496	
	113242907	-0,11	0,04	0,01654	
	113242909	-0,10	0,04	0,01729	
	113242911	-0,11	0,05	0,02282	
	113242926	-0,12	0,05	0,00986	
	113242931	-0,13	0,05	0,00515	
	113242944	-0,12	0,05	0,01840	
Chr21	45628003	0,12	0,04	0,00441	*C21orf33
	45628012	0,13	0,04	0,00102	
	45628025	0,19	0,04	3,15E-07	
	45628029	0,17	0,04	8,59E-06	
	45628074	0,11	0,05	0,02172	
Chr22	17587749	0,21	0,06	0,00070	IL17Ra
	17587752	0,15	0,05	0,00242	
	17587755	0,18	0,05	0,00057	
	17587784	0,16	0,05	0,00052	

**signifie que cela correspond au gène situé en amont de la région. Il est observé que pour chacune de ces régions, l'effet (Beta) ainsi que l'écart-type (SE) sont du même ordre de grandeur et vont dans le même sens.*



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

MÉTHYLATION ET IGE : APPROCHE MÉTHYLOME DANS UNE POPULATION DE SUJETS ASTHMATIQUES

RÉSUMÉ :

Introduction : L'immunoglobuline E (IgE) est le médiateur principal des maladies allergiques, dont les étiologies résultent d'interactions complexes entre des facteurs environnementaux, comportementaux et génétiques. Les maladies allergiques peuvent s'exprimer sous différentes formes, comme l'asthme. Dans l'asthme, l'association entre méthylation et IgE a déjà été retrouvée pour certains gènes, notamment *SLC25A33*, *LPCAT2* et *L2HGDH* et expliquerait 13% de la variation du taux d'IgE totales. L'objectif de ce travail était d'identifier les sites de méthylation associés aux taux d'IgE totales et spécifiques dans une population de sujets asthmatiques.

Méthodes : La méthylation, obtenue par méthylC capture-sequencing, a été analysée en fonction des taux d'IgE chez 357 adultes asthmatiques issus de la cohorte EGEA selon une approche par gène candidat (IgE totales et IgE spécifiques à Der p 1, 2, Fel d 1 et Phl p 1) et une approche sur l'épigénome entier (IgE totales).

Résultat : L'approche sur l'épigénome entier a identifié 11 régions significativement associées aux taux d'IgE totales dont une concernant le gène *IL-17Ra* et une autre en amont de *TUBGCP3*. Un nouveau site CpG (132009796) était associé aux taux d'IgE totales au sein du gène *IL-4*. L'analyse d'enrichissement montrait que les sites CpG ayant une valeur p (non corrigée) inférieure à 10^{-4} étaient majoritairement présents au sein d'introns. Aucun site n'a été retrouvé associé aux IgE spécifiques.

Conclusion : Ce travail a identifié de nouveaux sites de méthylation liées aux taux d'IgE totales. Si ces résultats sont répliqués dans d'autres études, l'épigénétique offrirait de nouvelles perspectives pour le traitement et l'utilisation de biomarqueurs ciblant des sous-groupes de patients asthmatiques.

MOTS CLÉS : Asthme, Allergie, IgE totales et spécifiques, Approche candidate, EWAS

FILIÈRE : Pharmacie option Industrie