



HAL
open science

L'épigénétique comme support d'innovation thérapeutique: exemple d'une étude d'association entre méthylation de l'ADN et taux d'immunoglobulines E totales chez des adultes asthmatiques

Laura Beaumier

► To cite this version:

Laura Beaumier. L'épigénétique comme support d'innovation thérapeutique: exemple d'une étude d'association entre méthylation de l'ADN et taux d'immunoglobulines E totales chez des adultes asthmatiques. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03266141

HAL Id: dumas-03266141

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03266141>

Submitted on 30 Jun 2021

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine
Pharmacie de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2019

**L'ÉPIGÉNÉTIQUE COMME SUPPORT D'INNOVATION THÉRAPEUTIQUE :
EXEMPLE D'UNE ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE MÉTHYLATION DE L'ADN
ET TAUX D'IMMUNOGLOBULINES E TOTALES CHEZ DES ADULTES
ASTHMATIQUES**

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIÈRE – PRATIQUE ET RECHERCHE

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

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

Laura BEAUMIER

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 08/03/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Monsieur le Professeur Pierrick BEDOUCH

Membres :

Monsieur le Docteur Sébastien CHANOINE (directeur de thèse)

Madame le Docteur Valérie SIROUX (co-directrice de thèse)

Madame le Professeur Laurence BOUILLET

Monsieur le Docteur Luc FORONI

Monsieur le Professeur Stéphane HONORÉ

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

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes :
Mme Christine DEMEILLIERS

Année 2018 - 2019

ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUCH	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheMAS
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR 5063 CNRS
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheREx
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408

PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042
MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042
PRCE	FITE	ANDREE	-
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
MCF	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS, TheReX
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR 5553 CNRS
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR 5525 CNRS, ThEMAS
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
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
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse 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
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : 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
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

À mes parents

REMERCIEMENTS

À **Monsieur le Professeur Pierrick BEDOUCH**, pour me faire l'honneur de présider ce jury. Merci d'avoir suivi mon parcours et de m'avoir aiguillée et conseillée dans mes projets durant toutes ces années d'internat.

À **Monsieur le Docteur Sébastien CHANOINE**. Sébastien, merci de m'avoir guidée dans mon parcours professionnel et dans tous ces projets que je n'aurais sans doute pas réussi à réaliser sans toi. Il s'en est passé des moments depuis l'externat, des heures à relire nos travaux jusqu'à notre première bouteille de champagne, des soirées en congrès aux sorties parisiennes... Et pour terminer ces belles années d'étude, tu me fais l'honneur d'être mon directeur de thèse. Je te remercie infiniment de ton soutien, de ta disponibilité et de tes précieux conseils. Je te dois beaucoup.

À **Madame le Docteur Valérie SIROUX**, pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche avec passion. Je te remercie de tes conseils avisés, de ton accompagnement précieux tout au long de cette année et de ta disponibilité à tout moment.

À **Madame le Professeur Laurence BOUILLET**, pour votre présence dans ce jury et l'attention que vous porterez à ce travail ; veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

À **Monsieur le Docteur Luc FORONI**, pour apporter votre expertise dans l'innovation thérapeutique. Merci de votre présence et d'avoir accepté de juger ce travail.

À **Monsieur le Professeur Stéphane HONORÉ**, pour avoir accepté de siéger à ce jury et d'évaluer ce travail ; veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.

À **mes parents**, pour votre amour et votre présence sans faille. Vous avez tant fait pour moi depuis toutes ces années, merci de m'avoir transmis les valeurs sur lesquelles je m'appuie aujourd'hui et de m'avoir toujours soutenue dans mes projets. C'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui, je ne vous remercierai jamais assez. Je vous aime.

À **ma sœur Aurélie**, pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci d'avoir toujours été là pour moi, François et toi avez fait de moi la plus heureuse des tatas.

À **ma grand-mère**, qui je suis sûre de là-haut est fière de moi.

À **mes filleuls Louise et Marius**, mes petits rayons de soleil.

À **ma famille**, et plus particulièrement mes oncles et tantes Jean-Claude, Rosy, Michel, Geneviève, Roger, et Janine partie trop tôt, mais aussi Marc et Karine ; ainsi que mes cousins et cousines Jean-Marc et Laura, Christelle et Michaël, Cédric et Clélia. J'ai la chance d'avoir une famille formidable.

À **mes amis d'enfance**, pour notre amitié qui dure depuis si longtemps. Amélie, 28 ans passés à tes côtés et c'est loin d'être terminé. Isabelle et Mylène, merci pour votre présence et votre bonne humeur, c'est que du bonheur avec vous ! Aurélien et Laurent, pour l'Italie (« la panna cotta »), le Verdon, tous les bons moments passés ensemble et ceux à venir, « plaplapla ». Vous êtes des amis en or.

À **mes plus belles rencontres grenobloises**. Anne-Sophie et Céline, pour nos soirées étudiantes par la suite devenues des soirées sushis (« des sushis, des sushis ! »). Merci pour votre présence et pour cette belle amitié qui dure depuis bientôt 10 ans. Rémi, pour nos soirées GOT, nos repas et apéros, les matchs du FCG... bref tous ces bons souvenirs et tous les moments qui nous attendent et qui seront « trop géniaaaaaal ». Sinus

(euh Simon), pour cette belle rencontre en 5^{ème} année marquée par des journées BU, mais surtout pour tous les bons moments passés ensemble depuis le début de l'internat.

Aux **amis de la fac**, avec une pensée particulière pour Mathieu, toujours présent malgré la distance, Guichou et bien-sûr Thom, Doudou, Xav et Sylvain pour ces années étudiantes bien remplies.

À **mes co-internes**, qui rendent l'internat plus facile et bien plus drôle. Hélène et Dorothée, pour ces 6 mois passés à vos côtés et les quelques heures perdues à papoter devant l'ascenseur du 4^{ème}. À Bastien pour la bonne ambiance en nut (« nut nut ») et Anne-Flore pour ta bonne humeur et nos rires aux cytos. Au groupe des vieilles résistantes, qui rendent le repas du vendredi midi bien meilleur. Sans oublier mon cher Tancoch et les bios, parce qu'on partage bien plus que des Deliveroo et nos plateaux repas en garde.

Aux **copains de médecine** : Tompouce, Aldric et Fedoch pour ce semestre en pneumo ; Léa, Myriam, Sylvain et Julian : vous êtes les meilleuws des meilleuws ; Lulu pour ta bonne humeur communicative et nos soirées vin-potins ; Aurélien pour les bons moments passés ensemble. L'internat permet de formidables rencontres.

À **la team 12 de l'IAB**, avec une pensée particulière pour Anne, Stephan et Alicia. Je remercie également toutes les personnes ayant contribué à ce travail de recherche, notamment les équipes de Paris et de McGill.

Aux **équipes, pharmaciens et préparateurs** que j'ai rencontrés au cours de mes différents semestres d'internat et qui m'ont fait découvrir la pharmacie hospitalière.

Enfin, à **Antoine**, pour le bonheur que tu m'apportes chaque jour. Merci pour ton soutien et ta patience, pour tous nos moments passés ensemble et surtout ceux à venir. De beaux projets nous attendent, j'ai hâte de continuer à découvrir le monde à tes côtés.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	6
TABLE DES MATIÈRES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES FIGURES	13
ABRÉVIATIONS.....	14
INTRODUCTION	17
1. Les origines du médicament : pratiques thérapeutiques de l'Antiquité aux Temps modernes.....	17
1.1. Pratiques thérapeutiques mésopotamiennes et égyptiennes	19
1.2. Pratiques thérapeutiques gréco-romaines.....	20
1.3. Pratiques thérapeutiques du Moyen Âge aux Temps modernes	21
2. La vaccination et l'ère de la chimie : des tournants dans l'histoire de la pharmacie ...	22
2.1. La vaccination, premier médicament de la médecine préventive	22
2.2. L'essor de la chimie : une avancée majeure pour la thérapeutique.....	23
3. Les biotechnologies, au cœur de l'innovation thérapeutique	28
3.1. La naissance des biotechnologies.....	28
3.2. Les protéines recombinantes	29
3.3. Les anticorps monoclonaux.....	29
3.4. Les thérapies ciblées anticancéreuses	30
3.5. L'immunothérapie anticancéreuse	31
4. Les approches « omiques », une révolution thérapeutique ?.....	33

4.1. Les différentes approches « omiques »	33
4.2. Les médicaments issus de la génomique.....	34
4.3. Qu'est-ce que l'épigénétique ?.....	36
4.4. Épigenétique et asthme : un domaine de recherche d'intérêt dans l'innovation thérapeutique	39
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE	42
ABSTRACT	42
1. Introduction	44
2. Methods	45
2.1 Study population	45
2.2 DNA methylation measurement.....	47
2.3 Statistical methods.....	49
3. Results	51
3.1 Description of the study population	51
3.2 Epigenome-wide association study	52
3.3 Enrichment analyzes	56
3.4 Differentially methylated regions.....	58
3.5 Replication phase in the MRCE study and meta-analysis.....	60
3.6 Candidate approach focused on published EWAS results for total IgE levels	62
4. Discussion.....	64
4.1 Identification of new DMRs and CpG sites associated with total IgE levels	64
4.2 Strengthening literature results.....	68
4.3 Strengths and weaknesses of the study	69
4.4 Conclusion.....	70

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	71
Les premiers épimédicaments	71
Le couplage épimédicaments / médicaments : une stratégie thérapeutique d'intérêt ...	74
Les épimédicaments dans les maladies chroniques.....	75
Les limites des thérapies épigénétiques	77
Le ciblage des épimédicaments.....	78
Quelles perspectives offrent les résultats de l'étude dans le développement d'épimédicaments dans l'asthme ?.....	79
Conclusion.....	81
BIBLIOGRAPHIE.....	86

LISTE DES TABLEAUX

Table I : Description of the study population at EGEA1 and EGEA2

Table II : Description of the top 40 CpG sites associated with total IgE levels in the EGEA cohort (uncorrected p-values $\leq 10^{-5}$)

Table III : Results of enrichment analyzes in the EGEA cohort

Table IV : Description of the 15 DMRs defined by the comb-p method in the EGEA cohort

Table V : Description of the 27 CpG sites with a global p-value for the meta-analysis $\leq 10^{-5}$

Table VI : Description of replicated CpG sites from previously published EWAS associated with total IgE levels (uncorrected p-values ≤ 0.05)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Frise chronologique retraçant les principales découvertes thérapeutiques

Figure 2 : Tablette médicale sumérienne cunéiforme de Nippur

Figure 3 : Papyrus Ebers

Figure 4 : Exemple de modifications épigénétiques : méthylation de l'ADN et acétylation des histones

Figure 5 : Flow chart of the EGEA study population

Figure 6 : Manhattan plot of the EWAS results between methylation and total IgE levels in the EGEA cohort

Figure 7 : Locus zoom plot of two major DMRs, mapping to the *IL-17RA* and the *ICOSLG* genes

ABRÉVIATIONS

AHRR :	aryl-hydrocarbon receptor repressor
AMM :	autorisation de mise sur le marché
BCL11B :	B cell CLL/lymphoma 11B
BET :	bromodomain and extra-terminal
BMI :	body mass index
bp :	base pairs
CAR-T :	chimeric antigen receptor-T
CD :	cluster of differentiation
CI :	confidence interval
CLEC2A :	C-type lectin domain family 2 member A
CpG :	Cytosine-phosphate-Guanine
CTLA-4 :	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DHS :	DNase I hypersensitive site
DMR :	differentially methylated region
EGEA :	Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy
EGFR :	epidermal growth factor receptor
ENCODE :	encyclopedia of DNA elements
EWAS :	epigenome-wide association study
EZH2 :	enhancer of zeste homolog 2
FDA :	Food and Drug Administration
FDR :	false discovery rate

GM : geometric mean

GWAS : genome-wide association study

H3K4me : histone H3 lysine 4 methylation

H3K4me3 : histone H3 lysine 4 trimethylation

H3K27ac : histone H3 lysine 27 acetylation

HER2 : human epidermal growth factor receptor 2

ICOSLG : inducible T cell costimulator ligand

IgE : immunoglobulin E

IL-17RA : interleukin-17 receptor A

IRAK2 : interleukin-1 receptor associated kinase 2

IU : international unit

JAKMIP1 : janus kinase and microtubule interacting protein 1

J.-C. : Jésus-Christ

KLHL1 : kelch like family member 1

LMR : low methylated region

MCC-Seq : methylC-capture sequencing

MFSD6 : major facilitator superfamily domain containing 6

MFSD6L : major facilitator superfamily domain containing 6 like

mL : milliliter

MRCE : medical research council for eczema

PD-1 : programmed-cell death-1

PD-L1 : programmed death-ligand-1

sd : standard deviation

SLC24A4 : solute carrier family 24 member 4

SLK : Stouffer-Liptak-Kechris

SNP : single nucleotide polymorphism
SSTR3 : somatostatin receptor 3
Th : T helper
TSS : transcription start site
TTS : transcription termination site
UCSC : university of California, Santa Cruz
UMR : unmethylated region
UTR : untranslated transcribed region
ZEB1 : zinc finger E-box binding homeobox 1
ZNF248 : zinc finger protein 248

INTRODUCTION

L'évolution de la pharmacie a été marquée par des découvertes importantes, puis par des progrès thérapeutiques majeurs au cours des derniers siècles (Figure 1). Dans cette introduction, nous allons dans un premier temps retracer les origines du médicament, depuis l'Antiquité jusqu'aux Temps modernes, et aborder les principaux tournants dans l'histoire de la pharmacie. Dans un second temps, nous nous attacherons aux innovations thérapeutiques majeures des dernières décennies, à savoir les biotechnologies et les approches « omiques », en les illustrant par des exemples provenant principalement de la cancérologie, domaine ayant de nombreuses retombées thérapeutiques innovantes. Enfin, nous expliquerons la nécessité du développement de nouveaux médicaments innovants pour améliorer la prise en charge des patients, en prenant l'exemple de l'asthme, maladie fréquente d'origine multifactorielle.

1. Les origines du médicament : pratiques thérapeutiques de l'Antiquité aux Temps modernes

En réalité, les premiers éléments de l'histoire de la médecine datent de la Préhistoire. La paléopathologie, étude des maladies anciennes dans des populations passées par analyse de restes humains, a permis l'apport des premières connaissances sur l'existence de maladies dès le Paléolithique.^{1,2} Des observations paléopathologiques du Paléolithique, mais surtout du Mésolithique et du Néolithique, tirées de l'examen d'os et de dents humains, ont permis de mettre en évidence l'existence très ancienne de l'arthrose, de caries ou encore de la tuberculose, du choléra, de la lèpre et de la peste.

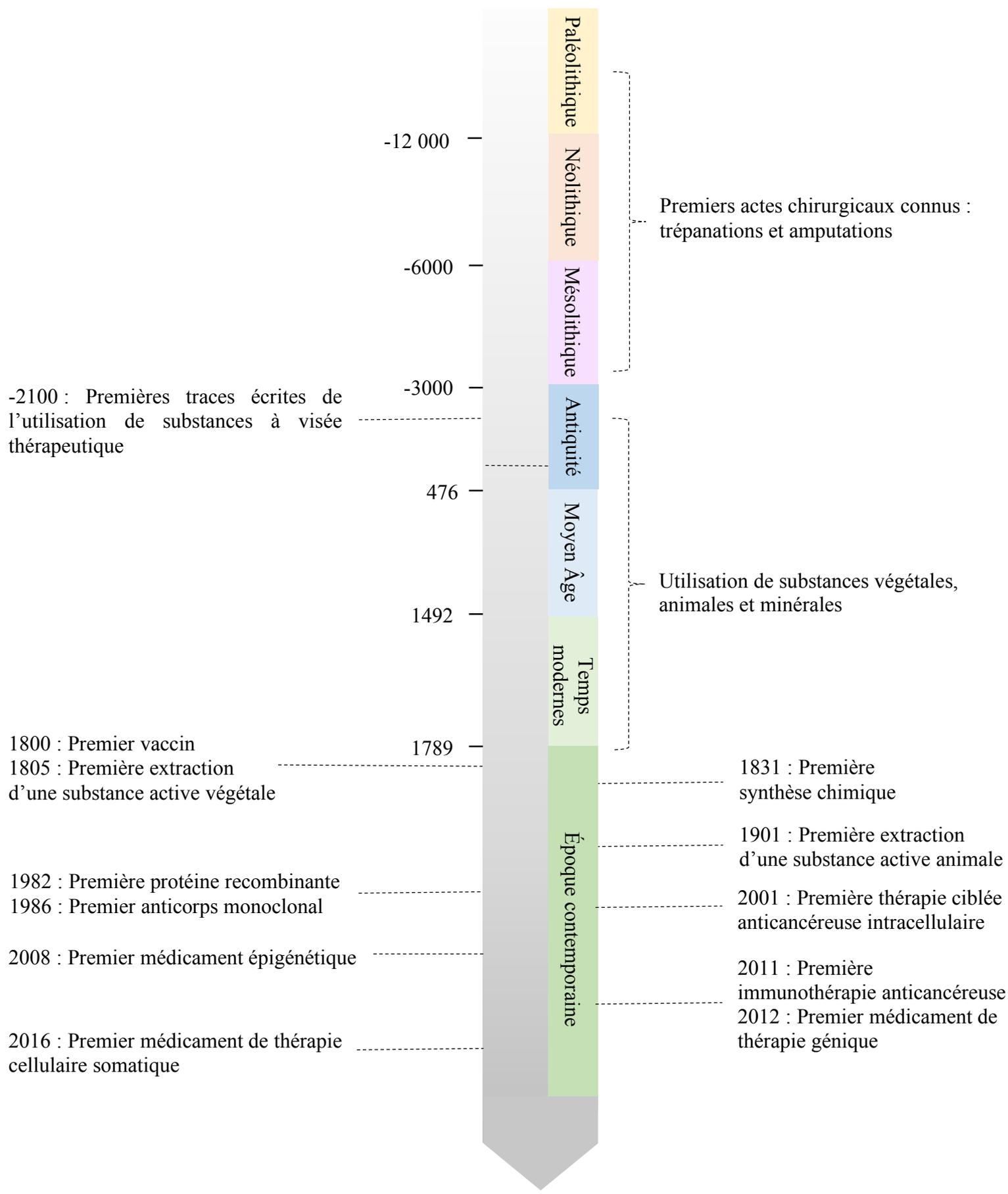
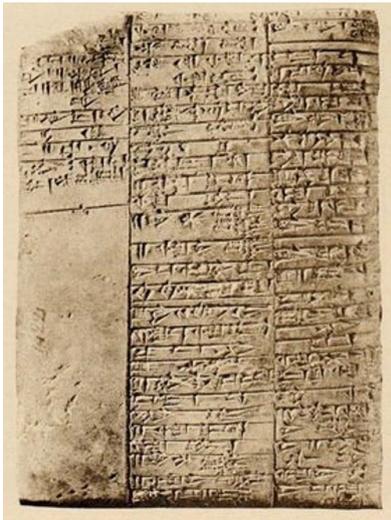


Figure 1 : Frise chronologique retraçant les principales découvertes thérapeutiques

Les premiers actes chirurgicaux connus, à savoir les trépanations et les amputations, témoignaient déjà de l'émergence de la volonté de guérison de l'homme préhistorique.^{1,2}

1.1. Pratiques thérapeutiques mésopotamiennes et égyptiennes

L'observation des pratiques de nos ancêtres représente un élément majeur de l'histoire du médicament.³ La trace écrite la plus ancienne du recours par l'homme à l'utilisation de substances à visée thérapeutique date d'environ 2100 années avant Jésus-Christ (J.-C.). Il s'agit de la Tablette de Nippur, aujourd'hui considérée comme la première pharmacopée mondiale connue, découverte en 1889 sur l'ancienne cité babylonienne de



Nippur soit des millénaires après sa rédaction.^{4,5} Cette dernière, en argile, retrace l'utilisation par un médecin sumérien de substances végétales comme le myrte, le sapin et le saule, animales comme la peau de serpent et les écailles de tortue, ou encore minérales comme le chlorure de sodium ou le nitrate de potassium. Ces matières premières étaient préparées par décoction puis filtration avec comme excipients de la bière, du vin ou diverses huiles.

Figure 2 : Tablette médicale sumérienne cunéiforme de Nippur, d'après le Musée d'Archéologie et d'Anthropologie de l'Université de Pennsylvanie © Penn Museum 2018⁶

Bien que ce document ne mentionne aucune formule « magique », l'utilisation empirique de substances naturelles en tant que remède était étroitement liée à des pratiques incantatoires et religieuses.⁴ En effet, les soignants d'hier étaient principalement des

prêtres, des magiciens, des guérisseurs ou des sorciers, qui préparaient et administraient des médicaments aux patients, en y associant des pratiques traditionnelles ou religieuses comme des paroles rituelles, des invocations à de multiples divinités voire de l'exorcisme.^{3,4}



Le papyrus Ebers, datant d'environ 1500 ans avant J.-C., renseigne quant à lui sur la pharmacopée égyptienne de l'époque, composée de diverses substances provenant des règnes végétal, animal et minéral et associée à de nombreuses formules « magiques ».³

Figure 3 : Papyrus Ebers, d'après la Bibliothèque Nationale de Médecine des États-Unis⁷

Ces écrits renseignent notamment sur l'utilisation ancestrale de plantes à visée thérapeutique, certaines contenant des substances actives encore largement utilisées de nos jours. Parmi elles, nous retrouvons le pavot blanc (*Papaverum somniferum album*), qualifié ancestralement de « plante de la joie » et utilisé depuis des millénaires pour ses propriétés antalgiques. En effet, l'incision de ses capsules permet le recueil d'opium, latex riche en alcaloïdes opiacés dont la codéine et la morphine.

1.2. Pratiques thérapeutiques gréco-romaines

La transmission écrite des pratiques thérapeutiques mésopotamiennes et égyptiennes a été suivie de la naissance de l'art médical occidental grec, illustré notamment par Hippocrate (460-377 avant J.-C. environ), considéré comme le père de la

médecine.^{3,4} Ce dernier établit une approche plus rationaliste de la médecine, en exemptant ses pratiques de considérations religieuses et magiques, et en considérant l'origine de la maladie comme naturelle.¹ La médecine antique gréco-romaine fut par la suite marquée par Claude Galien (131-201 environ après J.-C.), qui fit évoluer les connaissances en anatomie à partir d'observations anatomiques et de dissections animales, et établit plusieurs hypothèses de processus physiologiques.⁴ Alors que la cueillette de diverses plantes était le mode principal d'acquisition de médicaments, le développement des voyages et du commerce international dès la fin du VIII^{ème} siècle permit une multiplication des ressources thérapeutiques. De nombreuses plantes médicinales furent par la suite cultivées dans des jardins de monastères afin de faciliter l'accès à ces matières premières.³

L'héritage thérapeutique gréco-romain fut transmis aux sociétés arabo-perses et complété aux alentours de l'an 1000 par des auteurs tels que Rhazès (865-925) et Avicenne (978-1037). Bagdad vit naître la profession pharmaceutique, distincte de la profession médicale, au VIII^{ème} siècle. Sous le terme de « sayadila » était désigné un spécialiste de la fabrication et de la délivrance des médicaments, prédécesseur de l'apothicaire devenu plus tard pharmacien.⁴

1.3. Pratiques thérapeutiques du Moyen Âge aux Temps modernes

Au Moyen Âge cohabitèrent deux types de médecine : la médecine « officielle », à savoir celle d'Hippocrate et de Galien, et la médecine « populaire », représentée par les guérisseurs et charlatans. Les saignées et les purgations étaient très répandues et de nombreuses substances animales, végétales et minérales étaient indiquées sous différentes formes galéniques avec des compositions et des posologies mal définies.¹

Les Temps modernes furent marqués par une forte évolution des connaissances en anatomie et physiologie avec notamment la découverte de la circulation sanguine, des microorganismes et des cellules. Il y eut alors une première remise en cause puis un rejet progressif des préceptes antiques et du galénisme ; le charlatanisme fut banni.⁴ Ce n'est qu'à partir du XVIII^{ème} siècle qu'il y eut une réelle avancée dans l'histoire des médicaments, par la découverte de la vaccination d'une part, et la naissance de la chimie d'autre part.

2. La vaccination et l'ère de la chimie : des tournants dans l'histoire de la pharmacie

2.1. La vaccination, premier médicament de la médecine préventive

Bien que la variole, maladie virale hautement contagieuse et fréquemment mortelle, ait été décrite pour la première fois au IV^{ème} siècle, il semblerait qu'elle soit beaucoup plus ancienne avec la découverte de cicatrices de pustules varioleuses sur des momies égyptiennes. Dès le XI^{ème} siècle, des peuples prévenaient la gravité de la variole en déposant sur leur muqueuse nasale un matériel varioleux issu du contenu de pustules de malades : c'était la variolisation. Cette technique fut fréquemment employée au XVIII^{ème} siècle par plusieurs médecins.⁴ Edward Jenner (1749-1823), médecin de campagne, s'intéressa à la vaccine, une maladie bénigne de la vache contagieuse à l'homme. Il se rendit compte que les paysans contractant la vaccine ne pouvaient pas développer la variole. Ainsi, il eut l'idée d'inoculer par scarification à plusieurs personnes non plus du pus de pustules de patients varioleux, mais de personnes atteintes de vaccine, et de leur inoculer la véritable variole trois mois plus tard : ils ne développèrent pas la maladie.

C'était la découverte de la vaccination.⁴ La vaccination antivariolique s'étendit ensuite rapidement avec l'ouverture de centres spécialisés en Europe et en Amérique dès 1801, la promotion de la vaccination par Napoléon auprès de ses troupes en 1805 et l'obligation vaccinale pour tous en 1902.⁴

Il n'est cependant pas possible d'aborder les vaccins sans faire référence à Louis Pasteur (1822-1895), considéré comme le père de la vaccination. En 1879, il inocula de vieilles cultures de bactéries du choléra à des poules et constata que ces dernières ne mourraient pas de la maladie, même après inoculation de souches « fraîches » de bactéries. Il énonça ainsi le principe de l'atténuation, consistant à affaiblir artificiellement la virulence d'agents pathogènes et les utiliser comme vaccin afin de protéger de la survenue de la maladie liée à ces agents infectieux. Par cette découverte, il mit au point le premier vaccin humain à virulence atténuée contre la rage en 1885.⁴

2.2. L'essor de la chimie : une avancée majeure pour la thérapeutique

Les XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles furent marqués par des progrès considérables dans les sciences chimiques, contribuant à une amélioration considérable de la prise en charge thérapeutique des patients. L'avènement de la chimie fut un véritable tournant, permettant à la fois l'extraction et la purification de substances actives de matières organiques, ainsi que la synthèse chimique de différents composés.⁵ L'étude des médicaments devint une science : la pharmacologie, renforçant encore le déclin du galénisme.⁴

2.2.1. L'extraction et la purification de substances actives

Le développement de méthodes physico-chimiques innovantes permit l'extraction et la purification de substances actives d'origines végétale et animale.⁴ L'étude expérimentale en laboratoire de l'effet de ces substances sur des animaux constitua également une avancée majeure.⁴

La première extraction et purification de substances actives végétales fut réalisée en 1805 par un pharmacien allemand, Friedrich Wilhelm Adam Sertürner (1783-1841), qui isola l'opium des capsules de pavot blanc et l'appela morphine, du Dieu Morphée, pour ses effets antalgiques et narcotiques.^{4,5} La codéine fut quant à elle isolée de l'opium un peu plus tardivement, en 1832.⁵ L'extraction et la purification d'autres substances actives importantes sont à noter, comme celles de la quinine de l'écorce de quinquina en 1820 (antipaludéen) ou la digitoxine de la digitale en 1867 (cardiotonique).^{3,4}

L'extraction de substances actives animales, plus difficile, ne fut possible qu'au siècle suivant avec la purification de l'adrénaline à partir de glandes surrénales de divers animaux en 1901, suivie de la thyroxine en 1915.^{3,5} Une autre grande étape d'extraction d'une substance d'origine animale fut celle de l'insuline, à partir de pancréas de bœufs et de porcs en 1922.³ La découverte des héparines provient également du règne animal, avec l'extraction à partir de foies de chiens en 1916 d'une substance aux propriétés anticoagulantes, baptisée héparine. Après plusieurs années de recherche pour améliorer sa purification et son utilisation chez l'homme, les premières héparines furent produites à l'échelle industrielle dans les années 1940, à partir de muqueuses intestinales de porcs.⁸

2.2.2. La synthèse chimique de médicaments

Parallèlement à ces extractions, les premières synthèses chimiques de médicaments firent leur apparition.⁴ Il s'agissait désormais de synthétiser des substances actives naturelles afin d'en augmenter la production, de modifier leur structure chimique afin d'en améliorer l'efficacité ou diminuer la toxicité (pharmacomodulation), ou encore d'inventer de nouvelles molécules thérapeutiques, contribuant à l'élargissement de l'arsenal thérapeutique.⁵ Un autre intérêt de la chimie de synthèse était de garantir la standardisation de la production d'un médicament afin d'en améliorer sa sécurité d'emploi.⁹

Les premières synthèses

Les premiers médicaments synthétisés furent de petites molécules, simples, utilisées comme anesthésiques généraux par voie inhalée. Il s'agit du chloroforme, synthétisé en 1831, suivi du chloral en 1832 et du protoxyde d'azote en 1844, qui révolutionnèrent la pratique chirurgicale.⁵

Des découvertes hasardeuses

Le hasard a également joué un rôle dans la découverte de plusieurs molécules. En 1846, le chimiste italien Ascanio Sobrero (1812-1888) synthétisa la nitroglycérine, également appelée trinitrine, qui fut par la suite utilisée par Alfred Nobel (1833-1896) pour la fabrication de la dynamite. Quelques années plus tard, il mit en évidence de façon fortuite l'action vasodilatatrice de la trinitrine, en remarquant que le dépôt d'une gouttelette de nitroglycérine sur la langue entraînait d'intenses maux de tête.⁴ Ainsi, la trinitrine par voie sublinguale fut indiquée comme antiangoreux en 1879.⁵

D'autres médicaments de synthèse naquirent de l'industrie des colorants. En effet, l'aniline, un colorant naturel isolé par distillation de l'indigo, est à l'origine du développement des premiers antalgiques et antipyrétiques. L'acétanilide, la forme acétylée de l'aniline, possède des propriétés antipyrétiques qui furent fortuitement découvertes et conduisirent à sa commercialisation en 1886 sous le nom d'Antifébrine[®]. Cependant, son pouvoir méthémoglobinisant conduisit au développement d'analogues moins toxiques. Parmi eux, le célèbre paracétamol ou acétaminophène, qui ne fut commercialisé qu'en 1955 suite à des suspicions de néphrotoxicité.⁴

Bien que la découverte des antibiotiques soit fréquemment attribuée au hasard, l'utilisation de pâtes ou de peaux de fruits moisissus pour soigner des infections cutanées était déjà connue depuis l'Antiquité, témoignant de l'ancienneté du recours insoupçonné aux antibiotiques.⁴

La contamination accidentelle en 1928 de cultures de staphylocoques par des souches de *Penicillium notatum*, un champignon microscopique, conduisit Alexander Fleming (1881-1955) à découvrir la pénicilline.⁴ Cependant, les difficultés à isoler, purifier et produire en quantité suffisante la pénicilline la laissèrent dans l'ombre pendant plusieurs années, concurrencée par la synthèse chimique du premier sulfamide antibactérien en 1935 (le sulfamidochrisoïdine) qui domina alors le marché des antibactériens.⁴ La découverte de *Penicillium chrysogenum*, capable de produire deux cents fois plus de pénicilline que *Penicillium notatum*, permit la production de pénicilline G à l'échelle industrielle, qui devint alors un médicament essentiel lors de la deuxième guerre mondiale.⁴ La découverte de la pénicilline passa sous silence celle de la gramicidine par le biologiste français René Dubos (1901-1982), qu'il isola en 1939 à partir de la bactérie *Bacillus brevis* et qui fut commercialisée avant la pénicilline.⁴

Quelques découvertes importantes

Après extraction de la salicine de l'écorce de saule blanc en 1829, l'acide salicylique, métabolite actif de la salicine, fut synthétisé chimiquement puis l'acide acétylsalicylique, dérivé plus actif, fut identifié à partir de la reine-des-prés (*Filipendula ulmaria*) et synthétisé en 1853, conduisant à la commercialisation de l'Aspirine® en 1899.⁴

Le premier inhibiteur de l'enzyme de conversion a été quant à lui synthétisé par analogie de structure avec le téprotide, un peptide aux effets antihypertenseurs issu du venin de la vipère brésilienne *Bothrops jararac*. Il s'agit du captopril, commercialisé en 1975.⁴

L'ère de la chimiothérapie anticancéreuse débuta dans les années 1940, suite à l'observation des effets du gaz moutarde, utilisé comme gaz de combat au cours de la première et de la seconde guerre mondiale. L'autopsie de soldats révéla le pouvoir aplasiant médullaire de ce gaz et conduit à la synthèse d'analogues, dont la méchloréthamine (ou chlorméthine, Caryolysine®) qui sera le premier médicament anticancéreux commercialisé en 1949. Il sera suivi du chlorambucil (Chloraminophène®) et du cyclophosphamide (Endoxan®).^{4,10}

Quelques années plus tard, la zidovudine fut synthétisée à visée anticancéreuse, mais sa trop grande toxicité n'en permit pas son approbation. Ses propriétés antivirales contre les rétrovirus avaient cependant été remarquées chez la souris, ce qui lui permit d'être de nouveau testée chez l'homme suite à la découverte du virus de l'immunodéficience humaine en 1985. Ce fut le premier traitement antirétroviral, approuvé en 1987.⁴

Cette section a mis en lumière l'apport majeur de la chimie au développement de nouvelles thérapies. Par la suite, le recours à d'anciens concepts, à savoir l'utilisation de substances provenant de sources biologiques, fut une nouvelle piste pour la découverte de

nouveaux médicaments. C'est ainsi que de nouvelles avancées majeures virent le jour, optimisant encore la prise en charge thérapeutique des patients.

3. Les biotechnologies, au cœur de l'innovation thérapeutique

Les biotechnologies sont des technologies récentes ayant modifié fondamentalement la façon de synthétiser des médicaments, en permettant une production standardisée, sécurisée et en quantité suffisante de molécules innovantes que les techniques industrielles classiques ne pouvaient pas assurer. En effet, il s'agit désormais de produire des substances actives à partir de sources biologiques, d'organismes vivants : c'est la naissance des médicaments biologiques, également appelés biothérapies.¹¹

Dans cette section, nous allons retracer les grandes étapes de l'apport des biotechnologies aux progrès thérapeutiques, ayant permis la constitution de l'arsenal thérapeutique d'aujourd'hui.

3.1. La naissance des biotechnologies

Les biotechnologies sont nées dans les années 1950, avec la mise en évidence de la structure de l'ADN par Francis Crick (1916-2004) et James Watson (né en 1928). L'avènement des sciences génomiques et l'accès à l'information génétique par le séquençage de l'ADN ont permis la compréhension de processus physiopathologiques de nombreuses maladies au niveau moléculaire et de déterminer ainsi une multitude de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.¹² Les biotechnologies, en permettant la

découverte et la production de médicaments par des procédés inédits, ont révolutionné la médecine humaine.

3.2. Les protéines recombinantes

Avant le développement des biotechnologies, la production de protéines d'intérêt thérapeutique était limitée à quelques molécules issues de tissus humains ou animaux.⁴ Les biotechnologies, en permettant l'identification puis le clonage de gènes codant pour des protéines d'intérêt thérapeutique, ont rendu possible d'une part la synthèse de protéines recombinantes en grande quantité et de façon sécurisée, et d'autre part la mise sur le marché de nombreux nouveaux peptides.^{3,13,14} Leurs indications reposent principalement sur la prise en charge de diverses pathologies liées à un déficit en protéines endogènes, de maladies auto-immunes et de cancers. Les protéines recombinantes sont produites à partir d'un transgène, introduit dans un organisme hétérologue par génie génétique capable d'assurer la production en grande quantité de la protéine d'intérêt.^{3,13}

La première protéine recombinante mise sur le marché fut l'insuline, produite par biotechnologie en 1979 et commercialisée dès 1982, moins immunogène que l'insuline porcine ou bovine.⁴ De nombreuses autres protéines recombinantes firent ensuite leur apparition, de l'hormone de croissance aux facteurs de coagulation, en passant par les facteurs de croissance hématopoïétiques, les cytokines ou encore les enzymes destinées à l'enzymothérapie substitutive.^{3,4,14}

3.3. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été développés pour la première fois en 1975 par la technique des hybridomes, consistant à créer une cellule ayant la propriété de se multiplier

dans un milieu de culture approprié tout en synthétisant des anticorps.⁴ Les anticorps monoclonaux sont des immunoglobulines présentant l'avantage de pouvoir cibler des structures très spécifiques, et capables d'induire des effets cytolytiques après fixation à des cellules cibles, des effets antagonistes en se liant à des récepteurs membranaires cibles, ou encore de neutraliser l'action d'antigènes.¹⁵

Le premier anticorps monoclonal mis sur le marché en 1986 est un anticorps murin, il s'agit du muromonab, un anti-CD3 indiqué dans la prise en charge des rejets de greffe.⁴ Les progrès biotechnologiques ont ensuite permis la synthèse d'anticorps monoclonaux moins immunogènes par génie génétique. Le succès de la chimérisation, consistant à remplacer des domaines constants de l'immunoglobuline par ses homologues humains, a permis le développement en 1997 d'un anticorps monoclonal majeur. Il s'agit du rituximab (Mabthera[®]), un anti-CD20 indiqué notamment dans la prise en charge de certains lymphomes et utilisé dans de nombreuses autres indications hors oncologie (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Wegener, certaines vascularites, maladie du greffon contre l'hôte etc.).¹⁵ Des anticorps humanisés ont ensuite été développés, possédant seulement les régions hypervariables de l'immunoglobuline d'origine murine, ainsi que des anticorps humains.¹⁵

3.4. Les thérapies ciblées anticancéreuses

L'une des principales limites des chimiothérapies classiques est leur manque de sélectivité, en exerçant leurs effets aussi bien sur les cellules saines que les cellules cancéreuses, à l'origine d'une toxicité importante. L'identification de cibles thérapeutiques spécifiques aux tumeurs a permis le développement de molécules dirigées spécifiquement contre des mécanismes d'oncogenèse. C'est le cas des thérapies ciblées anticancéreuses,

visant à bloquer la croissance et/ou la propagation des cellules tumorales, en s'attaquant spécifiquement à certaines de leurs anomalies.¹⁶

Les thérapies ciblées sont généralement divisées en deux classes. La première classe comporte les anticorps monoclonaux ou inhibiteurs extracellulaires, définis précédemment, qui ciblent des antigènes spécifiques présents à la surface des cellules tumorales, tels que des récepteurs transmembranaires, ou des facteurs de croissance extracellulaires.¹⁷ Les anticorps monoclonaux peuvent être conjugués à des composés cytotoxiques, permettant une délivrance spécifique de ces derniers au niveau des cellules cancéreuses. C'est le cas du trastuzumab emtansine ou TDM-1 (Kadcyla[®]), indiqué dans le traitement du sein métastatique avec statut *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) surexprimé.¹⁸ La deuxième classe fait référence à des inhibiteurs intracellulaires également nommés « petites molécules », capables de pénétrer dans les cellules pour interagir avec leur cible. Il s'agit pour la majorité de cette classe d'inhibiteurs de tyrosine kinase, dont le chef de file est l'imatinib (Glivec[®]), commercialisé en 2001.¹⁷

3.5. L'immunothérapie anticancéreuse

Contrairement à la chimiothérapie conventionnelle et aux thérapies ciblées qui visent à détruire les cellules tumorales, l'immunothérapie a pour but de tirer profit du système immunitaire pour que ce dernier reconnaisse et détruise les cellules tumorales.¹⁹

La découverte de points de contrôle inhibant la réponse immunologique antitumorale a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à restaurer les fonctions cytolytiques du système immunitaire.²⁰ Le *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) et le *programmed-cell death-1* (PD-1), sont des molécules présentes à la surface des lymphocytes T inhibant la réponse lymphocytaire T lors de processus tumoraux.²¹

Différentes molécules ont été développées pour cibler ces points de contrôle, afin de restaurer les fonctions cytolytiques des lymphocytes T : il s'agit de l'ipilimumab (Yervoy[®]) (anti-CTLA-4), du nivolumab (Opdivo[®]) et du pembrolizumab (Keytruda[®]) (anti-PD-1) ou encore de l'atézolizumab (Tecentriq[®]) et du durvalumab (Imfinzi[®]) (anti-*programmed death-ligand-1* [PD-L1], le ligand du PD-1).²¹ Elles sont principalement indiquées dans le traitement des patients atteints de cancers bronchiques non à petites cellules, de carcinomes urothéliaux ou de mélanomes avancés.

Une autre technique permettant l'activation du système immunitaire est le recours à des anticorps bispécifiques, c'est-à-dire à des anticorps ayant la capacité de se lier à deux cellules différentes, par exemple à une cellule cancéreuse et à un lymphocyte T, entraînant ainsi l'activation du lymphocyte T et la destruction de la cellule tumorale.²² Le blinatumomab (Blinicyto[®]) est le premier anticorps bispécifique, bénéficiant depuis 2015 d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement de la leucémie aigue lymphoblastique à précurseurs B.

L'avènement des biotechnologies ainsi que la maîtrise du génie génétique ont contribué à la mise au point de médicaments de plus en plus ciblés et spécifiques. Aujourd'hui, les protéines recombinantes, les anticorps monoclonaux et les thérapies ciblées constituent une part de plus en plus importante de notre arsenal thérapeutique, tandis que l'immunothérapie continue de se développer. Depuis quelques années, des stratégies thérapeutiques toujours plus innovantes voient le jour, grâce aux connaissances apportées par de nouvelles technologies en pleine expansion : les approches « omiques ». Ces dernières offrent la possibilité d'appréhender dans leur globalité des systèmes biologiques complexes et dynamiques, et d'analyser une quantité massive de données afin de générer de nouvelles connaissances.

4. Les approches « omiques », une révolution thérapeutique ?

Le développement des technologies à haut débit, l'avènement des techniques de séquençage de l'ADN à grande échelle ainsi que le perfectionnement d'outils informatiques ont participé à la naissance des données massives (« *big data* ») en santé. Les avancées technologiques dans le traitement des données ont rendu possible l'analyse d'un très grand volume d'informations notamment biologiques et cliniques, et ont permis le développement des approches « omiques » à large échelle.²³ Les approches « omiques », en appréhendant la complexité du monde vivant dans son ensemble au moyen de méthodologies non restrictives, ne cherchent plus à valider des concepts déjà connus mais permettent de générer de nouvelles hypothèses en cherchant au-delà des connaissances actuelles.

4.1. Les différentes approches « omiques »

Les approches « omiques » constituent des technologies à haut débit permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de variables portant sur la génomique (avec l'identification de variants génétiques par exemple), l'épigénomique (avec la méthylation de l'ADN par exemple), la transcriptomique (étudiant l'expression des gènes), la protéomique (correspondant à l'analyse des protéines) ou encore la métabolomique (étudiant les métabolites produits).²⁴ Les approches « omiques » permettent, sur de larges populations, d'étudier les associations entre différents marqueurs « omiques » et une maladie, un trait de santé, une exposition, la réponse à un traitement etc. Elles permettent ainsi de générer de nouvelles connaissances sur les mécanismes physiopathologiques des maladies et d'identifier de nouveaux biomarqueurs associés à ces pathologies, qui représentent autant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.²⁴

4.2. Les médicaments issus de la génomique

Au cours des dernières décennies, des milliers de gènes impliqués dans la survenue de maladies génétiques ou de maladies multifactorielles complexes comme l'asthme ont été identifiés. Tout d'abord, les analyses de liaison génétique, reposant sur l'observation de familles dont plusieurs membres sont atteints d'une maladie, ont permis d'identifier des régions génomiques contenant les gènes responsables de ces maladies. Les analyses d'association génétique ont par la suite permis d'identifier plus précisément les gènes et *loci* responsables. Parmi elles, l'approche candidate, consistant à rechercher des variants génétiques dans les gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la survenue de ces maladies. Plus récemment, le développement de techniques de génotypage sur biopuces a permis l'émergence d'approches pangénomiques ou *genome-wide association study* (GWAS). Ces dernières consistent à génotyper l'ADN des sujets issus de larges cohortes épidémiologiques et à rechercher des associations entre des maladies ou des événements de santé et des variants génétiques, ces variants pouvant alors devenir des cibles thérapeutiques potentielles.²⁵

Ainsi, des médicaments issus des études génomiques ont été développés, et concernent notamment les médicaments de thérapie innovante. Parmi eux, les médicaments de thérapie génique, qui sont des biomédicaments contenant un acide nucléique ayant pour propriété de modifier une séquence génétique à visée thérapeutique, prophylactique ou diagnostique.²⁶ Le succès du premier essai de thérapie génique date des années 2000, par administration du gène codant pour l'adénosine désaminase, déficient chez les enfants atteints de certaines formes de la maladie des enfants-bulles.²⁷ Cependant, de graves effets indésirables apparurent et il fallut attendre 2012 pour voir, en Europe, le premier

médicament de thérapie génique commercialisé. Il s'agit de l'alipogène tiparvovec (Glybera[®]), contenant le variant du gène humain de la lipoprotéine lipase, indiqué dans le traitement des adultes présentant un déficit familial en cette enzyme.²⁸

Les médicaments de thérapie cellulaire somatique contiennent quant à eux des cellules ou des tissus qui ont été génétiquement modifiés, afin d'en modifier leurs caractéristiques et permettre le traitement, la prévention ou le diagnostic de maladies.²⁶ Le Zalmoxis[®] représente actuellement le seul médicament de thérapie cellulaire somatique, approuvé en 2016. Il est composé de lymphocytes T allogéniques génétiquement modifiés et est indiqué en traitement adjuvant lors de greffes de cellules souches hématopoïétiques, aidant les patients atteints d'hémopathies malignes à haut risque à renforcer leur système immunitaire et à se protéger des infections.²⁹

Le transfert adoptif de cellules est une approche combinant immunothérapie et thérapie cellulaire visant à stimuler le système immunitaire du patient.²⁰ Plusieurs méthodes sont utilisées, dont la thérapie génique des *chimeric antigen receptor-T (CAR-T) cells*, consistant à prélever les lymphocytes T du patient à partir de son sang, les modifier génétiquement afin qu'ils reconnaissent spécifiquement les cellules tumorales du malade, les cultiver et les réinjecter au patient pour qu'ils y exercent leur action.³⁰ Les deux premiers *CAR-T cells*, le tisagenlecleucel (Kymriah[®]) et l'axicabtagène ciloleucel (Yescarta[®]) ont obtenu une AMM européenne en août 2018 dans le traitement du lymphome B à grandes cellules chez l'adulte, et de la leucémie aiguë lymphoblastique B chez l'enfant et le jeune adulte de moins de 25 ans pour le tisagenlecleucel.²⁰

Outre la génomique, des médicaments issus des approches épigénomiques se sont développés au cours des dernières années et pourraient constituer une arme supplémentaire dans l'arsenal du clinicien de demain.

4.3. Qu'est-ce que l'épigénétique ?

Les mécanismes épigénétiques contrôlent l'accessibilité du génome et conduisent à des modifications dans l'expression des gènes, survenant sans modification de la séquence d'ADN.³¹ Le rôle des mécanismes épigénétiques dans la régulation de l'expression des gènes est important, comme le souligne le fait que bien que toutes les cellules d'un individu renferment le même patrimoine génétique, elles n'en font pourtant pas toutes le même usage. Le domaine de recherche de l'épigénome est depuis une dizaine d'années en pleine expansion et a conduit à l'identification de plusieurs mécanismes épigénétiques dont les principaux sont la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et l'expression de micro-ARNs. La méthylation de l'ADN est le mécanisme le plus étudié en recherche épidémiologique et fait référence à l'addition covalente d'un groupe méthyle sur une base cytosine appartenant à un dinucléotide Cytosine-phosphate-Guanine (CpG). Celle-ci a généralement pour finalité de réprimer la transcription des gènes, en affectant notamment les interactions entre les facteurs de transcription et l'ADN (Figure 4), bien que cela dépende de la région du gène dans lequel se trouve le groupement méthyle.³² Au contraire, les modifications des histones sont généralement associées à un relâchement de la structure de la chromatine permettant une activation de l'expression génique, et comprennent principalement la méthylation, l'acétylation ou la phosphorylation des histones. Enfin, les micro-ARNs sont des régulateurs de traduction capables de réprimer l'expression d'un gène en induisant une dégradation de l'ARN messager et/ou en inhibant sa traduction.³¹ Ainsi, les modifications épigénétiques contrôlent l'accessibilité du génome et conduisent à des modifications de l'expression des gènes.

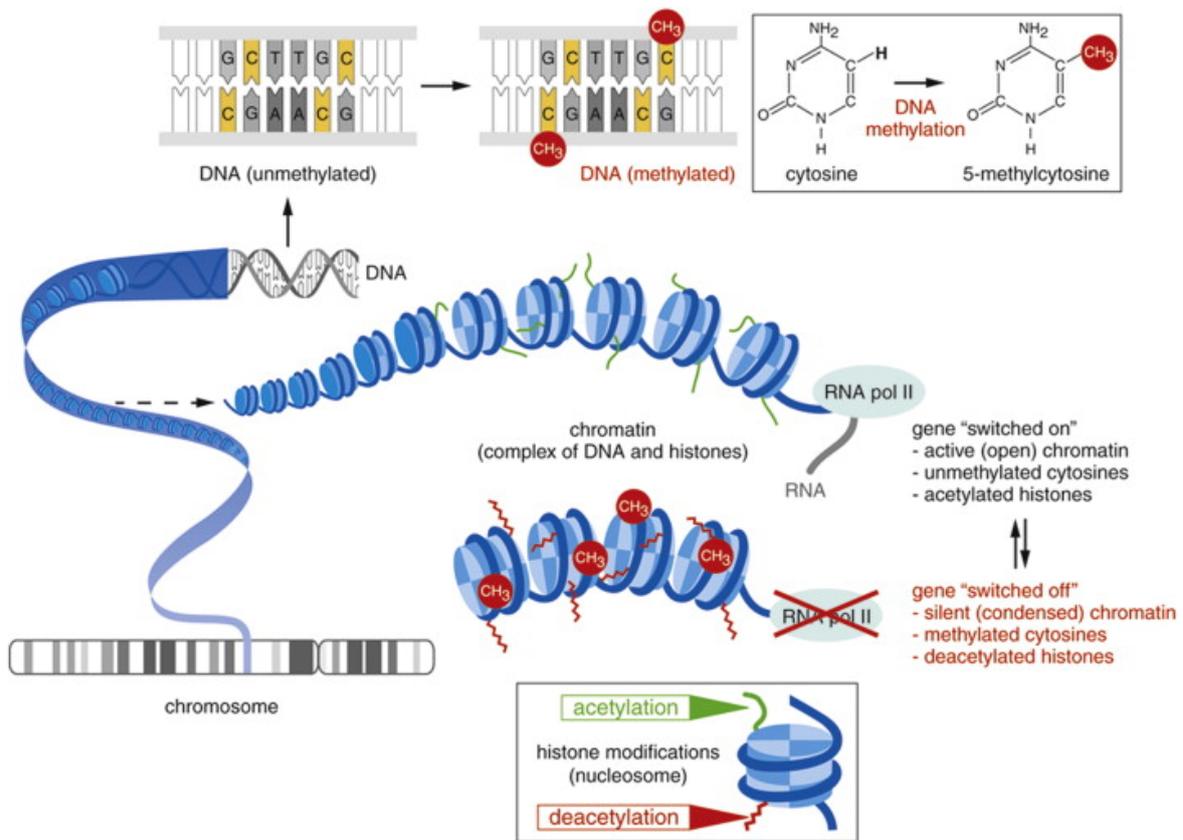


Figure 4 : Exemple de modifications épigénétiques : méthylation de l'ADN et acétylation des histones, d'après Mukherjee *et al.*³³

Les mécanismes épigénétiques sont influencés par l'environnement et offrent une base biologique à l'hypothèse DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease*, ou origines développementales de la santé et des maladies), selon laquelle les expositions subies au cours de la période prénatale et des premières années de vie (exposition à des polluants, alimentation, relations psychosociales etc.) influenceraient la santé ultérieure de l'enfant et de l'adulte.³⁴ Bien que les premières phases de développement d'un embryon soient caractérisées par une suppression quasi-totale des marques épigénétiques du génome, permettant d'établir un nouveau profil d'expression génique spécifique de l'œuf, certaines modifications épigénétiques persistent et peuvent être transmises à la

descendance. Cet effet transgénérationnel, bien que soumis à controverse chez l'homme, est établi chez l'animal.³⁵

Outre les expositions précoces, l'environnement peut induire des modifications épigénétiques tout au long de la vie, bien que le processus ne soit pas totalement élucidé. Des études menées chez des jumeaux monozygotes ont montré des niveaux de méthylation de l'ADN et d'acétylation des histones similaires lorsqu'ils étaient jeunes enfants, puis de plus en plus discordants lorsqu'ils devenaient plus âgés, signant l'influence de l'environnement et de l'expérience de chacun sur le patrimoine épigénétique.³⁶

Bien que la génétique ait montré la contribution de variants génétiques dans l'apparition de diverses pathologies, ces derniers ne peuvent cependant pas entièrement expliquer les variabilités phénotypiques importantes observées, notamment dans des maladies complexes.³⁷ Les modifications épigénétiques ont tout d'abord été démontrées dans les cancers, et leur rôle dans la survenue d'autres maladies chroniques, notamment l'asthme ou les maladies allergiques, a par la suite été mis en évidence.³⁸⁻⁴⁰ Plusieurs études soulignent l'importance de l'apport de l'épigénétique, en complément de la génétique, à la compréhension de l'étiologie de maladies. Par exemple, une étude dans l'asthme a estimé que les trois sites de méthylation majeurs associés aux taux d'immunoglobulines E (IgE) totales permettaient d'expliquer 13% de la variation des IgE totales, soit dix fois la variance expliquée par les principaux variants génétiques précédemment identifiés dans des études pangénomiques.⁴¹

Ainsi, l'épigénétique, en étant à la frontière des interactions gènes-environnement, a permis d'établir de nouvelles hypothèses physiopathologiques, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de nouveaux marqueurs prédictifs, diagnostiques et pronostiques.

4.4. Épigénétique et asthme : un domaine de recherche d'intérêt dans l'innovation thérapeutique

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires, caractérisée par une hyperréactivité bronchique et défini par des symptômes respiratoires tels que des sifflements, des oppressions thoraciques, une toux ou encore une dyspnée, réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement. Parmi les facteurs susceptibles de déclencher ou d'aggraver une crise d'asthme figurent les infections virales, l'exposition à des allergènes ou à la fumée de tabac, l'exercice, le stress ou encore le recours à certains médicaments (bêtabloquants, anti-inflammatoires).⁴²

L'asthme représente un véritable problème de santé publique puisque d'après l'Organisation mondiale de la santé, 235 millions d'individus en sont atteints et il s'agit de la maladie chronique la plus fréquente chez les enfants.⁴³ En France, la prévalence de l'asthme est estimée à plus de 10% chez les enfants de plus de 10 ans, et à 6 à 7% chez les adultes.⁴⁴ L'asthme reste une maladie grave avec plus de 1000 décès en 2006 et plus de 54 000 hospitalisations en 2007 en France.⁴⁵ Le coût total de la prise en charge de l'asthme est considérable, estimé à 33,9 milliards d'euros par an en Europe.⁴⁴

L'asthme est une maladie multifactorielle résultant d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, environnementaux et comportementaux. Elle est caractérisée par une forte hétérogénéité endo-phénotypique, basée sur l'existence de différentes caractéristiques cliniques, physiopathologiques et étiologiques.³⁷ Deux principaux phénotypes d'asthme ont été identifiés : l'asthme allergique et l'asthme non allergique. L'asthme allergique est le phénotype le plus courant, apparaissant préférentiellement pendant l'enfance et généralement associé à des antécédents personnels ou familiaux

d'allergies. L'asthme non allergique est quant à lui d'apparition plus tardive et généralement plus sévère.^{37,42,46,47}

Les objectifs de la prise en charge thérapeutique de l'asthme reposent sur le contrôle de la maladie, visant à prévenir la fréquence et la sévérité des symptômes et la survenue d'exacerbations. Outre les traitements aigus comme le salbutamol (Ventoline[®]) ou la terbutaline (Bricanyl[®]), deux bêta-2 agonistes de courte durée d'action utilisés à la demande dans le traitement des crises d'asthme et dans la prévention de l'asthme d'effort, les traitements de fond représentent le pilier de la prise en charge thérapeutique de l'asthme. Les corticostéroïdes inhalés à faibles doses sont considérés comme le traitement de première intention dans l'asthme ; ils contrôlent l'inflammation pulmonaire et diminuent l'hyperréactivité bronchique. Les bêta-2 agonistes de longue durée d'action, aux propriétés bronchodilatatrices, peuvent être introduits en deuxième ligne lorsque le contrôle de l'asthme n'est pas atteint avec les corticostéroïdes inhalés seuls ; la dose des corticostéroïdes inhalés peut également être augmentée. Des traitements supplémentaires peuvent être introduits aux corticostéroïdes inhalés seuls ou associés aux bêta-2 agonistes de longue durée d'action, bien qu'ils soient moins efficaces et non dénués d'effets indésirables. Il s'agit des antagonistes des récepteurs aux leucotriènes, dirigés contre des médiateurs de l'inflammation bronchique, et la théophylline (Dilatrane[®]), une méthylxanthine dérivée de la caféine aux effets bronchodilatateurs et anti-inflammatoires. En cas de persistance de symptômes ou d'exacerbations malgré une utilisation optimisée des traitements de fond précédents, le recours à d'autres thérapies est envisageable. Parmi elles, le tiotropium (Spiriva[®]), un anticholinergique de longue durée d'action, et les biothérapies. Ces dernières sont représentées par l'omalizumab (Xolair[®]), anticorps monoclonal humanisé anti-IgE indiqué en cas d'asthme allergique réfractaire ou encore le

mépolizumab (Nucala[®]) et le reslizumab (Cinqaero[®]), anticorps anti-interleukine-5 indiqués dans l'asthme hyperéosinophilique.⁴² Des stratégies non pharmacologiques sont à associer aux traitements médicamenteux afin d'améliorer le contrôle de l'asthme, comme le sevrage tabagique et l'éviction des allergènes et des substances susceptibles de déclencher une crise d'asthme.⁴²

Hormis les biothérapies apparues récemment et réservées à des indications restreintes, il n'existe pas à l'heure actuelle de nouveaux traitements de l'asthme. Bien que les corticostéroïdes inhalés soient le traitement le plus efficace pour contrôler cette maladie, les patients atteints d'asthme non allergique ont tendance à avoir une réponse insuffisante au traitement ; de plus, une résistance progressive aux corticostéroïdes inhalés peut apparaître au long cours, notamment dans les asthmes sévères.^{48,49} Enfin, malgré l'apport des biothérapies, plus de 40% de la population asthmatique présente un asthme non contrôlé, soulignant l'intérêt de développer des thérapies innovantes pour optimiser la prise en charge thérapeutique de ces patients.⁵⁰ Le nombre croissant d'études étayant un lien entre des modifications épigénétiques et l'apparition de l'asthme suggère qu'il est nécessaire d'encourager la recherche dans le développement de nouvelles thérapies épigénétiques dans cette maladie.^{39,51,52}

L'objectif de ce travail de thèse était de discuter l'apport de l'épigénétique dans l'innovation thérapeutique, en l'illustrant par un travail de recherche portant sur l'identification de sites de méthylation et de régions génomiques dont la méthylation était associée aux taux d'IgE totales dans l'asthme de l'adulte, maladie chronique fréquente au niveau mondial.

PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

DNA methylation and total IgE levels: an epigenome-wide association study in adults with asthma

ABSTRACT

Background: Asthma is a complex disease characterized by a phenotypic heterogeneity; the allergic features, mainly mediated by the immunoglobulin E (IgE), represent a major component of this heterogeneity. Beyond genetic and environmental factors, epigenetic mechanisms likely play a role in the onset of asthma and allergy, and might be involved in differentiating asthma phenotypes. The identification of differentially methylated *loci* and genomic regions associated with serum total IgE levels in adults with asthma may bring further insights into asthma heterogeneity.

Objective: To identify CpG sites and differentially methylated regions associated with total IgE levels in a population of adults with asthma.

Methods: High-resolution methylome data obtained by the methylC-capture sequencing (> 4 million CpG sites) were analyzed for total IgE levels in 357 adults with asthma from the Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy (EGEA) cohort, using an epigenome-wide approach. Replication of the most relevant CpG sites was investigated in the Medical Research Council for Eczema (MRCE) panel then a meta-analysis was performed.

Results: This epigenome-wide association study identified new CpG sites, replicated in the MRCE panel, and fifteen differentially methylated regions significantly associated with

total IgE levels, including new genomic regions mapping to the *IL-17RA*, *CLEC2A* and *ICOSLG* genes.

Conclusion: Using high-resolution methylome data, we identified new CpG sites and differentially methylated regions associated with serum total IgE levels in adults with asthma, including biologically relevant genes, supporting the hypothesis of the existence of epigenetic signatures disentangling allergic *versus* non-allergic asthma.

1. Introduction

Asthma is a global health problem whose prevalence is steadily increasing, affecting 5 to 16% of population worldwide.⁵³ Although its etiology and pathophysiology remain poorly understood, allergy represents a major component of the endo-phenotypic heterogeneity of asthma, leading to two major asthma phenotypes: allergic asthma and non-allergic asthma.^{37,42,52-55} The onset of asthma and allergy results from complex interactions between environmental, behavioral and genetic factors, whose the roles remain largely unknown.⁵⁶ Family and twin studies, followed by genetic association studies, showed the contribution of genetic determinants in asthma and allergic diseases, but they confer a relatively small increase in risk and explain only a small proportion of familial clustering.⁵⁷⁻⁶³ This missing heritability can partly reside in shared environmental factors, gene-environment and gene-gene interactions and epigenetic modifications.^{56,60-63}

Evidence for the role of epigenetic changes in asthma and allergic diseases is growing.^{39,40} More and more studies suggest that environmental factors playing or suspecting to play a role in allergic diseases onset (air pollution, maternal smoking during pregnancy, farm environment, phthalate exposure, active smoking) are associated with epigenetic signatures.^{36,64-68} Studies in humans that directly associate epigenetic changes with allergic diseases and asthma, gradually appear in scientific literature.^{41,51,69-72} One of the first epigenome-wide studies on total IgE levels identified different methylation sites associated with total IgE levels in subjects with asthma, some located in genomic regions with genes known to encode proteins associated with eosinophils (IL5RA, CCR3, IL1RL1, PRG2, GATA1...)⁴¹ Also, they reported that three major methylation sites identified accounted for 13% of total IgE variation, that represents ten times the variance explained by the major single-nucleotide polymorphisms (SNPs) previously identified in GWAS. To

date, associations between epigenetic modifications and various characteristics associated with asthma or allergic features (bronchial hyperreactivity, ventilatory function, persistence of wheezing in children, response to asthma treatments, allergic immune responses, persistence of childhood asthma) were highlighted.⁷³

Although a growing number of scientific evidences supports the role of epigenetic mechanisms in the development of asthma and allergic diseases, additional studies are needed, especially in cohorts of phenotypically well-characterized subjects to account for the clinical heterogeneity of the disease and using finer methylome data allowing targeting all immune-cells regulatory regions. To our knowledge, no epigenome-wide association study (EWAS) specifically addressed the epigenetic signatures associated with total serum IgE levels in a population of adults with asthma. Such study could bring further insights into asthma heterogeneity.

In this study, we aimed to identify methylation sites and regions associated with total IgE levels in adults with asthma using an epigenome-wide approach.

2. Methods

2.1 Study population

The Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy (EGEA) is a French cohort followed-up for more than twenty years, combining a case-control study and a family study of asthma.⁷⁴ From 1991 to 1995 (EGEA1), 2047 subjects aged 7 to 70 years were recruited, including asthmatic cases recruited in chest clinics, their first-degree relatives and spouses and population-based controls (Figure 5). About twelve years later, EGEA1 participants were invited for a first

follow-up (EGEA2, 2003 to 2007; 1601 subjects). At EGEA1 and EGEA2, participants completed detailed questionnaires on respiratory health, allergy and environment and participated in a medical examination (lung function testing, blood sampling with total IgE measurements and skin-prick tests).

The current analysis was conducted in 357 adults with asthma and DNA methylation measured either twice, at EGEA1 and EGEA2, for 242 participants, or once, at EGEA2, for 115 participants, totaling 599 samples.

Written consent was obtained from all individuals. Ethical approval was obtained for the EGEA study by the relevant institutional review board committees (Cochin Port-Royal Hospital and Necker-Enfants Malades Hospital, Paris).

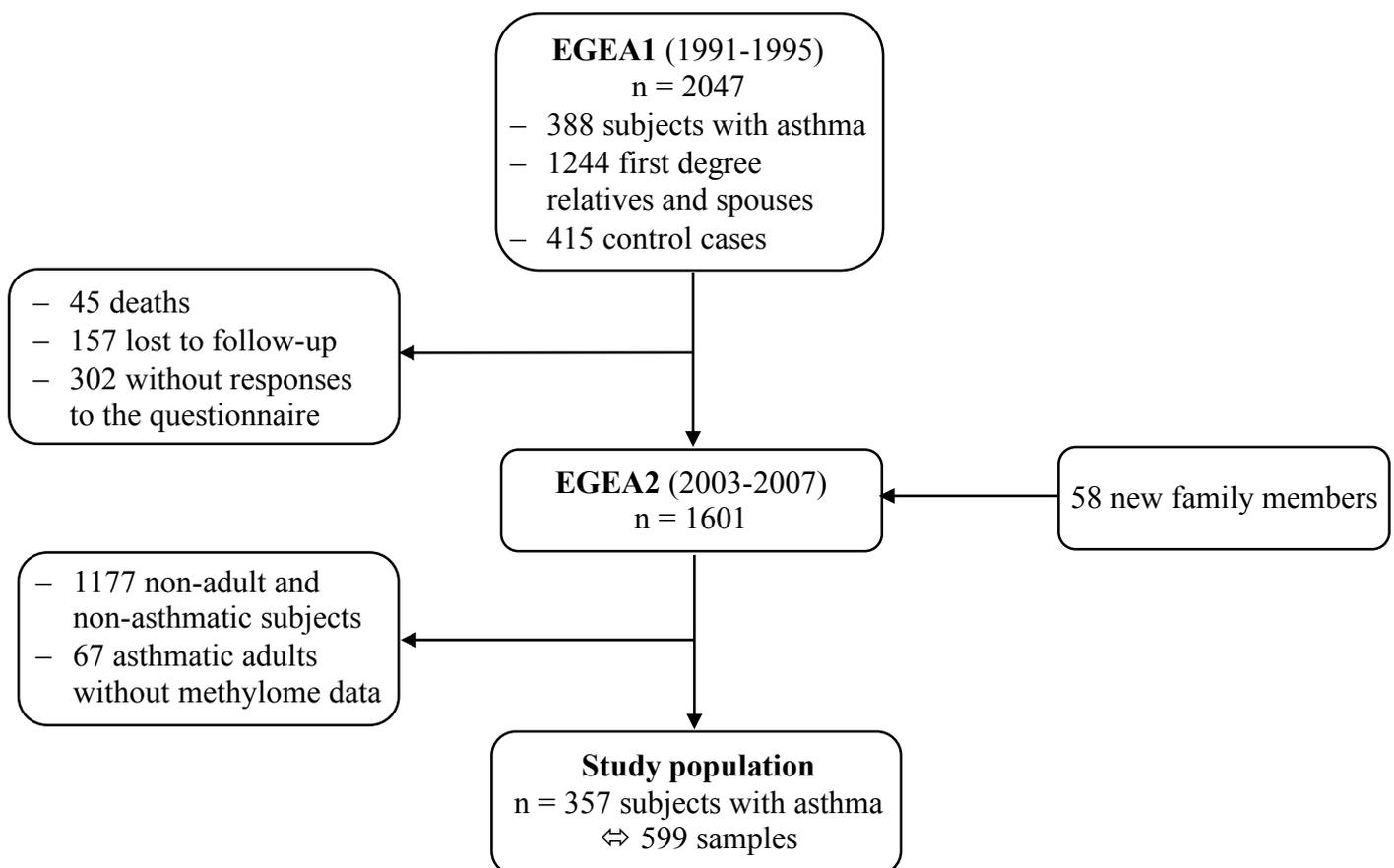


Figure 5 : Flow chart of the EGEA study population

Asthma definition

Ever asthma was defined by a positive answer to either “Have you ever had attacks of breathlessness at rest with wheezing?” or “Have you ever had asthma attacks?” or being recruited as an asthma case in chest clinics. Active asthma was defined by the occurrence of an asthma attack or the use of a reliever medication during the last 12 months.

2.2 DNA methylation measurement

DNA was extracted from buffy coat of whole blood and sequencing methylome data was obtained using an innovative sequencing approach: the methylC-capture sequencing (MCC-Seq). This approach, developed by the Epigenome Center of Mc Gill University in collaboration with Roche, targets sequencing of functional methylomes and regulatory regions poorly represented by microarrays, as enhancers, allowing a denser coverage of the genome with methylation measurement for almost four million CpG sites.⁷⁵ DNA methylation of each CpG site, defined as the beta-value, was measured by the number of methylated reads over the total number of sequenced reads.

Quality control

CpG sites were *a priori* selected on the following quality criteria: 1) present on autosomes (n= 4 406 143), 2) non-missing data for at least 100 samples, 3) with at least 10% of the samples with methylation levels different from 0 or 1 (hypo- or hyper-methylated CpG sites, respectively) and 4) number of reads below 150 (an indicator of sequencing defect). Following these selection criteria, 2 815 708 CpG sites (63.9%) were included in the analysis, including 10.6% CpG sites present on the HumanMethylation

450K chip. Among CpG sites detected on the Illumina 450k chip, 68.2% were covered by our MCC-seq method after the quality control steps.

Genome feature association (annotation)

The physical annotation of CpG sites derived from tables of genomic features in the Human reference genome hg19 format from University of California, Santa Cruz (UCSC) Genome Browser, downloaded on September 10, 2013. Sixteen positions were identified (3'untranslated transcribed region [UTR], 5'UTR, CpG island, exon, first exon, intron, north and south shelves, north and south shores, 200-base pairs [bp] – 1000-bp – 1500-bp regions centered at the transcription start sites [TSS200, TSS1000, TSS1500] or at the transcription termination sites [TTS200, TTS1000, TTS1500]).⁷⁶ For the functional positions, which relate to the position of CpG sites on regulatory regions in whole-genome bisulfite sequencing from blood samples or eosinophils samples, annotation tables were downloaded from three different projects: the TwinsUK cohort, the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) and the National Institutes of Health Roadmap Epigenomics Project.⁷⁷⁻⁷⁹ Several regions were identified, detected in blood and eosinophils samples: regulatory low methylated regions (LMRs) and unmethylated regions (UMRs), regions around DNase I hypersensitive sites (DHS) detected in different cluster of differentiation (CD) and T helper (Th) cells, regions containing both histone H3 lysine 4 methylation (H3K4me) and histone H3 lysine 27 acetylation (H3K27ac) epigenetic marks or both histone H3 lysine 4 trimethylation (H3K4me3) and H3K27ac epigenetic marks and regions at more or less 200 bp around an autoimmune related SNP.

2.3 Statistical methods

Epigenome-wide association study in the EGEA cohort

For each CpG site, we fitted a generalized linear model (logit link function) assuming a binomial distribution of methylation levels, considering the proportion of methylated reads weighted for sequence read coverage as the dependent variable, and total IgE level (transformed into logarithm due to the log-normal distribution of this parameter) as independent variable.⁸⁰ Model was adjusted for age, sex, smoking status (never smokers *versus* ever smokers) and measured blood proportions of monocytes, lymphocytes, neutrophils, eosinophils and basophils and considered the repeated data and the familial dependence. The equation used is the following:

$$CpG[methylated \& unmethylated] \sim total \ IgE + age + sex + smoking \ status + differential \ white \ blood \ cell \ counts + (1|family) + (1|nodos)$$

Associations were tested with the likelihood ratio test. The p-values were corrected for multiple comparison using the false discovery rate (FDR) method of Benjamini & Hochberg.⁸¹ FDR-corrected p-values below 0.05 were considered as statistically significant. Statistical analyzes were performed with the R software (version 3.4.2).

Enrichment analyzes

To assess whether the most relevant CpG sites (CpGs with uncorrected p-value $\leq 10^{-4}$ *versus* all others) were overrepresented in some physical and functional locations, enrichment analyzes were performed using Fisher's exact test on the contingency table, which gives a p-value by annotated region indicating the probability of obtaining any such set of values given by the hypergeometric distribution.

Identification of differentially methylated regions

We identified differentially methylated regions (DMRs) associated with total IgE levels using the comb-p method, which allows to calculate an overall p-value for a genomic region, called Stouffer-Liptak-Kechris (SLK)-Sidak p-value.⁸² DMRs were sought in genomic regions of 400 bp surrounding CpG sites with a FDR-corrected p-value adjusted for the computed correlation $\leq 10^{-4}$. We identified as DMRs regions associated with a SLK-Sidak p-value ≤ 0.05 , and among those regions, we specifically focused on regions containing at least two CpG sites with p-value $\leq 10^{-3}$.

A specific attention was given to CpG sites and DMRs located in LMRs and UMRs, respectively associated with promoter regions and distal regulatory regions such as enhancers.

Replication phase in the MRCE study and meta-analysis

Replication of the most relevant CpG sites (CpGs with uncorrected p-value $\leq 10^{-4}$) was investigated in an independent cohort, the medical research council for eczema (MRCE) panel, for which total IgE levels were available and the MCC-Seq method applied for methylome sequencing. This panel is composed of 192 children with eczema. A meta-analysis was performed to combine the results from the two cohorts with a fixed-effects model, using the regression coefficient and standard error from each study for the CpG sites identified in the EGEA cohort with uncorrected p-value $\leq 10^{-4}$.

The comb-p method was applied in the MRCE cohort to search if DMRs defined with a SLK-Sidak p-value ≤ 0.05 and identified in genomic regions of 400 bp surrounding CpG sites with a FDR-corrected p-value adjusted for the computed correlation $\leq 10^{-4}$, overlapped with DMRs identified in EGEA.

Candidate approach focused on published EWAS results for total IgE levels

We extracted CpG sites associated with total IgE levels in published EWAS and aimed to replicate them in our study^{41,69-72}. P-values were corrected according to the number of CpG sites extracted ($FDR \leq 0.05$).

3. Results

3.1 Description of the study population

At EGEA2, the mean (standard deviation, [sd]) age of the study population was 43.1 (15.8) and the mean (sd) age of asthma onset was 16.8 (15.2) years (Table I). Half of the population were men (51.3%) and half were ever smokers (48.5%). Overweight subjects represent 38.3% of the study population and almost all patients (95.5%) had active asthma. The geometric mean (GM) (confidence interval [CI] 95%) of log-transformed total IgE was 124.1 (7.5 - 2053.5).

Table I : Description of the study population at EGEA1 and EGEA2

Variable	EGEA1		EGEA2	
	n	Statistics	n	Statistics
Number of subjects	242		357	
Female, n (%)	242	126 (52.1)	357	174 (48.7)
Age, mean \pm sd (years)	241	38.1 \pm 13.2	357	43.1 \pm 15.8
Range		25.5 – 64.5		20.2 – 75.9
Age of asthma onset, mean \pm sd (years)	237	18.9 \pm 15.3	341	16.8 \pm 15.2
Range		0 – 57		0 – 61
BMI (kg.m ⁻²), n (%)	240		355	
< 20		45 (18.8)		42 (11.8)
[20-25[134 (55.8)		177 (49.9)
\geq 25		61 (25.4)		136 (38.3)
Smoking status, n (%)	240		357	
Smoker		120 (50.0)		184 (51.5)
Non-smoker		120 (50.0)		173 (48.5)
Active asthma, n (%)	231	199 (86.1)	356	340 (95.5)
Total IgE (log-transformed), GM (CI 95%)	242	182.8 (8.4 – 3062.0)	357	124.1 (7.5 – 2053.5)

BMI: body mass index; CI: confidence interval; GM: geometric mean; sd: standard deviation

3.2 Epigenome-wide association study

EWAS results are presented in the Manhattan plot, Figure 6. Among the 2 815 708 CpG sites analyzed, 140 038 were associated with total IgE levels with a p-value \leq 0.05 before correction for multiple hypothesis testing, including 5 CpG sites with p-value between 10^{-6} and 10^{-7} , 35 with p-value between 10^{-5} and 10^{-6} and 277 CpG sites with p-value between 10^{-4} and 10^{-5} . After correction for multiple testing, no CpG site reached the statistically significant level (FDR \leq 0.05). The 40 CpG sites with a p-value \leq 10^{-5} are described in Table II. Among these main results, several genes were associated in previous epigenetic studies with different asthma phenotypes, such as the somatostatin receptor 3 (*SSTR3*) gene and the major facilitator superfamily domain containing 6 like (*MFSD6L*) gene, and some new CpG sites mapping to biologically relevant genes or associated with

asthma phenotypes in genetic studies were identified, such as the inducible T cell costimulator ligand (*ICOSLG*) gene, the interleukin-1 receptor associated kinase 2 (*IRAK2*) gene and the B cell CLL/lymphoma 11B (*BCL11B*) gene.^{70,83–86}

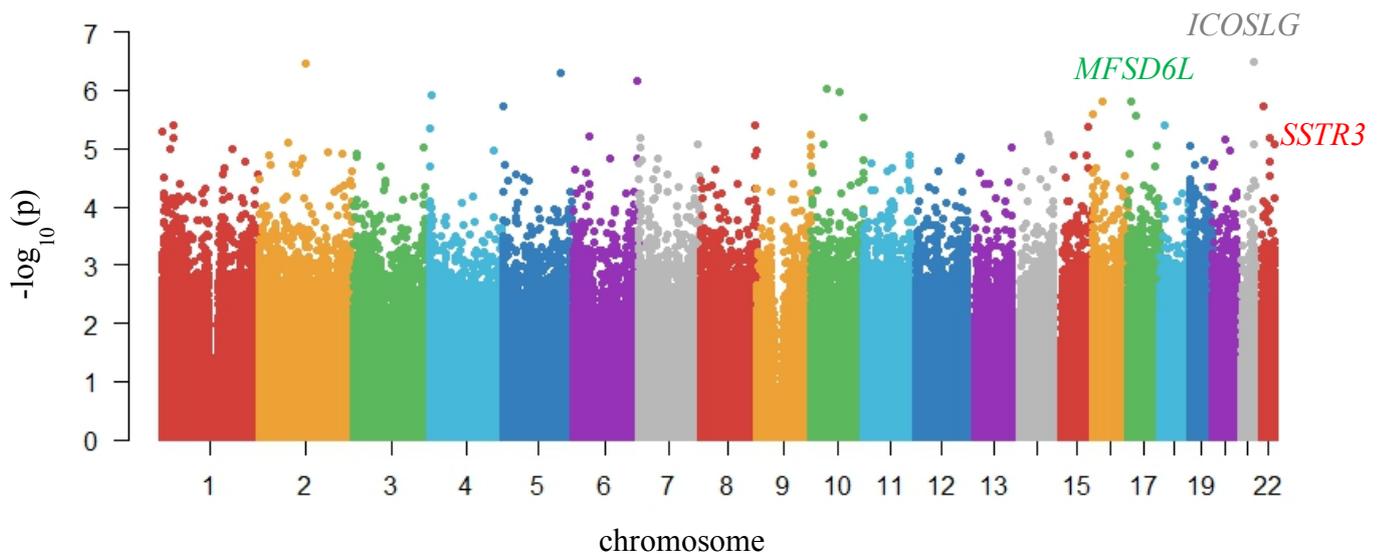


Figure 6 : Manhattan plot of the EWAS results between methylation and total IgE levels in the EGEA cohort

Table II : Description of the top 40 CpG sites associated with total IgE levels in the EGEA cohort (uncorrected p-values $\leq 10^{-5}$)

Chr	Position	p-value	Physical location	Functional location	Beta	Standard error	Gene	Illumina 450K chip
1	871620	5.04e-06	Intron, CpG island	-	-0.21	0.05	<i>SAMD11</i>	-
1	19209845	9.86e-06	Exon, CpG island	-	0.24	0.05	<i>ALDH4A1</i>	-
1	26421442	6.65e-06	-	-	-0.20	0.05	<i>*TRIM63</i>	-
1	26692028	3.94e-06	Intron	-	0.16	0.04	<i>ZNF683</i>	-
2	74618156	7.79e-06	Intron, 5'UTR, north shore	Blood and eosinophils UMRs	0.31	0.07	<i>DCTN1</i>	-
2	122018008	3.55e-07	Intron	-	-0.59	0.12	<i>TFCP2L1</i>	-
3	184504152	9.56e-06	-	Blood and eosinophils LMRs	-0.11	0.03	<i>*MAGEF1</i>	-
4	1949925	4.46e-06	Exon, intron, 3'UTR	-	0.30	0.07	<i>WHSC1</i>	-
4	6198775	1.24e-06	Intron, 5'UTR	-	0.33	0.07	<i>JAKMIP1</i>	-
5	433237	1.84e-06	Intron	-	-0.26	0.05	<i>AHRR</i>	-
5	149104715	4.98e-07	-	Eosinophils LMR	0.23	0.05	<i>*ARHGEF37</i>	-
6	40722349	6.06e-06	-	Blood UMR	0.13	0.03	<i>*LRFN2</i>	-
6	168228753	6.96e-07	Intron	Blood and eosinophils UMRs, DHS CD20 cells	0.33	0.07	<i>MLLT4</i>	-
7	2197717	6.40e-06	Intron, south shore	-	0.16	0.03	<i>MAD1L1</i>	-
7	2635408	9.58e-06	Intron, south shore	-	0.11	0.02	<i>IQCE</i>	-
7	150756322	8.41e-06	Intron, 5'UTR, north shore, south shore	Blood and eosinophils UMRs, DHS CD3 / CD8 / CD19 / Th2 cells	0.34	0.08	<i>SLC4A2</i>	-
8	142597651	4.04e-06	-	Blood LMR	0.13	0.03	<i>*MROH5</i>	-
9	138628097	9.67e-06	Intron, CpG island, south shore	-	-0.19	0.04	<i>KCNT1</i>	-
9	140507021	5.62e-06	Intron	-	-0.19	0.04	<i>ARRDC1</i>	-
10	31924487	8.62e-06	-	DHS CD14 cells	-0.28	0.06	<i>*ZEB1</i>	-
10	38069784	9.47e-07	Intron	-	0.37	0.08	<i>ZNF248</i>	-
10	74489461	1.07e-06	Intron	DHS CD20 cells	-0.14	0.03	<i>MCU</i>	-
10	134703376	2.88e-06	Intron	-	0.21	0.05	<i>TTC40</i>	cg06175955

13	113745560	9.83e-06	Intron, CpG island, south shelf	-	-0.43	0.01	<i>MCF2L</i>	-
14	92923543	5.92e-06	Intron	-	-0.19	0.04	<i>SLC24A4</i>	-
14	99726688	7.41e-06	Intron	DHS CD3 / Th2 cells	-0.14	0.03	<i>BCL11B</i>	-
15	90892480	4.17e-06	Exon, north shelf	-	0.46	0.10	<i>*NGRN</i>	-
16	1393793	2.59e-06	Intron, CpG island, south shore	Eosinophils LMR, DHS CD8 cells	0.20	0.04	<i>BAIAP3</i>	-
16	23598601	1.51e-06	Exon	-	0.49	0.10	<i>NDUFAB1</i>	-
17	8703364	1.52e-06	TTS1000	-	0.14	0.03	<i>*MFSD6L</i>	-
17	21415527	2.71e-06	CpG island, shore north	Blood UMR	-0.53	0.11	<i>C17orf51</i>	cg19091902
17	73823917	9.13e-06	Exon, 3'UTR	DHS CD3 / CD4 / CD8 / CD19 / CD34 / CD56 / Th2 cells	-0.22	0.05	<i>UNC13D</i>	-
18	13437903	3.88e-06	Intron	-	0.13	0.03	<i>LDLRAD4</i>	-
19	1133446	8.73e-06	Intron, TTS1500	Blood and eosinophils UMRs, H3K4me3 and H3K27ac, DHS CD3 / CD4 / CD8 / CD56 / Th2 cells	-0.21	0.05	<i>SBNO2</i>	-
20	33133505	7.11e-06	-	-	-0.41	0.09	<i>*DYNLRB1</i>	cg14880655
21	45628025	3.14e-07	-	Blood and eosinophils LMRs, DHS CD14 / CD19 / CD34 / Th1 / Th2 cells	0.19	0.04	<i>*ICOSLG</i>	-
21	45628029	8.59e-06	-	Blood and eosinophils LMRs, DHS CD14 / CD19 / CD34 / Th1 / Th2 cells	0.17	0.04	<i>*ICOSLG</i>	-
22	20863398	1.88e-06	Intron, south shore	Blood and eosinophils UMRs	-0.13	0.03	<i>MED15</i>	-
22	37603361	6.53e-06	Exon, CpG island	-	0,38	0.08	<i>SSTR3</i>	-
22	50976581	8.52e-06	-	H3K4me and H3K27ac	-0.18	0.04	<i>*ODF3B</i>	-

Ac: acetylation; CD: cluster of differentiation; Chr: chromosome; DHS: DNase I hypersensitive sites; H3K4me: histone H3 lysine 4 methylation; H3K4me3: histone H3 lysine 4 trimethylation; H3K27ac: histone H3 lysine 27 acetylation; LMR: low methylated region; TTS: transcription termination site; UMR: unmethylated region; UTR: untranslated transcribed region

*gene located upstream or downstream of the CpG site.

3.3 Enrichment analyzes

Enrichment analyzes for physical location identified an overrepresentation of the most strongly associated CpG sites (uncorrected p-value $\leq 10^{-4}$) in introns ($p = 3.20 \times 10^{-4}$; Table III). For functional location, no significant association was identified.

Table III : Results of enrichment analyzes in the EGEA cohort

a) for physical location

Physical location	p-value	Target location and p-value $\leq 10^{-4}$	Target location and p-value $> 10^{-4}$	Other locations and p-value $\leq 10^{-4}$	Other locations and p-value $> 10^{-4}$
Intron	3.20e-04	169	1 249 115	143	1 566 281
South shelves	8.60e-02	34	240 461	278	2 574 935
North shelves	0.16	32	240 562	280	2 574 834
TSS200	0.24	3	15 355	309	2 800 041
3'UTR	0.60	9	84 673	303	2 730 723
5'UTR	0.61	34	317 425	278	2 497 971
TSS1000	0.77	6	68 774	306	2 746 622
TTS1000	0.78	24	247 461	288	2 567 935
TSS1500	0.80	9	102 424	303	2 712 972
South shores	0.85	37	385 501	275	2 429 895
TTS1500	0.88	28	305 213	284	2 510 183
TTS200	0.94	3	53 739	309	2 761 657
Exon	0.99	36	447 456	276	2 367 940
North shores	0.99	30	392 033	282	2 423 363
First exon	0.99	8	149 898	304	2 665 498
CpG island	0.99	44	602 645	268	2 212 751

b) for functional location

Functional location	p-value	Target location and p-value $\leq 10^{-4}$	Target location and p-value $> 10^{-4}$	Other locations and p-value $\leq 10^{-4}$	Other locations and p-value $> 10^{-4}$
Eosinophils LMR	0.38	36	306 248	276	2 509 148
SNPs autoimmune diseases 200bp	0.42	1	4 977	311	2 810 419
H3K4me and H3K27ac	0.45	3	22 502	309	2 792 894
Blood LMR	0.47	40	353 136	272	2 462 260
DHS Th1 cells	0.59	5	46 505	307	2 768 891
DHS CD34 cells	0.84	21	228 620	291	2 586 776
H3K4me3 and H3K27ac	0.87	3	44 744	309	2 770 652
DHS CD20 cells	0.90	16	190 781	296	2 624 615
DHS CD14 cells	0.95	3	57 432	309	2 757 964
DHS Th2 cells	0.96	19	240 131	293	2 575 265
DHS CD8 cells	0.97	23	293 896	289	2 521 500
DHS CD3 cells	0.97	14	197 078	298	2 618 318
DHS CD56 cells	0.98	16	226 623	296	2 588 773
DHS CD4 cells	0.99	8	138 915	304	2 676 481
DHS CD19 cells	0.99	9	153 939	303	2 661 457
Blood UMR	1.00	12	214 136	300	2 601 260
Eosinophils UMR	1.00	52	810 431	260	2 004 965
SNPs autoimmune diseases	1.00	45	781 824	267	2 033 572
Eosinophils LMR	1.00	0	3	312	2 815 393

Ac: acetylation; bp: base pairs; CD: cluster of differentiation; DHS: DNase I hypersensitive sites; H3K4me: histone H3 lysine 4 methylation; H3K4me3: histone H3 lysine 4 trimethylation; H3K27ac: histone H3 lysine 27 acetylation; LMR: low methylated region; SNP: single nucleotide polymorphism; TSS: transcription start site; TTS: transcription termination site; UMR: unmethylated region; UTR: untranslated transcribed region.

3.4 Differentially methylated regions

The comb-p analysis identified 15 DMRs associated with total IgE levels (SLK-Sidak p-value ≤ 0.05), 5 of which containing at least two CpG sites with p-value $\leq 10^{-3}$ (chr1:167013365-167013599, chr12:10095902-10096289, chr21:44723309-44723458, chr21:45627836-45628166 and chr22:17587595-17587971). A description of this 15 DMRs is reported in Table IV; a locus zoom plot of two major DMRs is reported in Figure 7. Among them, interesting genomic regions were identified, mapping to relevant genes such as the interleukin-17 receptor A (*IL-17RA*) gene, the C-type lectin domain family 2 member A (*CLEC2A*) gene and the *ICOSLG* gene, respectively involved in allergic asthma, inflammatory processes and immune diseases.⁸⁷⁻⁸⁹

Table IV : Description of the 15 DMRs defined by the comb-p method in the EGEA cohort

Chr	Start of the DMR	End of the DMR	Number of CpGs	SLK-Sidak p-value	Physical location	Functional location	Sites tagged by Illumina 450K chip	Gene
1	158147629	158147776	8	2.03e-04	CpG island, north shelf	Blood and eosinophils UMRs, DHS CD14 / CD19 / CD20 cells	1/8	* <i>KIRREL</i>
1	167013457	167013559	9	4.51e-07	-	Blood and eosinophils LMRs, DHS CD3 / CD4 / CD8 / CD14 / CD19 / CD20 / CD 34 / CD56 / Th1 / Th2 cells	0/9	*<i>MAEL</i>
4	640425	640543	16	6.21e-05	Intron	-	1/16	<i>PDE6B</i>
6	17016423	17016537	8	8.23e-05	-	Blood and eosinophils UMRs, DHS CD34 cells	1/8	* <i>LOC101928433</i>
7	2635350	2635409	5	2.56e-05	Intron, south shelf	-	0/5	<i>IQCE</i>
8	144255600	144255676	8	0.016	-	DHS CD4 / Th2 cells	2/8	* <i>LY6H</i>
11	94770777	94770891	8	3.23e-03	CpG island	Blood UMR	0/8	* <i>KDM4E</i>
12	10095995	10096153	12	7.91e-12	TTS1000	Eosinophils LMR, DHS CD19 / CD34 / Th2 cells	4/12	*<i>CLEC2A</i>
13	113242864	113242969	12	3.75e-05	South shore, TTS1000, TTS1500	Blood LMR, Blood and eosinophils UMRs, DHS Th2 cells	1/12	* <i>TUBGCP3</i>
17	19627934	19628032	12	6.27e-05	CpG island	Blood and eosinophils UMRs, DHS CD3 / CD4 / CD8 / CD14 / CD19 / CD34 / CD56 / Th1 / TH2 cells	1/12	* <i>SLC47A2</i>
19	17434531	17434569	5	0.013	Exon, north shelf, TSS1000, TSS1500	Blood and eosinophils UMRs	0/5	<i>ANO8</i>
19	51635847	51635914	7	4.99e-03	Intron	Blood and eosinophils LMRs, DHS CD14 / CD34 / CD56 cells	0/7	<i>SIGLEC9</i>
21	44723309	44723361	6	2.52e-04	South shelf	Eosinophils LMR	0/6	*<i>CRYAA</i>
21	45628003	45628075	6	5.11e-08	-	Blood and eosinophils LMRs, DHS CD14 / CD19 / CD34 / Th1 / Th2 cells	0/6	*<i>ICOSLG</i>
22	17587718	17587798	7	2.56e-04	Intron, north shore	Blood and eosinophils LMRs, H3K4me3 and H3K27ac, DHS CD14 / CD34 / CD56 cells	0/7	<i>IL-17RA</i>

*gene located upstream or downstream of the DMR. Bold rows correspond to DMRs containing at least two CpG sites with p-value $\leq 10^{-3}$.

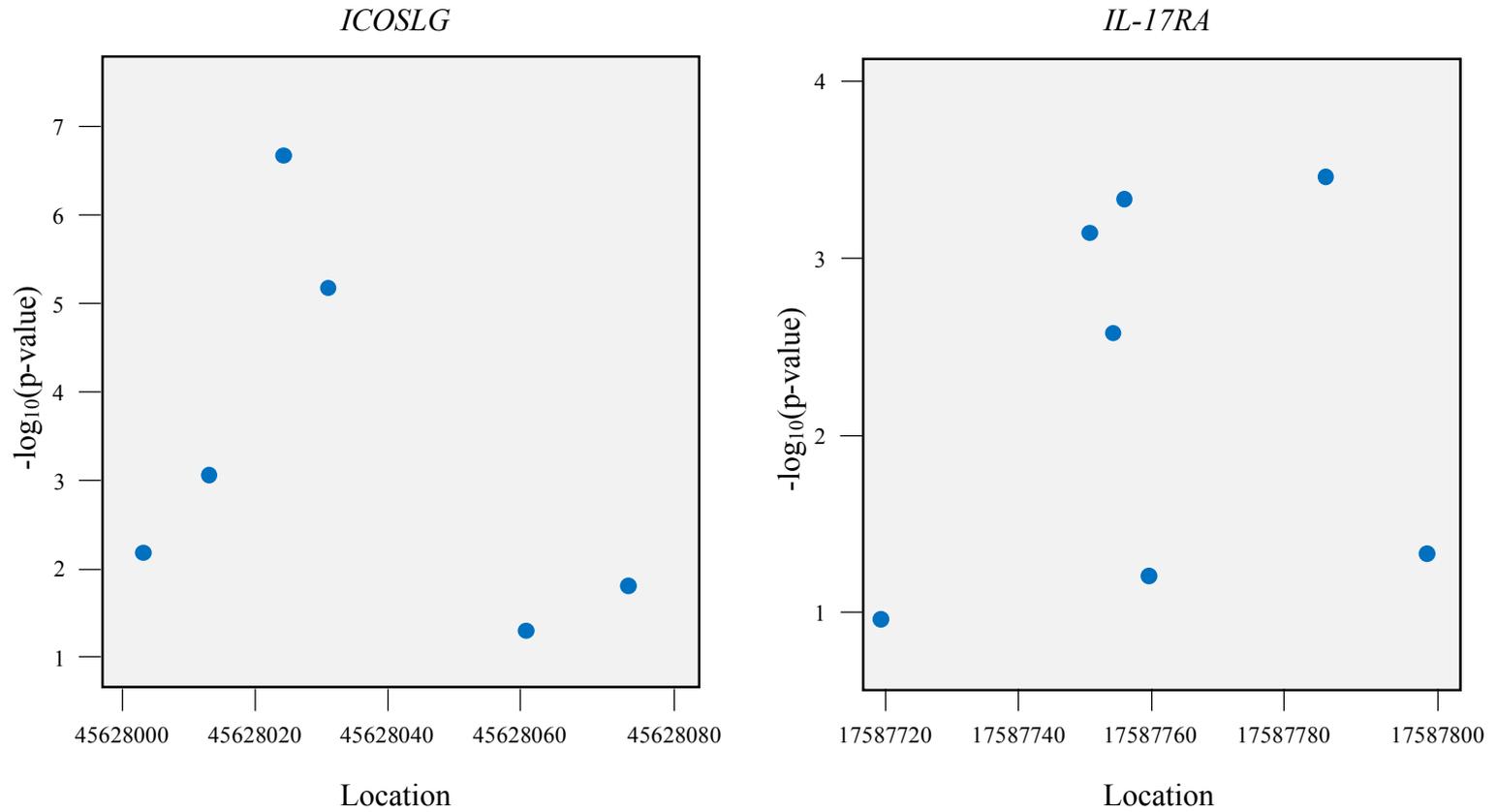


Figure 7 : Locus zoom plot of two major DMRs, mapping to the *IL-17RA* and the *ICOSLG* genes

A locus zoom plot depicts the location of CpG sites versus their significance of association with total IgE levels. Each blue point represents a CpG site within the DMR.

3.5 Replication phase in the MRCE study and meta-analysis

A meta-analysis was performed, combining the p-values of the most relevant CpG sites (CpGs with uncorrected p-value $\leq 10^{-4}$) identified in the EGEA cohort, with the p-values of these same CpG sites in the MRCE panel. On the 317 relevant CpG sites, we identified 101 (31.9%) CpG sites with a global p-value for the meta-analysis between 10^{-3}

and 10^{-4} , 77 (24.3%) with a global p-value between 10^{-4} and 10^{-5} and 27 (8.5%) sites with a global p-value $\leq 10^{-5}$ (Table V).

Preliminary results of the comb-p method applied in the MRCE panel showed replication of the genomic region mapping to the *ICOSLG* gene (SLK-Sidak p-value = 4.31×10^{-6}).

Table V : Description of the 27 CpG sites with a global p-value for the meta-analysis $\leq 10^{-5}$

Chr	Position	p-value for the EGEA cohort	p-value for the MRCE panel	p-value for the meta-analysis	Gene
1	3348023	6.93e-05	1.15e-02	2.66e-06	<i>PRDM16</i>
1	244965954	2.78e-05	5.78e-02	4.28e-06	* <i>DESI2</i>
1	26421442	6.65e-06	2.42e-01	9.43e-06	* <i>TRIM63</i>
3	10238344	1.43e-05	1.50e-01	7.87e-06	<i>IRAK2</i>
4	6198775	1.24e-06	1.82e-01	1.05e-06	<i>JAKMIP1</i>
5	6775179	1.92e-05	6.57e-02	3.11e-06	* <i>PAPD7</i>
5	68608250	3.57e-05	9.26e-02	7.95e-06	<i>CCDC125</i>
6	40722349	6.06e-06	4.96e-02	6.08e-07	* <i>LRFN2</i>
7	150756322	8.41e-06	1.16e-01	8.28e-06	<i>SLC4A2</i>
9	138628097	9.67e-06	2.60e-01	8.94e-06	<i>KCNT1</i>
10	74489461	1.07e-06	3.36e-01	3.40e-06	<i>MCU</i>
10	134703376	2.88e-06	6.62e-01	6.53e-06	<i>TTC40</i>
11	74977204	2.20e-05	7.09e-02	3.83e-06	<i>ARRB1</i>
12	121418643	5.48e-05	3.09e-02	4.74e-06	<i>HNF1A</i>
13	71743678	6.95e-05	2.16e-02	4.92e-06	* <i>KLHL1</i>
14	99726688	7.41e-06	1.57e-01	8.12e-06	<i>BCL11B</i>
15	90501444	2.15e-05	1.07e-01	6.11e-06	* <i>C15orf38</i>
16	81535028	2.96e-05	2.29e-02	2.31e-06	<i>CMIP</i>
16	12103748	3.61e-05	8.46e-02	8.95e-06	<i>SNX29</i>
17	8703364	1.52e-06	6.59e-01	8.33e-06	* <i>MFSD6L</i>
19	12946285	1.87e-05	3.12e-01	9.66e-06	* <i>RTBDN</i>
20	2464700	9.20e-05	1.97e-02	6.71e-06	<i>ZNF343</i>
21	45628025	3.15e-07	8.19e-03	8.51e-09	* <i>ICOSLG</i>
21	45628029	8.59e-06	1.66e-01	2.96e-06	* <i>ICOSLG</i>
22	38574118	1.63e-05	4.78e-02	1.87e-06	<i>PLA2G6</i>
22	30775836	9.21e-05	1.52e-02	4.47e-06	<i>RNF215</i>
22	37603361	6.53e-06	3.66e-01	5.54e-06	<i>SSTR3</i>

*gene located upstream or downstream of the CpG site.

3.6 Candidate approach focused on published EWAS results for total IgE levels

Among the 953 CpG sites on autosomes associated with serum total IgE in published EWAS, 727 (76.3%) were tagged by our sequencing method. Among them, 40 were associated with total IgE levels in our population (uncorrected p-value ≤ 0.05 ; Table VI). After correction for multiple testing, no significant result was obtained (FDR ≤ 0.05).

Table VI : Description of replicated CpG sites from previously published EWAS associated with total IgE levels (uncorrected p-values ≤ 0.05)

Chr	Position	Probe	p-value (from our EWAS)	Gene (from literature results)	Gene (from our EWAS)
1	6341230	cg21220721	0.016	<i>ACOT7</i>	<i>ACOT7</i>
1	15653410	cg03773198	0.033	<i>FHAD1</i>	<i>FHAD1</i>
1	67191531	cg04296289	0.005	<i>SGIP1</i>	<i>SGIP1</i>
1	145004305	cg23991413	0.012	<i>PDE4DIP</i>	<i>PDE4DIP</i>
1	153413932	cg05400869	0.026	<i>SI00A7L2</i>	* <i>SI00A7L2</i>
1	203482523	cg23172671	0.014	<i>OPTC</i>	* <i>OPTC</i>
2	18866125	cg27455540	0.021	<i>NT5C1B-RDH14</i>	* <i>NT5C1B</i>
2	46004187	cg24788291	0.031	-	<i>PRKCE</i>
2	70319121	cg25420477	0.025	-	* <i>PCBP1</i>
2	157295032	cg05786348	0.006	<i>GPD2</i>	<i>GPD2</i>
3	31580476	cg02470179	0.045	-	<i>STT3B</i>
4	189191704	cg18143143	0.018	-	* <i>TRIML1</i>
5	133560225	cg15827086	0.007	<i>PPP2CA</i>	<i>PPP2CA</i>
7	142554307	cg07877229	0.037	-	<i>EPHB6</i>
7	150649655	cg23147443	0.003	<i>KCNH2</i>	<i>KCNH2</i>
8	20147996	cg01749725	0.014	-	<i>LZTS1</i>
8	26243601	cg22816343	0.019	<i>BNIP3L</i>	<i>BNIP3L</i>
8	99105576	cg17203290	0.038	<i>C8orf47</i>	<i>C8orf47</i>
8	141545599	cg17369830	0.013	<i>EIF2C2</i>	<i>AGO2</i>
9	6683274	cg14540650	0.022	<i>KDM4C</i>	* <i>GLDC</i>
9	101705792	cg20503329	0.030	<i>COL15A1</i>	* <i>GALNT12</i>
11	3817793	cg09677763	0.048	<i>NUP98</i>	<i>NUP98</i>
12	112760326	cg18451484	0.010	<i>HECTD4</i>	<i>HECTD4</i>
13	31308509	cg24380653	0.016	<i>ALOX5AP</i>	<i>ALOX5AP</i>
13	43355514	cg24818699	0.022	<i>C13orf30</i>	* <i>TNFSF11</i>
13	113296447	cg15756319	0.026	<i>ATP11AUN</i>	* <i>TUBGCP3</i>
14	56566808	cg20914879	0.026	-	* <i>KTNI</i>
15	99443666	cg15840949	0.023	<i>IGF1R</i>	<i>IGF1R</i>
16	69170548	cg08085199	0.030	-	<i>CIRH1A</i>
17	17939419	cg20885063	0.032	<i>ATPAF2</i>	<i>ATPAF2</i>
17	25656373	cg21979773	0.043	-	* <i>WSB1</i>
17	25798942	cg17585031	0.023	<i>KSRI</i>	* <i>WSB1</i>
17	56282313	cg27469152	0.045	<i>EPX</i>	<i>EPX</i>
17	59445746	cg12358527	0.038	<i>BCAS3</i>	<i>BCAS3</i>
17	73955839	cg26205890	0.039	-	<i>ACOX1</i>
18	5195201	cg19718771	0.043	<i>C18orf42</i>	<i>C18orf42</i>
19	4634006	cg02445229	0.016	-	* <i>SEMA6B</i>
19	11687621	cg10644885	0.027	<i>ACP5</i>	<i>ACP5</i>
19	12997997	cg08679013	0.048	<i>KLF1</i>	<i>KLF1</i>
20	4764253	cg05914537	0.005	<i>RASSF2</i>	<i>RASSF2</i>

*gene located upstream or downstream of the CpG site.

4. Discussion

Our epigenome-wide association study on total IgE levels, conducted in adults with asthma and based on high-resolution DNA methylation data, provides suggestive evidences for association with CpG sites and genomic regions mapping to biologically relevant genes and pathways.

4.1 Identification of new DMRs and CpG sites associated with total IgE levels

At the genomic level, our analysis found 15 DMRs using the comb-p method for which an association with total IgE levels was suggested, including five strong DMRs containing at least two CpG sites with p-value $\leq 10^{-3}$. DMRs analysis allowed combining results on adjacent CpG sites, and provided the opportunity to identify regions with accumulating evidence for association. For all DMRs, there were no or very few CpG sites tagged by the Illumina 450K chip, confirming that detection of these regions would not have been possible with the most used sequencing techniques to date.

Among the five strong DMRs, a genomic region linked to the *IL-17RA* gene (SLK-Sidak p-value = 2.56×10^{-4}) has, to the best of our knowledge, never been identified. This region is located in an intron and our results suggest that hypermethylation of this region would be associated with an elevated total IgE levels. In addition, a SNP (rs2241049) located on a CpG site upstream of this region influences its methylation level but there is no report of a link between this genetic polymorphism and total IgE levels in the literature.⁹⁰ This region is very relevant from biological viewpoint. Indeed, the *IL-17RA* gene encodes an ubiquitous transmembrane protein that binds cytokines of the IL-17 family (IL-17A and

IL-17E), leading to a release of pro-inflammatory mediators such as IL-6, IL-1 β , TNF- α , granulocyte macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor, as well as recruitment and activation of neutrophils.^{91,92} Furthermore, it has been shown that IL-17E (also known as IL-25) stimulates IL-5 and IL-13 expression and increases total IgE levels 24 hours after allergen inhalation in subjects with allergic asthma.⁹³ IL-17A is known to be involved in asthma onset, and in mouse models exogenous administration of IL-17 during a provocation test (exposure to allergens) down-regulates effectors present in allergic asthma by decreasing the recruitment of eosinophils, but has no effect on IgE concentrations.^{87,94} When an antagonist of IL-17RA was administered to mouse models with allergic pulmonary inflammation, a decrease in pulmonary inflammation, serum IgE and bronchial hyperresponsiveness was observed.⁹⁵ In human, IL-17RA expression was found to be significantly higher in eosinophils of individuals with atopic asthma than atopic non-asthmatics on the one hand, and control subjects on the other hand.⁹⁶ Thus, literature data suggest a pathophysiological role of the IL-17 family and their receptors in allergic asthma.⁹⁷

Another new DMR mapped to the *CLEC2A* gene (SLK-Sidak p-value = 7.91×10^{-12}). The expression of the CLEC2 family, known to be widely expressed in leukocytes, is upregulated during inflammatory processes and regulates type 2 and type 17 lung inflammation in mice models, suggesting a potential involvement of the CLEC2 pathway in the pathogenesis of asthma.^{88,98} The *CLEC2A* gene is an important paralog of the *CLEC2C* (also called *CD69*) gene, associated with asthma and airway inflammation, and up-regulated by the IL-9 which is overproduced in children with allergic asthma.^{99,100}

A third genomic region, composed of six CpG sites, to our knowledge never identified in EWAS associated with total IgE levels, mapped to the *ICOSLG* gene (SLK-Sidak p-value = 5.11×10^{-8}). Interestingly, this region contains two CpG sites, separated only from four bp

on chromosome 11 (chr11:45628025 and chr11:45628029), that are part of our most relevant CpG sites, which one of them is the most significant CpG site of the meta-analysis (p-value = 3.13×10^{-7} , global p-value for the meta-analysis = 8.51×10^{-9}). Moreover, recent replication results confirmed the detection of this DMR in the MRCE panel, confirming the importance of this genomic region. ICOSLG, also named costimulatory molecule B7 homolog 2, is a transmembrane protein expressed in airway epithelial cells. The expression of B7 homologs, known to participate in antigen presentation, suggests the possibility for ICOSLG to be involved in antigen presentation by epithelial cells, an immunological response implicated in allergic asthma.¹⁰¹ Another study showed that myeloid dendritic cells from patients with allergic rhinitis expressed lower levels of ICOSLG, contributing to pro-allergic/Th2 activity of dendritic cells.⁸⁵ ICOSLG was also implicated in smoke response by inducing an acute immune response and leads to inflammatory disorders in female cigarette smoking.¹⁰² Finally, a critical role is described for a SNP (rs7282490) in *ICOSLG* region associated with an immune-mediated disease, the Crohn's disease.⁸⁹ Although allergic asthma and inflammatory bowel disease are clinically very different, they share a perturbation of immune responses, a Th1/Th2 imbalance and a dysregulation in the Th17 pathway. Also, SNPs have already been found to be associated with inflammatory bowel disease and respectively atopic dermatitis and asthma.¹⁰³⁻¹⁰⁶

Among the other most relevant results, we identified CpG sites mapping to the janus kinase and microtubule interacting protein 1 (*JAKMIP1*) gene, the *IRAK2* gene, the *BCL11B* gene and the kelch like family member 1 (*KLHL1*) gene. The *JAKMIP1* gene (p-value = 1.24×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 1.05×10^{-6}), previously identified in a GWAS conducted on Crohn's disease patients, is known to be implicated in T-cell mediated cytotoxicity.^{107,108} The *IRAK2* gene (p-value = 1.43×10^{-5} , global p-value for the meta-analysis = 7.87×10^{-6}) is involved in the IL-1 pathway, overexpressed in neutrophilic

asthma *versus* paucigranulocytic asthma.⁸⁶ Furthermore, *IRAK2* is a part of the five top SNPs associated with eczema in children.¹⁰⁹ The *BCL11B* gene (p-value = 7.41×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 8.12×10^{-6}), which has been previously identified as an asthma-associated DMR by Yang *et al.*, but not as a methylation site, was associated with a significant increase in serum IgE in *BCL11B*-deficient chimeric mice, suggesting that *loci* differentially methylated on this gene could increase total IgE levels in asthmatic cases.^{70,110} Finally, the *KLHL1* gene, located upstream of a hypomethylated CpG site (p-value = 6.95×10^{-5} , global p-value for the meta-analysis = 4.92×10^{-6}), was considered as potentially involved in chronic rhinosinusitis in a pooling GWAS conducted on patients with severe chronic rhinosinusitis, known to be often associated with raised IgE levels and asthma.^{111,112} Another study identified a SNP (rs7334050) on *KLHL1* gene interacting with environmental tobacco smoke exposure on time-to-asthma onset in childhood.¹¹³

Although they are not replicated in the MRCE panel with a p-value ≤ 0.05 , three CpGs sites mapped to relevant genes involved in asthma or allergy. The zinc finger E-box binding homeobox 1 (*ZEB1*) gene, located upstream of a hypomethylated CpG site (chr10:31924487, p-value = 8.62×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 9.36×10^{-5}), is a transcription factor known to contribute to epithelial-mesenchymal transition, leading to inflammatory and airway remodeling in asthma.¹¹⁴ Jose *et al.* showed that an epigenetic activation of *ZEB1* played a key role in the epithelial-mesenchymal transition induced by nickel exposure, which can be involved in asthma, rhinitis or allergic contact dermatitis onset.¹¹⁵ The aryl-hydrocarbon receptor repressor (*AHRR*) gene (p-value = 1.84×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 4.65×10^{-5}), playing a key role in a pathway involved in detoxification of components of tobacco smoke, was strongly associated with maternal smoking during pregnancy in an EWAS conducted on cord blood of newborns.¹¹⁶ To avoid any residual for confounding bias on tobacco for the *AHRR* gene, we conducted sensitivity

analyzes, first adjusted for a 3-class smoking variable (active smokers, ex-smokers, non-smokers) and secondly by restricting the study population to non-smokers; results confirmed the association in both analyses (p-values = 2.41×10^{-6} and 0.01, respectively). The solute carrier family 24 member 4 (*SLC24A4*) gene (p-value = 5.92×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 2.18×10^{-4}) was in the top five CpG sites associated with bronchodilator drug response in a GWAS performed in children with asthma.¹¹⁷ Finally, the zinc finger protein 248 (*ZNF248*) gene (p-value = 9.47×10^{-7} , global p-value for the meta-analysis = 4.38×10^{-4}) was associated with late-onset asthma, less likely to be triggered by allergies, in a GWAS conducted on African Americans.¹¹⁸

4.2 Strengthening literature results

Beyond these new findings, we enhance literature results, identifying CpG sites mapping to relevant genes previously identified in epigenetic studies. Among them, a CpG site mapping to the *SSTR3* gene (p-value = 6.53×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 5.54×10^{-6}), which is implicated in a pathway network identified in paucigranulocytic asthma, an inflammatory phenotype of asthma, in an EWAS conducted on adults with asthma *versus* healthy controls.⁸³ The *MFSD6L* gene, located upstream of a hypomethylated CpG site (chr17:8703364, p-value = 1.52×10^{-6} , global p-value for the meta-analysis = 8.33×10^{-6}), was associated with allergic rhinitis with asthma in a *cis* methylation quantitative trait *loci* analysis combining omics data in a population affected with rhinitis and allergies, with or without asthma.⁸⁴ Also, the major facilitator superfamily domain containing 6 (*MFSD6*) gene, an important paralog of the *MFSD6L* gene, was significantly associated with total serum IgE levels in the meta-analysis of epigenome-wide data of Liang *et al.*, conducted on subjects with asthma.⁴¹

4.3 Strengths and weaknesses of the study

A major strength of this study relies on the wide methylome that were obtained using a new sequencing method, covering a larger part of the genome compared to conventional methods.⁷⁵ This sequencing approach offered the opportunity to explore new probes, particularly in regulatory regions, and thus to discover previously uninvestigated regions. Interestingly, this innovative approach identified for the first time epigenetic changes associated with total IgE levels in genomic regions harboring *IL-17RA* and *ICOSLG*, for which there is biological plausibility.

An additional strength of the study relates to the study population, including adults with asthma, for which a strong phenotypic and biological characterization was available.

The main limitation of our study relies on the difficulty to replicate our findings in an independent population. Indeed, few studies used the same method for methylation measurement, since most of the previous studies relies on the Illumina microarray offered in many platforms.^{41,69-72,119} A study comparing results obtained by the Illumina chip and by the MCC-Seq observed that there would be a slight difference in correlation of methylation levels for the two methods.⁷⁵ Furthermore, our population consisted only of adults with asthma while most of the previous studies on asthma and total IgE levels relied on population-based children.^{69,70,72,119} The replication cohort we used is a cohort of children with eczema, therefore making it difficult to reproduce our results in a such different population. Nevertheless, eczema, also called atopic dermatitis, is mainly an IgE-mediated disease (70 to 80% of patients have elevated total IgE levels) and a study indicated that the median IgE levels was 347 international units (IU) per milliliter (mL) and that IgE levels ranged for 100 to 500 IU/mL, 501 to 4000 IU/mL and greater than 4000

IU/mL in respectively 31.5, 21.3 and 22.5% of patients.¹²⁰ Furthermore, it is considered that 20 to 60% of children with eczema will develop allergic respiratory disease including asthma, which could partly explain that only 32.8% of CpG sites identified in the EGEEA cohort were replicated in the MRCE panel with a global p-value for the meta-analysis $\leq 10^{-4}$.¹²¹

Finally, another limitation, which is not specific to this study, is the difficulty of interpreting observed epigenetic modifications. It is known that methylation of a CpG site within a promoter region would be in favor of a lack of expression of the targeted gene. Nevertheless, this is to nuance because DNA methylation functions vary according to cell types and CpG sites location (intron, exon, promoter...). In addition, assigning CpG site to a specific gene is challenging as CpG sites might regulate gene expression of distant genes, unless it is located near the transcription start site of a gene or in the functional UMRs or LMRs. Interestingly, our main genomic regions identified and discussed above (*IL-17RA*, *CLEC2A* and *ICOSLG*) were identified in UMRs or LMRs.

4.4 Conclusion

In conclusion, our study, based on an innovative sequencing approach covering more widely the methylome as compared to most of the previous studies relying on the Illumina 450K chip, identified CpG sites mapping to previously reported relevant genes, and new differentially methylated sites and DMRs associated with total IgE levels in adults with asthma. Among genes located in or surrounding these DMRs, the *IL-17RA* gene and the *ICOSLG* gene are particularly relevant given their biological role. These results support the hypothesis of the existence of epigenetic signatures specific to different asthma phenotypes, in particular allergic asthma, and might reveal novel targets for biotherapies.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

À la frontière des interactions gènes-environnement, l'épigénétique a permis d'établir de nouvelles hypothèses physiopathologiques et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Elle semble ainsi s'inscrire dans la continuité des grandes étapes de la compréhension du monde vivant et pourrait constituer un support d'innovation thérapeutique.

Les premiers épimédicaments

Un grand espoir de thérapie réside en premier lieu du caractère réversible des marques épigénétiques. En effet, les marques épigénétiques peuvent être apposées, modulées et ôtées par de multiples enzymes, offrant un large champ de cibles thérapeutiques potentielles. Plusieurs classes d'enzymes capables de moduler les marques épigénétiques ont été identifiées. Il s'agit tout d'abord des « *writers* », enzymes ayant la propriété d'ajouter des marques épigénétiques sur l'ADN, comme les ADN méthyltransférases ou les histones méthyltransférases. Les « *readers* » sont quant à elles des protéines capables de reconnaître et de se lier aux modifications épigénétiques ; ce sont des régulateurs directs de la chromatine composés entre autres de la famille des protéines *bromodomain and extra-terminal* (BET). Enfin, les « *erasers* » sont des enzymes pouvant ôter les marques épigénétiques, comme les histones déméthylases ou les histones désacétylases.^{122,123} Des composés ciblant ces différentes enzymes sont actuellement en cours de développement, en étude clinique ou pour certains déjà mis sur le marché, avec pour finalité commune de restructurer spécifiquement des profils de méthylation anormaux et ainsi restaurer l'expression des gènes affectés par ces modifications.

Les premiers médicaments épigénétiques, également appelés épimédicaments ou *epidrugs*, ayant vu le jour sont des inhibiteurs des ADN méthyltransférases, agissant sur la voie des « *writers* ». Il s'agit de l'azacitidine (Vidaza[®]) et de la décitabine (Dacogen[®]), des antimétabolites inhibiteurs de la synthèse des bases pyrimidiques, commercialisés en France respectivement en 2008 et 2012 pour le traitement des hémopathies malignes. Leurs effets antinéoplasiques sont exercés par plusieurs mécanismes, dont une cytotoxicité directe envers les myéloblastes, une inhibition de la synthèse de l'ADN, de l'ARN et de protéines, et une inhibition des ADN méthyltransférases. Cette dernière entraîne une hypométhylation de gènes hyperméthylés, concourant notamment à une réactivation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur, une nouvelle sensibilité à l'apoptose et une restauration du contrôle de la prolifération cellulaire.^{123,124} Bien que ces premiers épimédicaments aient montré leur efficacité, peu de rémissions complètes sont obtenues, notamment par leur rapide métabolisation en métabolites inactifs par les cytidines désaminases. Ainsi, des inhibiteurs des ADN méthyltransférases de deuxième génération ont été développés. Il s'agit de la guadécitabine, présentant l'avantage de ne pas être métabolisée par les cytidines désaminases, ce qui lui confère une demi-vie plus longue et une exposition prolongée de son métabolite actif aux cellules tumorales.¹²⁵ La guadécitabine est actuellement étudiée en essais cliniques dans plusieurs indications, notamment en phase III dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques avec un taux de rémission complète supérieur à celui de ses analogues de première génération, et un profil de tolérance similaire.¹²⁵ Elle est également testée en phase II dans la prise en charge de cancers solides comme les carcinomes hépatocellulaires.¹²⁶ La 4'-thio-2'-deoxycytidine, un autre inhibiteur des ADN méthyltransférases administrée quant à elle par voie orale, est actuellement testée en phase I dans des tumeurs solides.¹²⁷ Enfin, des inhibiteurs des histones méthyltransférases sont en cours de développement, avec

notamment le tazémétostat, un inhibiteur de la protéine *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2) indiqué dans les lymphomes et les tumeurs solides, ayant obtenu le statut de « *Fast Track* » par la *Food and Drug Administration* (FDA), permettant d'accélérer la mise sur le marché de nouveaux médicaments prometteurs.¹²⁸

Les épimédicaments touchant la voie des « *readers* » sont représentés principalement par des inhibiteurs des protéines BET ; ils sont actuellement en essais cliniques de phase I/II dans divers cancers, avec une efficacité semblant limitée et ayant entraîné l'arrêt prématuré de certaines études.¹²⁹⁻¹³¹

Enfin, des inhibiteurs agissant sur la voie des « *erasers* » ont également été développés, avec une efficacité limitée dans le traitement de tumeurs solides mais de bons résultats dans la prise en charge de cancers hématologiques.¹³² Le vorinostat (Zolinza®) et la romidepsine (Istodax®), indiqués dans la prise en charge des lymphomes périphériques ou cutanés à cellules T, sont des inhibiteurs des histones désacétylases actuellement soumis à une autorisation temporaire d'utilisation en France. Les histones désacétylases, en enlevant les groupes acétyles des histones, permettent de maintenir la chromatine dans un état fermé et de réprimer la transcription des gènes. L'inhibition de l'activité de ces enzymes se traduit ainsi par le maintien de la chromatine sous une conformation ouverte, permettant l'activation de la transcription de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques ou de gènes suppresseurs de tumeurs et d'arrêt du cycle cellulaire.^{123,133,134} Les inhibiteurs des histones déméthylases ne sont quant à eux pas encore commercialisés.¹³⁵⁻¹³⁷

Le couplage épimédicaments / médicaments : une stratégie thérapeutique d'intérêt

La combinaison d'épimédicaments avec des anticancéreux semble prometteuse. En effet, l'utilisation d'un médicament épigénétique en association à une molécule de chimiothérapie classique peut permettre une synergie d'action et une meilleure efficacité de la thérapie. Le panobinostat, un inhibiteur des histones désacétylases associé au bortézomib et à la dexaméthasone (Farydak[®]), mis sur le marché en 2015 dans le traitement du myélome multiple, en est un premier exemple. Les associations d'épimédicaments à des thérapies ciblées montrent également des résultats encourageants dans les cancers solides, comme l'association du vorinostat et du sorafénib dans le cancer du foie ou le carcinome à cellules rénales.¹³⁸⁻¹³⁹ Enfin, les médicaments épigénétiques utilisés en association plutôt qu'en monothérapie semblent d'autant plus intéressants par leur capacité à restaurer la sensibilité des cellules tumorales aux chimiothérapies classiques ou aux thérapies ciblées. C'est par exemple le cas du vorinostat qui, associé au tamoxifène, est capable de restaurer la sensibilité aux anti-estrogènes chez des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2 positif devenues résistantes à l'hormonothérapie.¹⁴⁰ D'autres exemples peuvent être cités comme l'association de la guadécitabine et de l'irinotecan dans le cancer colorectal métastatique, celle de la décitabine, du carboplatine et du paclitaxel dans le cancer de l'ovaire, ou encore celle du MPT0E028, un inhibiteur des histones désacétylases et de l'erlotinib dans le cancer du poumon non à petites cellules.¹⁴¹⁻¹⁴³ Le rôle des épimédicaments dans la modulation du système immunitaire a également été mis en évidence, par leur capacité notamment à augmenter l'expression de PD-1, PD-L1 et CTLA-4, constituant un marqueur de réponse aux immunothérapies. Ces résultats ont ainsi

conduit à tester des épimédicaments combinés aux immunothérapies, afin d'augmenter et de prolonger les réponses de ces dernières.^{144,145}

Les épimédicaments dans les maladies chroniques

Bien que les applications thérapeutiques ayant recours à l'épigénétique concernent aujourd'hui majoritairement le cancer, les autres maladies chroniques représentent autant d'applications à fort potentiel, puisqu'elles constituent un enjeu majeur de santé publique. Parmi elles, la maladie d'Alzheimer, pour laquelle plusieurs essais cliniques sont en cours avec le recours à des composés agissant sur diverses voies épigénétiques.¹⁴⁶ L'utilisation d'inhibiteurs des histones désacétylases serait particulièrement intéressante par leur capacité à passer la barrière hématoencéphalique chez des modèles de souris parkinsoniennes et ainsi à retarder l'apparition et la progression des symptômes de la maladie et à rétablir la mémoire à long terme.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ Des études cliniques sont également menées dans la prise en charge de maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité, avec l'utilisation de molécules ayant des propriétés épigénétiques connues comme le sodium phénylbutyrate, le curcumin ou le resvératrol, ayant respectivement la capacité d'inhiber les histones désacétylases, les histones acétyltransférases et d'activer les sirtuines, des enzymes de la famille des histones désacétylases.¹⁵⁰

Bien qu'à notre connaissance l'utilisation d'épimédicaments dans l'asthme ne soit pas encore testée chez l'homme, de nombreuses études précliniques sont en cours et semblent révéler une piste prometteuse. En effet, l'administration d'azacitidine chez des modèles de souris sensibilisées à l'ovalbumine a réduit la sensibilité aux allergènes et a entraîné une réduction des symptômes de l'asthme, à savoir une diminution de

l'hyperréactivité bronchique, de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires Th2 ainsi que des taux d'IgG et d'IgE ovalbumine-spécifiques, tout en augmentant la production de cellules T régulatrices permettant de réguler les réponses immunes.^{151,152} De la même façon, l'administration de trichostatine A, un inhibiteur des histones désacétylases, à des souris exposées à des antigènes ainsi que sur des coupes de poumons humains, a mis en évidence une diminution de l'hyperréactivité bronchique et du remodelage pulmonaire.¹⁵³ Fait d'autant plus intéressant que les inhibiteurs des histones désacétylases pourraient avoir des propriétés bronchodilatatrices, comme le suggère une étude réalisée sur des fibres musculaires lisses d'anneaux trachéaux d'hommes et de souris.¹⁵⁴ Le C646, un inhibiteur des histones acétyltransférases, a quant à lui montré une réduction de l'expression de gènes pro-inflammatoires dans des macrophages murins ainsi que sur des coupes pulmonaires de souris.¹⁵⁵ Chez des modèles de souris asthmatiques, l'inhibition de micro-ARNs (micro-ARNs 106a, 126, 145 et 221) a permis de diminuer certaines caractéristiques de l'asthme comme l'inflammation pulmonaire, l'hyperréactivité bronchique, l'hypersécrétion de mucus, le remodelage des voies respiratoires ainsi que la production de cytokines de la voie Th2. Au contraire, des analogues de micro-ARNs (micro-ARNs 146a et b) avaient quant à eux la capacité de diminuer l'inflammation allergique pulmonaire et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.¹⁵⁶ Enfin, la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques épigénétiques dans les maladies respiratoires semble en pleine expansion, comme en témoigne la récente collaboration multidisciplinaire entre MRC Technology et AstraZeneca dans le développement d'épimédicaments dans l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive.¹⁵⁷

Les limites des thérapies épigénétiques

La principale limite du recours aux thérapies épigénétiques repose sur un manque de sélectivité et spécificité des molécules, à l'origine d'effets indésirables parfois importants.

Les épimédicaments ciblant les ADN méthyltransférases présentent une toxicité considérable en entraînant une déméthylation importante du génome. En effet, bien qu'ils semblent présenter des activités intéressantes, la majorité d'entre eux reste actuellement au stade préclinique en raison d'une faible spécificité et d'une toxicité importante observée sur différentes lignées cellulaires.¹⁵⁸ L'azacitidine (Vidaza[®]) et la décitabine (Dacogen[®]) sont des inhibiteurs irréversibles des ADN méthyltransférases ; leur manque de sélectivité et de spécificité pour les différentes isoformes de leurs cibles peut expliquer en partie la survenue d'effets indésirables de grade 3 ou 4 chez plus de 70% des patients.^{159,160} Le recours à des inhibiteurs des ADN méthyltransférases de seconde génération, dont fait partie la guadécitabine, semble mieux toléré.¹²⁵

La tolérance des inhibiteurs des histones désacétylases est elle aussi compromise par un manque de sélectivité et spécificité. En effet, les histones désacétylases font partie de complexes protéiques macromoléculaires ; leur inhibition ne touche pas seulement les histones mais toucherait également des cofacteurs, conduisant à un degré considérable de non-spécificité compte-tenu du nombre important d'enzymes utilisant ces mêmes cofacteurs. Ce phénomène pourrait en partie expliquer la toxicité hématologique importante de ces composés.^{161,162} Par exemple, la toxicité de l'association du panobinostat, du bortézomib et de la dexaméthasone (Farydak[®]) est à souligner, avec la survenue d'événements indésirables de grade 3 ou 4 chez 95,5% des patients, comprenant principalement des troubles gastro-intestinaux et une pancytopénie.¹⁶³

Le ciblage des épimédicaments

L'amélioration de la sélectivité et de la spécificité des épimédicaments est primordiale et doit passer par une meilleure compréhension du paysage épigénétique régulant l'expression génique. Pour cela, une meilleure caractérisation des altérations épigénétiques associées à des maladies est nécessaire, en recherchant sur le génome entier des signatures épigénétiques spécifiques à l'aide de techniques de séquençage à haut débit.¹⁶⁴ De plus, affiner le ciblage des thérapies épigénétiques permettrait l'obtention de composés plus spécifiques, dotés d'une meilleure efficacité et d'une moindre toxicité.¹⁶¹

Pour améliorer le ciblage des épimédicaments, plusieurs techniques sont actuellement en cours de développement, comme l'encapsulation au sein de nanoparticules telles que les liposomes, certains polymères, des dendrimères, des nanogels ou des vecteurs biologiques, permettant une plus grande stabilité de la substance active et son utilisation à de plus faibles concentrations. Le recours à des prodrogues est également étudié, permettant de conduire la substance active modifiée chimiquement jusqu'à sa cible sans être altérée ou dégradée. Enfin, l'amélioration pharmacodynamique des médicaments épigénétiques par leur couplage à d'autres molécules, notamment à des agents ciblant des structures moléculaires spécifiques, constitue une nouvelle piste en cours d'étude.^{164,165} Pour cela, le couplage à des anticorps monoclonaux capables de reconnaître spécifiquement des cibles moléculaires permettrait d'améliorer considérablement la sélectivité et la spécificité des épimédicaments.¹⁶⁶ Cette technique est déjà employée en cancérologie, par l'association de molécules de chimiothérapie ou de radioéléments à des anticorps, permettant une délivrance ciblée des substances actives au niveau des tumeurs. Par exemple, le gemtuzumab ozogamicine (Mylotarg[®]) est un anticorps permettant de cibler le CD33, surexprimé dans certaines leucémies, couplé à une substance cytotoxique qui va être

libérée lors de la liaison de l'anticorps à son récepteur.¹⁶⁷ De la même façon, le couplage de petits ARNs interférents, proches des micro-ARNs, à des anticorps a permis leur délivrance au sein de tissus cibles, laissant penser que ce type de formulation pourrait être envisageable avec des analogues de micro-ARNs.^{168,169} La conjugaison d'un épimédicament à un anticorps a elle aussi été testée récemment *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux, avec l'association d'une prodrogue inhibitrice des histones désacétylases au cétuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) surexprimé à la surface de certaines cellules tumorales. Les résultats sont encourageants puisque l'association a permis l'inhibition des histones désacétylases des cellules exprimant l'EGFR et a montré une nette efficacité anti-tumorale ainsi qu'une moindre toxicité, suggérant la possibilité d'étendre cette stratégie dans de nombreuses applications thérapeutiques, au-delà du cancer.¹⁷⁰

Quelles perspectives offrent les résultats de l'étude dans le développement d'épimédicaments dans l'asthme ?

Notre étude a permis la mise en évidence de sites CpG, répliqués dans une cohorte indépendante, et de régions génomiques différentiellement méthylés assignés à des gènes particulièrement pertinents dans la physiopathologie de l'asthme et de l'allergie qui, à notre connaissance, n'avaient jamais été identifiés. Parmi eux, les gènes de l'*IL-17RA*, *CLEC2A*, *ICOSLG*, *IRAK2*, *BCL11B* ou encore *KLHL1*. Au-delà de ces nouveaux résultats, notre travail a permis de renforcer les données de la littérature dans les phénotypes d'asthme et d'allergie, avec notamment l'identification de sites CpG assignés aux gènes *SSTR3* et *MFSD6L*. Ces résultats corroborent ainsi l'hypothèse de l'existence de marques épigénétiques spécifiques à différents phénotypes d'asthme, notamment l'asthme allergique

et pourraient constituer un support pour le développement de thérapies épigénétiques ciblées dans l'asthme.

Parmi nos résultats les plus pertinents, nous avons mis en évidence la région de l'*IL-17RA*, connue pour être impliquée dans l'asthme allergique, et dont nos résultats suggèrent qu'une hyperméthylation de ce gène serait associée à une augmentation des taux d'IgE totales. De façon intéressante, le brodalumab (Kyntheum[®]), un anticorps monoclonal ciblant l'IL-17RA utilisé dans le traitement du psoriasis, a été évalué en essai contrôlé en double aveugle chez des adultes atteints d'asthme modéré à sévère. Bien que cette étude n'ait pas montré de résultats cliniquement significatifs, un sous-groupe de sujets asthmatiques, ayant une importante amélioration du volume expiratoire maximal par seconde post-bronchodilatation, a présenté des réponses cliniquement significatives au brodalumab.¹⁷¹ Ce sous-groupe était celui comportant le plus de sujets atopiques et ayant un taux moyen d'IgE totales le plus élevé.

Le gène *ICOSLG*, dont nos résultats montrent qu'une hyperméthylation serait associée à une élévation des taux d'IgE totales, est lui aussi pertinent dans l'asthme. Il a été identifié dans notre étude comme étant à la fois le site CpG différenciellement méthylé le plus significatif de la méta-analyse et comme une région génomique différenciellement méthylée répliquée. La protéine ICOSLG peut elle aussi être ciblée par un anticorps ; en effet et bien qu'il ne soit pas testé dans l'asthme, le prézalumab, un anticorps monoclonal anti-ICOSLG, est actuellement en essais cliniques dans le lupus érythémateux systémique et l'arthrite lupique, dans lesquels il a démontré son efficacité et son innocuité.¹⁷²

Les gènes de l'*IL-17RA* et de l'*ICOSLG* codant respectivement pour des protéines membranaires, le couplage d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces cibles avec des épimédicaments semble prometteur. Le brodalumab et le prézalumab, en inhibant respectivement la liaison entre l'IL-17RA et son ligand et celle de l'ICOSLG à son

récepteur, entraîneraient le blocage de cascades pro-inflammatoires et de réponses immunologiques intervenant dans la physiopathologie de l'asthme allergique.^{91,92,95,101,102} Leur couplage à des inhibiteurs des ADN méthyltransférases permettrait à ces derniers d'exercer leurs effets de façon particulièrement ciblée, en ôtant les marques épigénétiques de ces gènes hyperméthylés pertinents d'un point de vue physiopathologique, conduisant ainsi à une répression de leur expression au niveau de cellules d'intérêt. Cette association anticorps / épimédicament permettrait d'une part une synergie d'action entre l'anticorps et la thérapie épigénétique, et d'autre part une toxicité diminuée par une plus grande spécificité d'action.¹⁵⁸ Ces hypothèses supposent des recherches précliniques poussées pour la mise au point de ce type de thérapies, avec des défis galéniques, pharmacocinétiques et pharmacodynamiques majeurs, ainsi que des recherches complémentaires pour l'application chez l'homme. Si ces hypothèses étaient confirmées, l'épigénétique pourrait constituer une innovation thérapeutique pour des phénotypes spécifiques d'asthme, comme l'asthme allergique.

Conclusion

Bien que l'avenir des thérapies épigénétiques doit être apprécié avec prudence, ces thérapies ont déjà commencé à être utilisées chez l'homme et suscitent de nombreux espoirs. Malgré un succès limité en monothérapie, les épimédicaments semblent particulièrement intéressants en association à d'autres substances actives et laissent entrevoir un potentiel thérapeutique important. En revanche, nous ne disposons pas à l'heure actuelle de suffisamment de recul pour connaître les effets à long terme de ces traitements. Du fait de la possible héritabilité des marques épigénétiques, il n'est pas exclu que les thérapies épigénétiques puissent avoir des effets sur les générations successives,

dont nous ne connaissons pas l'impact. Bien qu'il soit nécessaire de rester prudent vis-à-vis de la place des épimédicaments dans l'innovation thérapeutique, il semble primordial d'encourager massivement la recherche dans le domaine prometteur de l'épigénétique par une approche multidisciplinaire afin de prendre en compte les différentes spécificités de ces nouveaux médicaments.

THÈSE SOUTENUE PAR : Laura BEAUMIER

TITRE :

L'ÉPIGÉNÉTIQUE COMME SUPPORT D'INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : EXEMPLE D'UNE ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE MÉTHYLATION DE L'ADN ET TAUX D'IMMUNOGLOBULINES E TOTALES CHEZ DES ADULTES ASTHMATIQUES

CONCLUSION :

Ces dernières décennies ont été marquées par l'essor des technologies de pointe et des outils informatiques, ayant contribué à la naissance des données massives (« *big data* »), révolutionnant la recherche en santé. L'émergence de techniques de génotypage et de séquençage à haut débit a permis l'analyse simultanée d'un grand nombre de variables portant sur la génomique, l'épigénomique, la transcriptomique, la protéomique ou encore la métabolomique, qualifiées d'approches « omiques ». L'épigénétique, en contrôlant l'accessibilité du génome et en conduisant à des modifications de l'expression des gènes, sans modification de la séquence d'ADN, est actuellement un domaine de recherche en pleine expansion. À l'heure où se développent les premiers épimédicaments, il est important de se demander en quoi l'épigénétique pourrait constituer un support d'innovation thérapeutique.

Un travail de recherche sur l'asthme, maladie chronique représentant un enjeu de santé publique, a été mené. L'asthme est une maladie multifactorielle caractérisée par une forte hétérogénéité phénotypique, dont la composante majeure est l'allergie médiée par les immunoglobulines E (IgE). Ce travail reposait sur l'hypothèse que les principaux phénotypes d'asthme, à savoir l'asthme allergique et l'asthme non allergique, sont associés à des signatures épigénétiques spécifiques et que leur identification pourrait permettre de mieux comprendre l'hétérogénéité de cette maladie. Nous avons ainsi cherché à identifier des sites et des régions

génomiques dont la méthylation était associée aux taux d'IgE totales chez des adultes asthmatiques, en utilisant une approche pangénomique. La méthylation a été mesurée par une approche innovante de séquençage (sur près de quatre millions de sites CpG) chez 357 adultes asthmatiques issus de la cohorte de l'Étude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme, l'hyperréactivité bronchique et l'atopie (EGEA). Une étude de réplication a été menée dans la cohorte *Medical Research Council for Eczema* (MRCE) et une méta-analyse a été conduite.

Cette étude d'association a permis l'identification de quinze régions génomiques et de 317 sites CpG dont la méthylation était associée aux taux d'IgE totales (p -valeur $\leq 10^{-4}$), dont certains situés à proximité de gènes particulièrement pertinents dans la physiopathologie de l'asthme et de l'allergie. Parmi eux se trouvaient des gènes qui, à notre connaissance, n'avaient jamais été identifiés précédemment dans ce type d'approche, comme les gènes de l'*interleukin-17 receptor A (IL-17RA)* et de l'*inducible T cell costimulator ligand (ICOSLG)*.

Les résultats de cette étude sont prometteurs pour le développement d'épimédicaments dans l'asthme. Aujourd'hui, les premiers médicaments épigénétiques développés manquent de sélectivité et de spécificité, à l'origine d'effets indésirables importants, et leur efficacité semble limitée lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie. Le couplage d'épimédicaments à des anticorps monoclonaux leur permet d'exercer leurs effets de façon ciblée et ainsi d'améliorer la sélectivité, l'efficacité et la tolérance de ces nouvelles thérapies. L'IL-17RA et l'ICOSLG pourraient constituer de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques dans l'asthme allergique puisqu'ils peuvent être ciblés par des anticorps monoclonaux, respectivement le brodalumab et le prézalumab. Bien que des études plus poussées soient nécessaires et que les effets à long terme des traitements épigénétiques ne soient à l'heure actuelle pas connus, l'épigénétique suscite de nombreux espoirs dans la prise en charge thérapeutique des patients. Une approche

multidisciplinaire doit être menée afin de prendre en compte les différentes spécificités de ces nouveaux médicaments.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le :

LE DOYEN



Pr. Michel SÈVE

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. Pierrick BEDOUCH

BIBLIOGRAPHIE

1. Trouillet P. Histoire de la Pharmacie [En ligne]. [consulté le 20 octobre 2018]. Disponible sur : <http://unf3s.cerimes.fr>
2. Hominidés.com. Les évolutions de l'homme [En ligne]. [consulté le 20 octobre 2018]. Disponible sur : <https://www.hominides.com>
3. Chast F. Histoire contemporaine des médicaments. Paris: La Découverte; 2002.
4. Landry Y. Petite histoire des médicaments. De l'Antiquité à nos jours. Malakoff: Dunod; 2011.
5. Dupont J-C. L'invention du médicament. Une histoire des théories du remède. Paris: Hermann; 2013.
6. University of Pennsylvania Museum of Archaeology and Anthropology © Penn Museum 2018 [En ligne]. [consulté le 19 janvier 2019]. Disponible sur : <https://www.penn.museum>
7. U.S. National Library of Medicine [En ligne]. [consulté le 19 janvier 2019]. Disponible sur : <http://resource.nlm.nih.gov>
8. Meyer G. À la recherche de la molécule idéale. Une brève histoire des anticoagulants. Rev Mal Respir. 2011;28(8):951-3.
9. Bonah C, Rasmussen A. Histoire et médicament aux XIXe et XXe siècles. Paris: Glyphe; 2005.
10. Goodman L, Wintrobe M, Dameshek W, Goodman M, Gilman A, McLennan M. Nitrogen mustard therapy; use of methyl-bis (beta- chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin's

- disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. JAMA. 1946;(132):126-32.
11. Legifrance.gouv.fr. LOI n° 2007-248 du 26 février 2007 portant diverses dispositions d'adaptation au droit communautaire dans le domaine du médicament [En ligne]. [consulté le 21 octobre 2018]. Disponible sur : <https://www.legifrance.gouv.fr>
 12. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. Science. 2000;287(5460):1960-4.
 13. Dumas J, Robert B. Bioproduction de protéines thérapeutiques: revue et perspectives. Med Sci . 2009;25:18-26.
 14. Hoch D, Tambourin P. Les biotechnologies, clés de l'innovation thérapeutique dans le domaine de la santé. Med Sci. 2009;25:13-7.
 15. Glennie MJ, Johnson PW. Clinical trials of antibody therapy. Immunol Today. 2000;21(8):403-10.
 16. Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015. États des lieux et enjeux, appui à la décision. Boulogne-Billancourt: Institut National du Cancer ;2016.
 17. Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. Target Ther. 2008;77(3):9.
 18. Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. Cancer Res. 2008;68(22):9280-90.
 19. Institut National du Cancer. Immunothérapie : mode d'action [En ligne]. [consulté le 8 décembre 2018]. Disponible sur : <https://www.e-cancer.fr>

20. Kuehn BM. The promise and challenges of CAR-T gene therapy. *JAMA*. 2017;318(22):2167-9.
21. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
22. Kontermann RE, Brinkmann U. Bispecific antibodies. *Drug Discov Today*. 2015;20(7):838-47.
23. Issa NT, Byers SW, Dakshanamurthy S. Big data: the next frontier for innovation in therapeutics and healthcare. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014;7(3):293-8.
24. Hasin Y, Seldin M, Lusic A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017;18:83.
25. Karp G, Isawa J, Marshall W. *Biologie cellulaire et moléculaire de Karp*. 4ème éd. Ballan-Miré: De Boeck; 2018.
26. European Medicines Agency. Advanced therapy medicinal products: overview [En ligne]. [consulté le 22 décembre 2018]. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu>
27. Hacein-Bey-Abina S, Kalle CV, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID- X1. *Sci New Ser*. 2003;302(5644):415-9.
28. Ylä-Herttua S. Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European Union. *Mol Ther*. 2012;20(10):1831-2.
29. European Medicines Agency. Zalmoxis - Summary of product characteristics [En ligne]. [consulté le 23 décembre 2018]. Disponible sur : <https://www.ema.europa.eu>
30. Perica K, Varela JC, Oelke M, Schneck J. Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides Med J*. 2015;6(1):e0004.

31. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1069-78.
32. Dupont C, Armant D, Brenner C. Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009;27(05):351-7.
33. Mukherjee K, Twyman RM, Vilcinskas A. Insects as models to study the epigenetic basis of disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2015;118(1-2):69-78.
34. Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ. Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *J Dev Orig Health Dis.* 2015;6(2):55-64.
35. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(4):214-22.
36. Talens RP, Christensen K, Putter H, Willemsen G, Christiansen L, Kremer D, et al. Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell.* 2012;11(4):694-703.
37. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet.* 2006;368(9537):804-13.
38. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3(6):415-28.
39. Bégin P, Nadeau KC. Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2014;10(1):27.
40. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(1):15-24.

41. 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*. 2015;520(7549):670-4.
42. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention [En ligne]. [consulté le 13 octobre 2018]. Disponible sur : <https://ginasthma.org>
43. The World Health Organization. Chronic respiratory diseases, Asthma [En ligne]. [consulté le 13 octobre 2018]. Disponible sur : <http://www.who.int>
44. Delmas M-C, Fuhrman C. L'asthme en France : synthèse des données épidémiologiques descriptives. *Rev Mal Respir*. 2010;27(2):151-9.
45. Gibson GJ, Loddenkemper R, Sibille, Y, Lundback, Bo. The European Lung White Book : respiratory health and disease in Europe. 2nd ed. Sheffield: European Respiratory Society; 2013.
46. Siroux V, Gonzalez JR, Bouzigon E, Curjuric I, Boudier A, Imboden M, et al. Genetic heterogeneity of asthma phenotypes identified by a clustering approach. *Eur Respir J*. 2014;43(2):439-52.
47. Wenzel SE. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med*. 2012;18(5):716-25.
48. Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med*. 2013;15(83):243-9.
49. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(3):636-45.

50. Backman H, Jansson S, Stridsman C, Eriksson B, Hedman L, Eklund B, et al. Severe asthma among adults: prevalence and clinical characteristics. *Eur Respir J*. 2018;52:PA3918.
51. Morales E, Bustamante M, Vilahur N, Escaramis G, Montfort M, de Cid R, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(9):937-43.
52. Yang IV, Schwartz DA. Epigenetic mechanisms and the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1243-55.
53. Martinez FD, Vercelli D. Asthma. *The Lancet*. 2013;382(9901):1360-72.
54. Just J, Bourgoin-Heck M, Amat F. Clinical phenotypes in asthma during childhood. *Clin Exp Allergy*. 2017;47(7):848-55.
55. European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Global Atlas of Allergy [En ligne]. [consulté le 13 octobre 2018]. Disponible sur : <http://www.eaaci.org>
56. Kauffmann F, Demenais F. Gene-environment interactions in asthma and allergic diseases: challenges and perspectives. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1229-40.
57. Duffy DL, Martin NG, Battistutta D, Hopper JL, Mathews JD. Genetics of asthma and hay fever in australian twins. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:1351-8.
58. Laitinen T, Räsänen M, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA. Importance of genetic factors in adolescent asthma: a population-based twin-family study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(4):1073-8.
59. Elmoose C, Thomsen SF. Twin studies of atopic dermatitis: interpretations and applications in the filaggrin era. *J Allergy*. 2015;2015:902359.

60. 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.* 2010;363(13):1211-21.
61. Ober C, Yao T-C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective: Genetics of asthma and allergy. *Immunol Rev.* 2011;242(1):10-30.
62. Zhu Z, Lee PH, Chaffin MD, Chung W, Loh P-R, Lu Q, et al. A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases. *Nat Genet.* 2018;50(6):857-64.
63. Portelli MA, Hodge E, Sayers I. Genetic risk factors for the development of allergic disease identified by genome-wide association. *Clin Exp Allergy.* 2015;45(1):21-31.
64. Salam MT, Byun H-M, Lurmann F, Breton CV, Wang X, Eckel SP, et al. Genetic and epigenetic variations in inducible nitric oxide synthase promoter, particulate pollution, and exhaled nitric oxide levels in children. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(1):232-9.
65. Markunas CA, Xu Z, Harlid S, Wade PA, Lie RT, Taylor JA, et al. Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2014;122(10):1147-53.
66. Michel S, Busato F, Genuneit J, Pekkanen J, Dalphin J-C, Riedler J, et al. Farm exposure and time trends in early childhood may influence DNA methylation in genes related to asthma and allergy. *Allergy.* 2013;68(3):355-64.
67. Wang I-J, Karmaus WJ, Chen S-L, Holloway JW, Ewart S. Effects of phthalate exposure on asthma may be mediated through alterations in DNA methylation. *Clin Epigenetics.* 2015;7:27.

68. Ambatipudi S, Cuenin C, Hernandez-Vargas H, Ghantous A, Le Calvez-Kelm F, Kaaks R, et al. Tobacco smoking-associated genome-wide DNA methylation changes in the EPIC study. *Epigenomics*. 2016;8(5):599-618.
69. 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*. 2015;7:89.
70. 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*. 2015;136(1):69-80.
71. 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*. 2017;9(4):407-18.
72. Chen W, Wang T, Pino-Yanes M, Forno E, Liang L, Yan Q, et al. An epigenome-wide association study of total serum IgE in Hispanic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(2):571-7.
73. North ML, Ellis AK. The role of epigenetics in the developmental origins of allergic disease. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(5):355-61.
74. Kauffmann F. Epidemiological study of genetic and environmental factors in asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Protocol and potential selection bias. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2001;49(4):343-56.
75. 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*. 2015;6:7211.

76. Rhead B, Karolchik D, Kuhn RM, Hinrichs AS, Zweig AS, Fujita PA, et al. The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database):D613-9.
77. Spector TD, Williams FMK. The UK adult twin registry (TwinsUK). *Twin Res Hum Genet.* 2006;9(6):899-906.
78. The ENCODE Project Consortium. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science.* 2004;306(5696):636-40.
79. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, et al. The NIH roadmap epigenomics mapping consortium. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1045-8.
80. Backer V, Ulrik CS, Wendelboe D, Bach-Mortensen N, Hansen KK, Laursen EM, et al. Distribution of serum IgE in children and adolescents aged 7 to 16 years in Copenhagen, in relation to factors of importance. *Allergy.* 1992;47(5):484-9.
81. Yoav Benjamini, Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995;57:289-300.
82. Pedersen BS, Schwartz DA, Yang IV, Kechris KJ. Comb-p: software for combining, analyzing, grouping and correcting spatially correlated p-values. *Bioinformatics.* 2012;28(22):2986-8.
83. Gunawardhana LP, Gibson PG, Simpson JL, Benton MC, Lea RA, Baines KJ. Characteristic DNA methylation profiles in peripheral blood monocytes are associated with inflammatory phenotypes of asthma. *Epigenetics.* 2014;9(9):1302-16.

84. Morin A, Laviolette M, Pastinen T, Boulet L-P, Laprise C. Combining omics data to identify genes associated with allergic rhinitis. *Clin Epigenetics*. 2017;9:3.
85. Shen C, Hupin C, Froidure A, Detry B, Pilette C. Impaired ICOSL in human myeloid dendritic cells promotes Th2 responses in patients with allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2014;44(6):831-41.
86. Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(1):153-160.e9.
87. Wang Y-H, Liu Y-J. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(6):697-702.
88. Mourão-Sá D, Robinson MJ, Zelenay S, Sancho D, Chakravarty P, Larsen R, et al. CLEC-2 signaling via Syk in myeloid cells can regulate inflammatory responses. *Eur J Immunol*. 2011;41(10):3040-53.
89. Hedl M, Lahiri A, Ning K, Cho JH, Abraham C. Pattern recognition receptor signaling in human dendritic cells is enhanced by ICOS ligand and modulated by the Crohn's disease ICOSLG risk allele. *Immunity*. 2014;40(5):734-46.
90. 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*. 2015;6:6326.
91. Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, 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*. 2001;125(2):177-83.

92. 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.
93. 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.* 2011;128(1):116-24.
94. 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.* 2006;203(12):2715-25.
95. 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.* 2015;53(6):810-21.
96. 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.
97. 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.* 2007;120(6):1324-31.
98. Burkett P, Wallrapp A, Kuchroo VK. CLEC-2 regulates type 2 and type 17 lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:A7555
99. Kimura MY, Hayashizaki K, Tokoyoda K, Takamura S, Motohashi S, Nakayama T. Crucial role for CD69 in allergic inflammatory responses: CD69-My19 system in the pathogenesis of airway inflammation. *Immunol Rev.* 2017;278(1):87-100.

100. Jia L, Wang Y, Li J, Li S, Zhang Y, Shen J, et al. Detection of IL-9 producing T cells in the PBMCs of allergic asthmatic patients. *BMC Immunol.* 2017;18(1):38
101. Kurosawa S, Myers AC, Chen L, Wang S, Ni J, Plitt JR, et al. Expression of the costimulatory molecule B7-H2 (inducible costimulator ligand) by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(5):563-73.
102. Pan F, Yang T-L, Chen X-D, Chen Y, Gao G, Liu Y-Z, et al. Impact of female cigarette smoking on circulating B cells in vivo: the suppressed ICOSLG, TCF3, and VCAM1 gene functional network may inhibit normal cell function. *Immunogenetics.* 2010;62(4):237-51.
103. Yang F, Wang D, Li Y, Sang L, Zhu J, Wang J, et al. Th1/Th2 balance and Th17/Treg-mediated immunity in relation to murine resistance to dextran sulfate-induced colitis. *J Immunol Res.* 2017;2017:7047201.
104. Raza A, Yousaf W, Giannella R, Shata MT. Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012;8(2):161-8.
105. Ueno A, Jeffery L, Kobayashi T, Hibi T, Ghosh S, Jijon H. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J Autoimmun.* 2018;87:38-49.
106. Yadav P, Ellinghaus D, Rémy G, Freitag-Wolf S, Cesaro A, Degenhardt F, et al. Genetic factors interact with tobacco smoke to modify risk for inflammatory bowel disease in humans and mice. *Gastroenterology.* 2017;153(2):550-65.
107. Raelson JV, Little RD, Ruether A, Fournier H, Paquin B, Van Eerdewegh P, et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(37):14747-52.

108. Libri V, Schulte D, van Stijn A, Ragimbeau J, Rogge L, Pellegrini S. Jakmip1 is expressed upon T cell differentiation and has an inhibitory function in cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 2008;181(9):5847-56.
109. Sharma S, Poon A, Himes BE, Lasky-Su J, Sordillo JE, Belanger K, et al. Association of variants in innate immune genes with asthma and eczema: innate immune genes and atopic disease. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23(4):315-23.
110. Fang D, Cui K, Hu G, Gurram RK, Zhong C, Oler AJ, et al. Bcl11b, a novel GATA3-interacting protein, suppresses Th1 while limiting Th2 cell differentiation. *J Exp Med.* 2018;215(5):1449-62.
111. Desrosiers M, Mfunu Endam L, Filali-Mouhim R, Castano R, Bossé Y. Genetic studies in CRS: identification of a distinct severe subphenotype of CRS based on medication requirements for disease control. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(2 Suppl):145-A553.
112. Bachert C, Zhang N. Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE 'above atopy'. *J Intern Med.* 2012;272(2):133-43.
113. Sugier P, Sarnowski C, Granell R, Laprise C, Jarvis D, Ege M, et al. Genome-wide interaction study of environmental tobacco smoke exposure on time-to-asthma onset in childhood. *European Respiratory Journal.* 2018;52:PA1278.
114. Ijaz T, Pazdrak K, Kalita M, Konig R, Choudhary S, Tian B, et al. Systems biology approaches to understanding epithelial mesenchymal transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma. *World Allergy Organ J.* 2014;7(1):1-14.
115. Jose CC, Jagannathan L, Tanwar VS, Zhang X, Zang C, Cuddapah S. Nickel exposure induces persistent mesenchymal phenotype in human lung epithelial cells through epigenetic activation of ZEB1. *Mol Carcinog.* 2018;57(6):794-806.

116. Joubert BR, Håberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2012;120(10):1425-31.
117. Drake KA, Torgerson DG, Gignoux CR, Galanter JM, Roth LA, Huntsman S, et al. A genome-wide association study of bronchodilator response in Latinos implicates rare variants. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(2):370-8.
118. Wang L, Salinas YD, DeWan AT. Gene-based analysis identified the gene ZNF248 is associated with late-onset asthma in African Americans. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016;117(1):50-55.e2.
119. Peng C, Cardenas A, Rifas-Shiman SL, Hivert M-F, Gold DR, Platts-Mills TA, et al. Epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E in children: a life course approach. *Clin Epigenetics.* 2018;10:55.
120. Weber MB, Petry V, Weis L, Mazzotti NG, Cestari TF. Evaluating the relation between pruritus, serum IgE levels and severity of clinical manifestations in atopic dermatitis patients. *An Bras Dermatol.* 2005;80(3):245-8.
121. Bardana EJ. Immunoglobulin E- (IgE) and non-IgE-mediated reactions in the pathogenesis of atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS). *Allergy.* 2004;59(s78):25-9.
122. Nicholson TB, Veland N, Chen T. Writers, readers, and erasers of epigenetic marks. *Epigenetic Cancer Therapy.* 2015;31-66.
123. Kelly AD, Issa J-PJ. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. *Curr Opin Genet Dev.* 2017;42:68-77.

124. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008;123(1):8-13.
125. Kantarjian HM, Roboz GJ, Kropf PL, Yee KWL, O'Connell CL, Tibes R, et al. Guadecitabine (SGI-110) in treatment-naive patients with acute myeloid leukaemia: phase 2 results from a multicentre, randomised, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1317-26.
126. ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT01752933. A phase 2 study of SGI-110 in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC) subjects who failed prior treatment with sorafenib [En ligne]. [consulté le 13 janvier 2019]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov>
127. ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT02423057. Phase trial of 4'-thio-2'-deoxycytidine (TdCyd) in patients with advanced solid tumors [En ligne]. [consulté le 13 janvier 2019]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov>
128. Italiano A, Soria J-C, Toulmonde M, Michot J-M, Lucchesi C, Varga A, et al. Tazemetostat, an EZH2 inhibitor, in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma and advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):649-59.
129. Falchook G, Talpaz M, Mita M, Szmulewitz R, Piha-Paul S, Harb W, et al. Phase 1/2 study of INCB054329, a bromodomain and extraterminal (BET) protein inhibitor, in patients (pts) with advanced malignancies. *Mol Cancer Ther*. 2018;17(Suppl): A093.
130. ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT02698176. A phase IB dose exploration trial with MK-8628, a small molecule inhibitor of the bromodomain and extra-terminal

- (BET) proteins, in subjects with selected advanced solid tumors [En ligne]. [consulté le 13 janvier 2019]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov>
131. ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT02296476. A phase IIa trial with dose optimization of OTX015, a small molecule inhibitor of the bromodomain and extra-terminal (BET) proteins, in recurrent glioblastoma multiforme (GBM) patients [En ligne]. [consulté le 13 janvier 2019]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov>
 132. Qiu T, Zhou L, Zhu W, Wang T, Wang J, Shu Y, et al. Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. *Future Oncol.* 2013;9(2):255-69.
 133. Laubach JP, Moreau P, San-Miguel JF, Richardson PG. Panobinostat for the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(21):4767-73.
 134. Zwergel C, Valente S, Mai A. Histone Deacetylase Inhibitors: Updated studies in various epigenetic-related diseases. *J Clin Epigenetics.* 2016;2(1):15.
 135. Vianello P, Botrugno OA, Cappa A, Dal Zuffo R, Dessanti P, Mai A, et al. Discovery of a novel inhibitor of histone lysine-specific demethylase 1A (KDM1A/LSD1) as orally active antitumor agent. *J Med Chem.* 2016;59(4):1501-17.
 136. Trifirò P, Cappa A, Brambillasca S, Botrugno OA, Cera MR, Zuffo RD, et al. Novel potent inhibitors of the histone demethylase KDM1A (LSD1), orally active in a murine promyelocytic leukemia model. *Future Med Chem.* 2017;9(11):1161-74.
 137. Maes T, Mascaró C, Tirapu I, Estiarte A, Ciceri F, Lunardi S, et al. ORY-1001, a potent and selective covalent KDM1A inhibitor, for the treatment of acute leukemia. *Cancer Cell.* 2018;33(3):495-511.e12.

138. ClinicalTrials.gov. Identifier: NCT01075113. Sorafenib and vorinostat in treating patients with advanced liver cancer [En ligne]. [consulté le 13 janvier 2019]. Disponible sur : <https://clinicaltrials.gov>
139. Kim MJ, Kim DE, Jeong IG, Choi J, Jang S, Lee J-H, et al. HDAC inhibitors synergize antiproliferative effect of sorafenib in renal cell carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3161-8.
140. Munster PN, Thum KT, Thomas S, Raha P, Lacevic M, Miller A, et al. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. *Br J Cancer.* 2011 Jun 7;104(12):1828-35.
141. Sharma A, Vatapalli R, Abdelfatah E, Wyatt McMahon K, Kerner Z, A. Guzzetta A, et al. Hypomethylating agents synergize with irinotecan to improve response to chemotherapy in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176139.
142. Zhang Y, Mei Q, Liu Y, Li X, Brock MV, Chen M, et al. The safety, efficacy, and treatment outcomes of a combination of low-dose decitabine treatment in patients with recurrent ovarian cancer. *OncoImmunology.* 2017;6(9):e1323619.
143. Chen M-C, Chen C-H, Wang J-C, Tsai A-C, Liou J-P, Pan S-L, et al. The HDAC inhibitor, MPT0E028, enhances erlotinib-induced cell death in EGFR-TKI-resistant NSCLC cells. *Cell Death Dis.* 2013;4(9):e810.
144. Mazzone R, Zwergel C, Mai A, Valente S. Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy. *Clin Epigenetics.* *Clin Epigenetics.* 2017;9:59.
145. Barrero M. Epigenetic strategies to boost cancer immunotherapies. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1108.

146. Moskalev A, Vaiserman AM. Epigenetics of aging and longevity: translational epigenetics vol 4. Cambridge: Academic press; 2017.
147. Coppedè F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front Genet.* 2014;5:220.
148. Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, et al. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(4):870-80.
149. Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai L-H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature.* 2007;447:178.
150. Arguelles AO, Meruvu S, Bowman JD, Choudhury M. Are epigenetic drugs for diabetes and obesity at our door step? *Drug Discov Today.* 2016;21(3):499-509.
151. Wu C-J, Yang C-Y, Chen Y-H, Chen C-M, Chen L-C, Kuo M-L. The DNA methylation inhibitor 5-azacytidine increases regulatory T cells and alleviates airway inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;160(4):356-64.
152. Brand S, Kesper DA, Teich R, Kilic-Niebergall E, Pinkenburg O, Bothur E, et al. DNA methylation of Th1/Th2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(6):1602-10.e6.
153. Banerjee A, Trivedi CM, Damera G, Jiang M, Jester W, Hoshi T, et al. Trichostatin A abrogates airway constriction, but not inflammation, in murine and human asthma models. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(2):132-8.

154. Li J, Chen S, Cleary RA, Wang R, Gannon OJ, Seto E, et al. Histone deacetylase 8 regulates cortactin deacetylation and contraction in smooth muscle tissues. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2014;307(3):C288-95.
155. Van den Bosch T, Boichenko A, Leus NGJ, Ourailidou ME, Wapenaar H, Rotili D, et al. The histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 reduces pro-inflammatory gene expression and inhibits histone deacetylases. *Biochem Pharmacol*. 2016;102:130-40.
156. Comer BS, Ba M, Singer CA, Gerthoffer WT. Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;147:91-110.
157. PHG Foundation. Quest for epigenetic targets in respiratory disease [En ligne]. [consulté le 4 février 2019]. Disponible sur : <http://www.phgfoundation.org>
158. Nebbioso A, Carafa V, Benedetti R, Altucci L. Trials with 'epigenetic' drugs: an update. *Mol Oncol*. 2012;6(6):657-82.
159. De Lera AR, Ganesan A. Epigenetic polypharmacology: from combination therapy to multitargeted drugs. *Clin Epigenetics*. 2016;8:105
160. Haute Autorité de Santé. Direction de l'évaluation médicale, économique et de santé publique. Commission de la transparence. Avis du 29 avril 2009. Vidaza [En ligne]. [consulté le 16 janvier 2019]. Disponible sur : <https://www.has-sante.fr>
161. Bojang P, Ramos KS. The promise and failures of epigenetic therapies for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(1):153-69.
162. Cashen A, Juckett M, Jumonville A, Litzow M, Flynn PJ, Eckardt J, et al. Phase II study of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) for the treatment of myelodysplastic syndrome (MDS). *Ann Hematol*. 2012;91(1):33-8.

163. San-Miguel JF, Hungria VTM, Yoon S-S, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1195-206.
164. Cherblanc F, Chapman-Rothe N, Brown R, Fuchter M. Current limitations and future opportunities for epigenetic therapies. *Future Med Chem.* 2012;4(4):425-46.
165. Cramer SA, Adjei IM, Labhasetwar V. Advancements in the delivery of epigenetic drugs. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(9):1501-12.
166. Liu S. Epigenetics advancing personalized nanomedicine in cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(13):1532-43.
167. Firer MA, Gellerman G. Targeted drug delivery for cancer therapy: the other side of antibodies. *J Hematol Oncol.* 2012;5:70.
168. Guo J, Russell EG, Darcy R, Cotter TG, McKenna SL, Cahill MR, et al. Antibody-targeted cyclodextrin-based nanoparticles for siRNA delivery in the treatment of acute myeloid leukemia: physicochemical characteristics, in vitro mechanistic studies, and ex vivo patient derived therapeutic efficacy. *Mol Pharm.* 2017;14(3):940-52.
169. Baumer S, Baumer N, Appel N, Terheyden L, Fremerey J, Schelhaas S, et al. Antibody-mediated delivery of anti-KRAS-siRNA in vivo overcomes therapy resistance in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(6):1383-94.
170. Cini E, Faltoni V, Petricci E, Taddei M, Salvini L, Giannini G, et al. Antibody drug conjugates (ADCs) charged with HDAC inhibitor for targeted epigenetic modulation. *Chem Sci.* 2018;9(31):6490-6.

171. 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.* 2013;188(11):1294-302.
172. Cheng LE, Amoura Z, Cheah B, Hiepe F, Sullivan BA, Zhou L, et al. Brief report: a randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multiple-dose study to evaluate AMG 557 in patients with systemic lupus erythematosus and active lupus arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(7):1071-6.

*Faculté de Pharmacie,
Université Grenoble Alpes*



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 ».

Laura BEAUMIER

**EPIGENETICS AS A SUPPORT FOR THERAPEUTIC INNOVATION: AN
EXAMPLE OF AN EPIGENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY ON TOTAL
IMMUNOGLOBULIN E LEVELS IN ASTHMATIC ADULTS**

ABSTRACT:

Epigenetics represents a growing field of research. Although the first epidrugs are marketed in oncology, research is needed for most chronic diseases to identify epigenetic modifications associated with these diseases, constituting potential therapeutic targets. Asthma is a multifactorial disease characterized by a strong phenotypic heterogeneity; allergy, whose the main mediator is the immunoglobulin E (IgE), represents a major component of this heterogeneity. Identification of epigenetic marks associated with total IgE levels in asthmatics may bring further insight into the heterogeneity of this disease. An epigenome-wide association study of total IgE levels was conducted in 357 adults with asthma from the EGEA cohort; replication of the identified sites and regions was investigated in the MRCE cohort and a meta-analysis was conducted. A total of 15 genomic regions and 317 CpG sites have been identified, some of which are close to genes that are particularly relevant in the pathophysiology of asthma and allergy, such as *IL-17RA* and *ICOSLG*. These results pave the way for new therapeutic approaches in allergic asthma, especially *via* coupling of epidrugs to monoclonal antibodies specific for IL-17RA and ICOSLG (brodalumab and prezalumab, respectively), constituting an approach likely to improve selectivity, efficiency and tolerance of these epidrugs. Although further studies are needed, epigenetics raises many hopes and could be a source of therapeutic innovation.

KEYWORDS: Epigenetics, therapeutic innovation, asthma, allergy, total IgE, DNA methylation.

Laura BEAUMIER

**L'ÉPIGÉNÉTIQUE COMME SUPPORT D'INNOVATION THÉRAPEUTIQUE :
EXEMPLE D'UNE ÉTUDE D'ASSOCIATION ENTRE MÉTHYLATION DE L'ADN
ET TAUX D'IMMUNOGLOBULINES E TOTALES CHEZ DES ADULTES
ASTHMATIQUES**

RÉSUMÉ :

L'épigénétique constitue un domaine de recherche en pleine expansion. Si les premiers épimédicaments sont déjà apparus en cancérologie, des travaux de recherche sont nécessaires pour la plupart des autres maladies chroniques, afin d'identifier de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques épigénétiques. L'asthme est une maladie multifactorielle caractérisée par une forte hétérogénéité phénotypique ; l'allergie, dont le principal médiateur est l'immunoglobuline E (IgE), représente une composante majeure de cette hétérogénéité. L'identification de marques épigénétiques associées aux taux d'IgE totales chez des asthmatiques pourrait permettre de mieux comprendre l'hétérogénéité de cette maladie. Une étude d'association à large échelle entre méthylation de l'ADN et taux d'IgE totales a été menée chez 357 adultes asthmatiques de la cohorte EGEA ; la réplique des sites et régions identifiés a été recherchée dans la cohorte MRCE et une méta-analyse a été conduite. Au total, 15 régions génomiques et 317 sites CpG ont été identifiés, dont certains à proximité de gènes particulièrement pertinents dans la physiopathologie de l'asthme et de l'allergie, comme l'*IL-17RA* et l'*ICOSLG*. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques dans l'asthme allergique, notamment *via* le couplage d'épimédicaments à des anticorps monoclonaux spécifiques de l'*IL-17RA* (brodalumab) et de l'*ICOSLG* (préalumab), constituant une approche susceptible d'améliorer la sélectivité, l'efficacité et la tolérance de ces épimédicaments. Bien que des études plus poussées soient nécessaires, l'épigénétique suscite de nombreux espoirs et pourrait constituer un support d'innovation thérapeutique.

MOTS CLÉS : Épigénétique, innovation thérapeutique, asthme, allergie, IgE totales, méthylation de l'ADN.

FILIÈRE : Diplôme d'Études Spécialisées de Pharmacie Hospitalière, Pratique et Recherche