





**Étude du méthylome des éosinophiles isolés du sang de personnes asthmatiques**

**Par Rébecca Dionne-Gagné**

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en Sciences cliniques et biomédicales**

Québec, Canada

© Rébecca Dionne-Gagné, 2024

# RÉSUMÉ

L'asthme est une maladie respiratoire chronique qui est caractérisée par une inflammation des voies respiratoires inférieures. C'est un trait complexe, ce qui signifie que cette maladie implique l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. L'estimation de l'héritabilité génétique varie entre 50 et 90 %, en fonction des études. Plusieurs études soutiennent que l'héritabilité manquante pourrait être expliquée par l'analyse du rôle des modifications épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN. Ces mécanismes sont spécifiques au type cellulaire et il est donc recommandé de les analyser de façon isolée. Les mécanismes inflammatoires de cette maladie impliquent le recrutement et l'activation de cellules dites pro-inflammatoires tels les lymphocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Les éosinophiles contribuent activement à la pathophysiologie de l'asthme, ce qui peut être constaté par leur quantité qui est plus élevée dans le sang et/ou les poumons des personnes atteintes d'asthme comparativement aux individus non asthmatiques. L'objectif de ce projet était donc de documenter le profil de méthylation des éosinophiles isolés du sang chez des personnes asthmatiques et non asthmatiques et de les comparer. Le second objectif était d'analyser les interactions entre les sites de méthylation identifiés lors du premier objectif avec des variants génétiques de l'ADN. Les éosinophiles proviennent de 183 individus faisant partie de la Cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean. Après l'isolement des éosinophiles, le séquençage de la méthylation a été réalisé, tandis que le génotypage a été fait à l'aide d'une puce à ADN. L'association entre la méthylation de l'ADN et l'asthme a été faite à l'aide d'un modèle d'analyse linéaire à effets mixtes. Il a été possible d'identifier deux sites de méthylation (CpG) significativement associés à l'asthme ( $P < 5E-08$ ) ainsi que cinq sites ayant une association suggestive ( $P < 1E-06$ ). Les sites de méthylation significatifs, soient Chr4:1320665 et Chr2:10327957, sont situés dans deux gènes dont la fonction est liée à la réponse immunitaire soient *MAEA* et *SLC9A2*. Parmi les CpG ayant une association suggestive, Chr1:37499363 était le seul situé dans un gène associé à une fonction immunitaire, soit le gène *GRIK3*. En ce qui a trait aux analyses du locus de trait quantitatif de méthylation (mQTL), les CpG significatifs ont été associés à 229 variants génétiques dans les analyses de *cis*-mQTL ( $FDR < 0,05$ ). Un site de méthylation suggestif (Chr1:6267177) a été associé à neuf variants génétiques dans les analyses de *cis*-mQTL, l'un de ces variants (rs3138157) étant localisé dans le gène *TNFRSF25*, qui est impliqué dans l'activité immune, notamment par la régulation de l'homéostasie des lymphocytes, ainsi que lors de la stimulation du NF- $\kappa$ B. En ce qui concerne les analyses de *trans*-mQTL ( $FDR < 0,05$ ), les CpG significatifs présentent des associations avec 30 variants génétiques. Parmi les cinq sites de méthylation suggestifs, trois de ceux-ci (Chr1:37499363, Chr1:6267177 et Chr7:100027356) ont été associés à 587 variants génétiques. Plusieurs de ces variants sont localisés dans des gènes impliqués dans la réponse immunitaire ou/et dans la fonction respiratoire, certains de ces variants génétiques ont même été directement associés à des phénotypes de l'asthme et des allergies, à des fonctions respiratoires ou au décompte des éosinophiles. Plusieurs de ces dits variants ont également été validés lors des analyses du locus de trait quantitatif de l'expression génique (eQTL) par des associations en *cis*-eQTL (3 associations avec 2 gènes) et en *trans*-eQTL (714 associations avec 55 gènes), avec des gènes impliqués dans des voies biologiques de l'asthme. En bref, cette étude a permis de documenter le méthylome des éosinophiles dans l'asthme, ce qui contribue à mieux comprendre le rôle de ce type cellulaire dans la maladie.

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	v
LISTE DE FIGURES .....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	vii
REMERCIEMENTS.....	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 – ASTHME .....	4
1.1    Épidémiologie .....	4
1.1.1    Définition de l’asthme et prévalence.....	4
1.1.2    Impacts sociaux économiques (au Canada).....	4
1.1.3    Symptomatologie .....	5
1.1.4    Cause des crises .....	6
1.2    Facteurs influençant le développement de l’asthme.....	7
1.2.1    Âge et sexe .....	8
1.2.2    Ethnicité .....	9
1.2.3    Statut tabagique.....	11
1.2.4    Obésité .....	12
1.2.5    Qualité de l’air .....	14
1.3    Phénotypes .....	15
1.3.1    Physiopathologie de l’asthme allergique .....	17
1.3.2    Rôle de l’éosinophile dans l’asthme .....	23
1.3.3    Mécanisme de remodelage des voies respiratoires.....	26
1.4    Pharmacothérapie .....	27
CHAPITRE 2 – GÉNÉTIQUE DE L’ASTHME ET DU DÉCOMPTE DES ÉOSINOPHILES: LOCUS COMMUNS .....	31
CHAPITRE 3 - MÉCANISMES ET ÉTUDES ÉPIGÉNÉTIQUES.....	37
3.1    Mécanismes épigénétiques .....	37
3.2    La méthylation de l’ADN .....	39
3.3    Revue des études de la méthylation de l’ADN associé à l’asthme .....	42
CHAPITRE 4 – Eosinophil DNA methylation profile in asthma: Unraveling asthma's epigenetic landscape .....	46

4.1	Avant-propos .....	46
4.2	Résumé .....	47
4.3	Abstract .....	48
4.4	Abbreviations.....	49
4.5	Introduction.....	52
4.6	Methods.....	54
4.7	Results .....	60
4.8	Discussion .....	71
4.9	Conclusion.....	77
4.10	Acknowledgements.....	77
4.11	References .....	79
	DISCUSSION.....	84
	CONCLUSION .....	90
	BIBLIOGRAPHIE .....	92
	CERTIFICATION ÉTHIQUE .....	113
	ANNEXE 1 .....	114
	Supplementary Tables .....	114
	Supplementary Figures .....	136

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Principaux médicaments utilisés pour le traitement de l'asthme (Peter J. Barnes & Page, 2017; Bordeaux, 2022) .....	29
<b>Tableau 2.</b> Régions et gènes associés dans l'asthme et les éosinophiles (fait à l'aide de GWAS catalog) .....	32
<b>Tableau 3.</b> Études des profils de méthylation associés à un phénotype de l'asthme et aux éosinophiles .....	43
<b>Table 4.</b> Phenotypic characteristics of individuals with methylation and gene expression data from eosinophil samples .....	56
<b>Table 5.</b> Results of the epigenome-wide association study with asthma.....	62
<b>Table 6.</b> <i>Cis</i> - methylation quantitative trait loci ( <i>cis</i> -mQTL) information on variants associated to a significant or suggestive CpG in eosinophil .....	64
<b>Table 7.</b> <i>Cis</i> -expression quantitative trait loci ( <i>cis</i> -eQTL) information on variants associated to proximal genes (EWAS and mQTL) in eosinophils.....	68
<b>Table 8.</b> Summary of most relevant variants associated by methylation quantitative trait loci with CpGs of interest, and by expression quantitative trait loci with candidate genes.....	70
<b>Table 9.</b> Summary of significant <i>trans</i> - methylation quantitative trait loci ( <i>trans</i> -mQTL; FDR<0.05).....	114
<b>Table 10.</b> Summary of significant <i>trans</i> - expression quantitative trait loci ( <i>trans</i> -eQTL; FDR<0.05) .....	128
<b>Table 11.</b> Summary of correlation analysis between methylation levels and expression counts (FDR<0.05) .....	131
<b>Table 12.</b> Genes previously identified in the literature, and their reference.....	132

## LISTE DE FIGURES

<b>Figure 1.</b> Facteurs de risques du développement de l'asthme.....	8
<b>Figure 2.</b> Mécanismes immunologiques de la sensibilisation allergique .....	19
<b>Figure 3.</b> Mécanismes immunologiques de l'asthme allergique en phase précoce et en phase tardive .....	22
<b>Figure 4.</b> Mécanismes immunologiques menant à l'activation des éosinophiles dans l'asthme et à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires .....	25
<b>Figure 5.</b> Méthylation de l'ADN influençant la régulation de l'expression des gènes .....	41
<b>Figure 6.</b> Overview of the statistical analyses of the study and their results.....	55
<b>Figure 7.</b> Manhattan Plot illustrating results from the epigenome-wide association study of eosinophils for asthma phenotype .....	61
<b>Figure 8.</b> Violin plots showing methylation levels for asthmatic and non asthmatics individuals for genome-wide significant CpGs.....	63
<b>Figure 9.</b> Function categories for proximal genes of a) significant and suggestive CpGs from the epigenome-wide association study, b) genetic variants in significant <i>cis</i> -methylation quantitative trait loci ( <i>cis</i> -mQTL) analysis and c) genetic variants in significant <i>trans</i> -mQTL .....	66
<b>Figure 10.</b> Violin plots showing methylation levels by genotype for CpGs and genetic variants from significant methylation quantitative trait loci (mQTL) results .....	67
<b>Figure 11.</b> Gene ontology (GO) term enrichment analysis for proximal genes of genetic variants in significant <i>trans</i> -mQTL .....	136

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

*ABCA11P*: ATP binding cassette subfamily a member 11  
*ACOT7* : Acyl-CoA thioesterase 7  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
*AJAP1* : Adherens junctions associated protein 1  
AMP : Adénosine monophosphate  
AMPK : Protéine kinase activée par l'AMP  
ARLT : Antagonistes des récepteurs de leucotriènes  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
*AUTS2*: Activator of transcription and developmental regulator autism susceptibility gene 2 protein  
BACA : Bronchodilatateurs bêta 2-agonistes à courte durée d'action  
BALA : Bronchodilatateurs bêta 2-agonistes à longue durée d'action  
*BMPR2*: Bone morphogenetic protein receptor type 2  
C : Cytosine  
c/EBP : Famille des protéines de liaison la CCAAT  
*CAMK1D* : Protéine kinase dépendante du calcium/calmoduline  
*CCDC148*: Coiled-coil domain containing 148  
CCL : Ligand de chimiokine  
CCR : Récepteur de chimiokine  
CD : Cellule dendritique  
CD40 : Cluster de différenciation 40  
CD40L : Ligand du cluster de différenciation 40  
CG : Cytosine-guanine  
Chr : Chromosome  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
*CNTN5* : Contactin 5  
CO : Monoxyde de carbone  
*COL22A1*: Collagen type XXII Alpha 1 chain  
CpG : Cytosine-phosphate-guanine  
*CRIM1-DT* : CRIM1 divergent transcript  
CSI : Corticostéroïdes inhalés  
CysLT : Cystéinyl-leucotriènes  
*DLGAP4*: DLG associated protein 4



DNA-PK : Protéine kinase dépendante de l'ADN  
DNMT : ADN méthyltransférase  
*DPP10* : Dipeptidyl peptidase like 10  
*DUSP1* : Dual specificity phosphatase 1  
ECP : Protéine cationique des éosinophiles  
EDN : Neurotoxine dérivée des éosinophiles  
*EFNA5*: Ephrin A5  
*ELN* : Élastine  
EPO : Peroxydase des éosinophiles  
*ERGIC1* : Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment 1  
EWAS : Étude d'association à l'échelle de l'épigénome  
FcεRI : Récepteur de haute affinité de l'IgE  
FDR : False discovery rate  
*FGFRL1* : Fibroblast growth factor receptor like 1  
*FLT3* : Fms related receptor tyrosine kinase 3  
FRQS : Fonds de recherche du Québec–Santé  
G : Guanine  
*GATA* : GATA Binding Protein  
GluK3 : Glutamate ionotropic receptor kainate  
GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages  
*GNAQ*: G protein subunit Alpha Q  
*GRIK3* : Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3  
*GSDMB* : Gasdermin B  
GWAS : Étude d'association pangénomique (genome-wide association study)  
*HEY1*: Hes related family BHLH transcription factor with YRPW motif 1  
*HS6ST3* : Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3  
IFN-γ : Interféron gamma  
Ig : Immunoglobuline  
IgE : Immunoglobuline de type E  
*IKZF3* : Ikaros family transcription factor  
IL : Interleukine  
IL-5R : Récepteur de l'interleukine 5  
ILC2 : Cellule lymphoïde innée du groupe 2  
IMC : Indice de masse corporelle  
*INTS5*: integrator complex subunit 5  
IRSC : Instituts de recherche en santé du Canada  
*KSR1* : Kinase suppressor of ras 1

*LIMK1* : LIM domain kinase 1  
*LINC* : Long intergenic non-protein coding RNA  
*LINGO2*: Leucine rich repeat and Ig domain containing 2  
*MAEA* : Macrophage erythroblast attaché, E3 ubiquitin ligase  
*MBP* : Protéine de liaison majeure  
*MCPIP1* : Monocyte chemotactic protein–induced protein 1  
*Me3* : Groupement méthyle  
*MEPCE* : Methylphosphate capping enzyme  
*miARN* : Micro-ARN  
*MOBP* : Myelin associated oligodendrocyte basic protein  
*MPL* : Thrombopoietin receptor  
*MPOC*: Maladie pulmonaire obstructive chronique  
*NBAS*: NBAS subunit of NRZ tethering complex  
*NDFIP1* : Nedd4 family interacting protein 1  
*NDFIP2* : Nedd4 family interacting protein 2  
*NF-κB* : Facteur nucléaire κB  
*NHE2* : Protéine échangeuse de sodium 2  
*NK* : Cellules T natural killer  
*NPHP4* : Nephrocystin 4  
*OR4E1* : Olfactory receptor family 4 subfamily E member 1  
*PAMP* : Motifs moléculaires associés aux pathogènes  
*PBMC* : Cellules mononuclées du sang périphérique  
*PDIA6*: protéine disulfide isomérase famille A membre 6  
*PM<sub>10</sub>* : Particules ayant un diamètre de moins de 10 microns  
*PRKDC* : Protéine kinase, DNA-activée, sous-unité catalytique  
*PRR* : Récepteurs de reconnaissance de motifs cellulaires  
*PTPRC* : Protéine tyrosine phosphatase récepteur type C  
*RHN* : Respiratory Health Network  
*RhoA* : membres de la sous-famille A de l'homologue Ras  
*RISUQ* : Regroupement intersectoriel de recherche en santé de l'Université du Québec  
*RNF207* : Ring finger protein 207  
*RNF212* : Ring finger protein 212  
*RPS21*: Ribosomal protein S21  
*SLC35B3* : Solute carrier family 35 member B3  
*SLC7A1* : Solute carrier family 7 member A1  
*SLC9A2* : Solute carrier family 9 member A2  
*SLSJ* : Saguenay–Lac-Saint-Jean

*SMC2* : Structural maintenance of chromosomes 2  
*STK10* : Serine/threonine kinase 10  
*SVA* : Surrogate variables  
*TGF-  $\beta$*  : Facteur de croissance transformant bêta  
*Th* : Lymphocyte T auxiliaire  
*Th0* : Lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs  
*TMED11P* : Transmembrane p24 trafficking protein 11  
*TMEM182* : Transmembrane protein 182  
*TNF-  $\alpha$*  : Facteur de nécrose tumorale alpha  
*TNFRSF25* : Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12  
*TSLP* : Lymphopoïétine stromale thymique  
*UBL3* : Ubiquitin like 3  
*UTR* : Untranslated region  
*VEMS1/CVF* : Ratio volume expiratoire maximal en 1 seconde et capacité vitale forcée  
*VWC2* : Von Willebrand factor c domain containing 2  
*ZC3H12A* : Zinc finger CCCH-type containing 12A  
*ZCWPW1* : Zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1  
*ZFPM1* : Zinc finger protein, FOG family member 1  
*ZNF141* : Zinc finger protein 141  
*ZNF721* : Zinc finger protein 721  
*ZPLD1* : Zona pellucida like domain containing 1

# REMERCIEMENTS

Ce projet de maîtrise a été pour moi une occasion incroyable de développer mes compétences en bio-informatique, une compétence primordiale et riche d'apprentissages dans le contexte de la génomique. Je tiens donc à remercier ma directrice de recherche Catherine Laprise, sans qui ce projet n'aurait pas eu lieu. Je tiens à la remercier pour son mentorat et l'énorme expérience qu'elle m'a permis de développer durant mon baccalauréat et durant la maîtrise.

Je tiens également à remercier Anne-Marie Madore, professionnelle de recherche de l'équipe de la Pre Catherine Laprise, qui m'a accompagné avec patience pour m'enseigner les fonctions et la programmation informatique dans un contexte d'analyse génétique afin d'être en mesure de mener ce projet à terme. Je remercie également Anne-Marie Boucher-Lafleur, qui durant sa maîtrise dans l'équipe de la Pre Laprise a effectué les manipulations et les protocoles nécessaires à l'obtention des données phénotypiques, génétiques et omiques. Merci aussi à Lucile Pain, qui a travaillé de pair avec Anne-Marie Boucher-Lafleur. Merci à toute l'équipe pour leur soutien au cours des dernières années. Je souhaite offrir un remerciement spécial à Marie-Pier Bouchard, qui a contribué à l'acquisition de plusieurs de mes connaissances de base en informatique, en plus de m'aiguiller pour l'utilisation optimale d'Excel. Je remercie également les Fonds de recherche du Québec pour le financement qu'ils m'ont offert pendant la durée de ce projet.

Finalement, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner mon conjoint (William), ma famille (Nancy, Martin, Marc-André, Gabriel, Éléna et Alexandre) et mes ami(e)s qui m'ont tous appuyé, encouragé et surtout motivé au cours des dernières années.

# INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, les maladies chroniques sont en augmentation progressive dans la population. Parmi celles-ci, plusieurs maladies respiratoires chroniques sont en hausse constante due à plusieurs événements anthropiques, tels que le réchauffement climatique et la pollution, qui entraînent une diminution de la qualité de l'air (Goodsite et al., 2021; Ripple et al., 2017). L'asthme est l'une des maladies respiratoires chroniques qui occasionnent une susceptibilité chez les personnes atteintes à réagir à différents agents irritants (allergènes, polluants, pathogènes, etc.) présents dans l'air ambiant. Elle représente un important fardeau socio-économique pour l'individu et pour la population (Ismaila et al., 2019). Au Québec, cette maladie entraîne non seulement des coûts directs (hospitalisations et prise de médicaments) s'élevant en moyenne à 2 018 \$ CAN par patient, mais elle engendre également des coûts indirects (périodes d'absentéisme et pertes de productivité) variant entre 373 et 807 \$ CAN par patient au cours de l'année en 2019 (Ismaila et al., 2019). Il n'existe pas de traitement curatif pour l'asthme. Il est donc nécessaire pour les personnes atteintes de prendre une médication sur une base régulière afin de maintenir un contrôle des symptômes respiratoires et de l'inflammation bronchique qui y sont associés (Ismaila et al., 2019). Il est estimé que l'asthme touche près de 262 millions d'individus dans le monde. Ce nombre est toutefois en augmentation, et ce, particulièrement dans les pays en développement (Organisation mondiale de la Santé, 2023). L'asthme est une maladie dont le développement est influencé par des facteurs comportementaux (tabagisme, habitudes alimentaires et sportives, médicaments, etc.), des facteurs individuels (âge, sexe, génétique, milieu social, ethnicité, etc.) et des facteurs environnementaux (exposition à la pollution, réchauffement climatique, exposition à des pathogènes, etc.) (Fuchs et al., 2017). Parmi ces nombreux facteurs, l'héritabilité génétique a été analysée dans plusieurs études et elle serait estimée entre 50 et 90 % (Augustine et al., 2022; Fuchs et al., 2017; Thomsen et al., 2010; Ullemer et al., 2016). Malgré ces estimations, une proportion de l'héritabilité demeure inconnue. Celle-ci pourrait toutefois être expliquée par l'impact de la composante environnementale sur le développement et la manifestation de cette maladie. Les déterminants génétiques ne peuvent pas, à eux seuls, expliquer cette augmentation, ce qui incite de nombreux

chercheurs à tenter d'évaluer les interactions entre les gènes et l'environnement afin de mieux comprendre l'impact de l'un sur l'autre (Feil & Fraga, 2012; Trerotola et al., 2015).

L'étude de l'épigénétique pourrait expliquer une part de cette héritabilité manquante. Ce type d'étude se consacre à l'analyse des facteurs environnementaux causant des changements sur l'ADN et à la compréhension des impacts des dites modifications. Ces modifications correspondent à l'ajout de molécules qui ne modifient pas la séquence de l'ADN, mais plutôt la transcription des gènes (K. Wu et al., 2014). Ces modifications ne sont pas permanentes, et peuvent soit être acquises au cours de la vie d'un individu, soit être transmises d'une génération à l'autre (Tompkins et al., 2012). Ces mécanismes incluent plusieurs processus de modification des histones (méthylation, ubiquitination, phosphorylation et acétylation), les micro-ARN, les longs ARN non codants et la méthylation de l'ADN (K. Wu et al., 2014). L'ensemble de ces mécanismes vont influencer le niveau d'expression des gènes et sont reconnus pour être spécifiques au type cellulaire étudié (Hudon Thibeault & Laprise, 2019).

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique qui touche les voies respiratoires inférieures. Elle est caractérisée par une inflammation pulmonaire, un remodelage des bronches, une surproduction de mucus et une hyperréactivité bronchique (Agence de santé publique du Canada, 2018). Cette maladie inflammatoire nécessite l'implication de plusieurs types cellulaires différents (cellules épithéliales bronchiques, macrophages, lymphocytes, basophiles, neutrophiles, cellules dendritiques, éosinophiles) qui sont activés et qui sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires influençant le développement et le phénotype de la maladie (Boonpiyathad et al., 2019; Hammad & Lambrecht, 2021). Certaines de ces cellules peuvent être impliquées dans plusieurs phénotypes différents de l'asthme, tels les éosinophiles qui jouent un rôle dans l'asthme atopique et non atopique (Boonpiyathad et al., 2019; Hammad & Lambrecht, 2021). Récemment, des études ont soutenu le rôle des facteurs épigénétiques dans le développement de l'asthme (Bélanger & Laprise, 2021; Chun et al., 2024; Safar et al., 2023). Ces modifications peuvent en elles-mêmes servir en tant que biomarqueurs ou en tant que potentielles cibles thérapeutiques. L'un des mécanismes les plus étudiés est la méthylation de l'ADN. Il peut augmenter ou diminuer le niveau d'expression des gènes par l'ajout ou le retrait d'un groupement méthyle sur le cinquième carbone d'une cytosine (C)

précédée par une guanine (G), ce qui modifie la quantité de protéines synthétisées (Villicaña & Bell, 2021; W. Xu et al., 2016). Les études faites à ce jour ont réalisé un biais associé à l'hétérogénéité cellulaire des analyses effectuées avec du sang complet ou des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC), ce qui influence l'interprétation des résultats entre les différents types cellulaires. Afin de pallier à ce problème, ces études ont ajusté leurs analyses à l'aide d'une normalisation basée sur les pourcentages cellulaires (Adalsteinsson et al., 2012; Recto et al., 2023; C. J. Xu et al., 2018). L'étude des types cellulaires isolés est un bon moyen de mieux comprendre le rôle de l'épigénétique dans une cellule cible impliquée dans le développement de maladies chroniques.

Les objectifs de la présente étude étaient donc :

- i. Identifier le profil de méthylation des éosinophiles isolés du sang des personnes asthmatiques et faire l'étude comparative de ce profil avec celui des individus sans asthme ni allergie ;
- ii. Identifier les interactions entre les sites de méthylation associés et les variants génétiques à l'aide d'une analyse du locus de caractère quantitatif de méthylation (mQTL).

# CHAPITRE 1 – ASTHME

## 1.1 Épidémiologie

### 1.1.1 Définition de l'asthme et prévalence

L'asthme est une maladie respiratoire chronique caractérisée par des crises sporadiques. Les symptômes incluent des sifflements, un essoufflement, une oppression thoracique et une toux. L'asthme est également caractérisé par des mécanismes tissulaires tels que l'inflammation bronchique, l'obstruction des voies respiratoires et l'hyperréactivité bronchique (Agence de santé publique du Canada, 2018). En 2019, l'Organisation mondiale de la Santé a estimé que près de 262 millions d'individus à travers le monde seraient atteints. De ce nombre, approximativement 461 000 personnes en seraient décédées au cours de la même année (Organisation mondiale de la Santé, 2023). Au niveau mondial, cette maladie est plus répandue chez les enfants que chez les adultes avec des prévalences respectives de 10 % et 6,7 % (Institut canadien d'information sur la santé, 2018). Cette prévalence fait de l'asthme la maladie chronique la plus fréquente chez les enfants (Organisation mondiale de la Santé, 2023). Au Canada, les données indiquent que la prévalence de l'asthme est en augmentation depuis plusieurs années, tel qu'en témoigne la prévalence en 2014 qui était de 8,1 % (Statistique Canada, 2015), comparativement à celle de 2020 qui était de 8,7 % (Statistique Canada, 2022), ce qui fait d'elle la troisième maladie la plus commune au Canada (Organisation mondiale de la Santé, 2023).

### 1.1.2 Impacts sociaux économiques (au Canada)

L'augmentation de la prévalence de l'asthme en fait une maladie ayant un important impact au niveau socio-économique (Organisation mondiale de la Santé, 2023). L'asthme est la principale cause d'hospitalisation chez les enfants, particulièrement chez les jeunes garçons âgés de 4 ans et moins, faisant de cette maladie chronique la principale cause d'absentéisme à l'école primaire (Su et al., 2013). En moyenne, 358 enfants de moins de quatre ans ont été hospitalisés annuellement entre



2013 et 2016 au Canada. En ce qui concerne les coûts sociétaux, 94 % de ceux-ci sont engendrés par 64 % des individus asthmatiques qui ont un asthme non ou mal contrôlé (Institut canadien d'information sur la santé, 2018). Ces coûts peuvent être séparés en deux catégories, soit directs et indirects. En ce qui concerne les coûts directs, qui regroupent l'utilisation du système de santé et les traitements, ces derniers sont estimés à près de 1,30 milliard de dollars par année. Les coûts indirects, évalués selon le taux d'absentéisme et la perte de productivité, sont estimés à 1,71 milliard de dollars par année (Ismaila et al., 2019).

### **1.1.3 Symptomatologie**

Les symptômes de l'asthme sont variables entre les individus, mais également en fonction du temps et de la sévérité de la maladie (Boutin & Boulet, 2014; Cheung Wong & Farne, 2020). Dans le parcours de vie d'une personne asthmatique, il y a des périodes d'exacerbations de la symptomatologie ainsi que des périodes sans symptômes apparents. Les exacerbations peuvent être dues à différents facteurs tels que le changement de saison, l'exposition à des allergènes ou une infection respiratoire (Nasreen et al., 2019). Par ailleurs, les périodes de rémissions peuvent être associées à plusieurs facteurs, mais le sexe semble déterminant dans le profil de manifestation clinique de la maladie au cours de la vie. Ainsi, chez les jeunes garçons atteints d'asthme, il est fréquent de constater une « disparition » des symptômes à la puberté (Wang et al., 2019). Des hypothèses liées à la maturation du système immunitaire, à la taille des voies respiratoires et aux changements hormonaux sont envisagées dans la littérature scientifique (Postma, 2007).

L'asthme est une maladie sans traitement curatif. La thérapie actuelle vise à contrôler les symptômes ainsi qu'à diminuer l'inflammation (Mahmoudi, 2019). Il existe plusieurs traitements différents pour contrôler l'asthme, les plus communs étant les corticostéroïdes inhalés et les bronchodilatateurs. Les corticostéroïdes inhalés sont des anti-inflammatoires de première intention. Ils entraînent une réduction de l'inflammation des bronches, ce qui contribue à une amélioration du passage de l'air dans les voies respiratoires. Les bronchodilatateurs quant à eux entraînent la relaxation des muscles lisses des voies respiratoires et une bronchodilatation rapide permettant d'accroître la lumière bronchique et ainsi de contrôler la crise (Bordeaux, 2022; Mahmoudi, 2019).

Dans le cas où ces deux traitements ne seraient pas suffisamment efficaces pour contrôler les symptômes de l'asthme, il existe plusieurs traitements alternatifs qui peuvent être envisagés en fonction du phénotype, tels que les bronchodilatateurs antagonistes aux récepteurs muscariniques et les antagonistes des récepteurs de leucotriènes. En dernier recours, ces personnes peuvent être traitées à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les interleukines impliqués dans les réactions asthmatiques allergiques (Gülşen, 2022). Malgré ces différents traitements, les patients atteints d'asthme sévère ont souvent peu de contrôle sur leurs symptômes, ce qui diminue leur qualité de vie et influence leur rôle dans la société. Ainsi, bien que plusieurs traitements soient disponibles pour contrôler la symptomatologie des personnes asthmatiques, il y a encore une forte proportion de personnes qui ne répondent pas à la thérapie offerte; 17 % des individus sont atteints d'un asthme qualifié comme étant difficile à traiter (non-répondants à la médication) et 3,7 % des personnes asthmatiques sont atteints d'un asthme sévère, des sous-types de la maladie qui ne sont pas ou peu soulagés par la thérapie. Ces personnes peuvent aussi présenter des effets indésirables importants, ce qui motive la poursuite des recherches afin de mieux comprendre les déterminants moléculaires de la maladie (Hekking et al., 2015). En effet, une meilleure compréhension de la nature moléculaire de l'asthme pourrait permettre la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

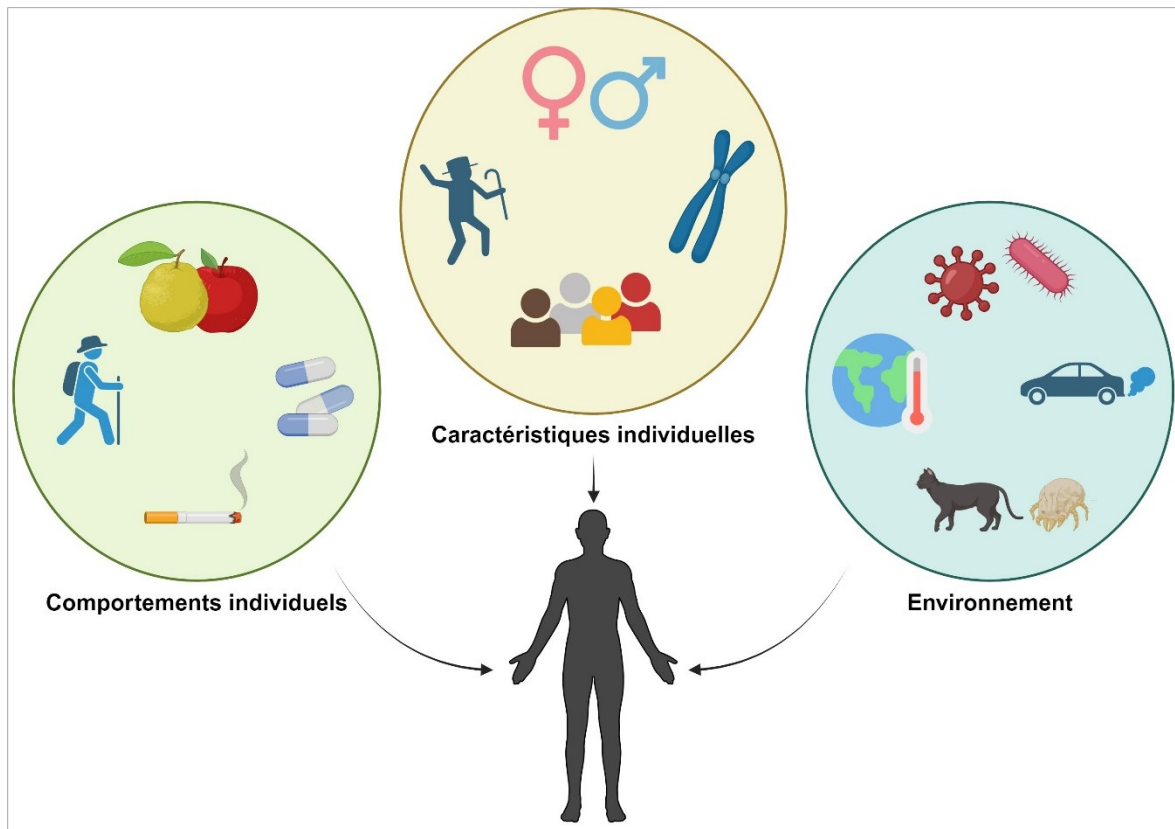
#### **1.1.4 Cause des crises**

Les causes entourant les crises d'asthme peuvent être extrêmement variées, allant du pollen à l'exercice physique. L'une des causes de l'exacerbation de l'asthme est la pollution ambiante. D'ailleurs, la prévalence de l'asthme et la fréquence des exacerbations chez les personnes atteintes sont significativement plus élevées en milieux urbains comparativement aux milieux ruraux (Leynaert et al., 2019). La pollution ambiante est composée de multiples molécules irritantes (ozones, hydrocarbures, dioxyde de soufre, etc.), qui peuvent influencer l'exacerbation et qui sont retrouvées en plus grande concentration en milieux urbains (Morin, 2012). Un autre facteur déterminant au développement et à l'exacerbation de l'asthme est la consommation directe de tabac, en plus de la consommation passive et de l'exposition *in utero* (Morin, 2012). L'asthme peut également être déclenché par l'activité physique (Morin, 2012). Un autre déclencheur de l'asthme est la mise en

contact avec des irritants en milieu de travail, notamment des composés de natures allergènes, organiques ou inorganiques. Ce type d'asthme dit occupationnel ou professionnel se développe au cours d'une exposition répétée à un irritant dans un milieu professionnel (Morin, 2012). Une crise d'asthme peut aussi être déclenchée par un allergène alimentaire ou respiratoire. Le recrutement des personnes de la cohorte familiale d'asthme ayant servi à réaliser cette étude a été réalisé en ciblant les personnes sensibilisées aux allergènes respiratoires (Simard et al., 2021).

## **1.2 Facteurs influençant le développement de l'asthme**

L'asthme est une maladie influencée par les caractéristiques individuelles (âge, sexe, ethnicité et génome), des facteurs environnementaux (exposition aux allergènes, polluants et microorganismes) et par les comportements de la personne (tabagisme, habitudes alimentaires et sportives, prise de médicaments) (Fuchs et al., 2017). Les sous-sections suivantes décrivent les facteurs principaux qui influencent le développement ou l'exacerbation de l'asthme. Il est important de savoir que cette section est non exhaustive et qu'il existe un grand nombre de facteurs individuels, environnementaux et comportementaux (Figure 1).



**Figure 1.** Facteurs de risques du développement de l'asthme

Les facteurs de risques influençant le développement de l'asthme sont séparés en fonctions des caractéristiques individuelles (âge, sexe, ethnicité, génome) des facteurs environnementaux (exposition aux allergènes, polluants et microorganismes) et par les comportements (tabagisme, habitudes alimentaires et sportives, prise de médicaments) de chaque individu (figure réalisée avec Biorender, 2023®).

### 1.2.1 Âge et sexe

L'asthme infantile se développe plus souvent chez les garçons que chez les filles, toutefois, les jeunes hommes tendent à présenter une rémission durant la puberté. Les femmes ont une tendance inverse, c'est-à-dire qu'elles développent l'asthme plus tard durant l'adolescence ou au début de leur vie d'adulte (Bhatia, 2022; Mirabelli et al., 2013; Postma, 2007). Cette tendance peut être confirmée en comparant la prévalence des hommes (7,5 %) à celle des femmes (9,9 %) à l'âge adulte (Statistique Canada, 2022). La différence par rapport aux périodes de développement de l'asthme entre les sexes, particulièrement lors de la puberté, semble impliquer des hormones sexuelles dans les mécanismes inflammatoires (Postma, 2007). Il est reconnu que ces hormones

jouent un rôle dans la régulation des cytokines et des médiateurs inflammatoires. Elles auraient également des mécanismes d'actions sur les cellules des muscles lisses des voies respiratoires ainsi que sur les cellules immunitaires (Fuentes & Silveyra, 2018). La testostérone permet notamment d'inhiber l'expression de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) et de l'interleukine (IL)-33, qui sont les premières molécules pro-inflammatoires impliquées dans l'activation des cellules immunitaires lors d'une crise d'asthme (Cephus et al., 2017; Fuentes & Silveyra, 2018). L'œstrogène augmente l'activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), tandis que la progestérone l'inhibe (Fuentes & Silveyra, 2018; Kovats, 2015). L'œstrogène et la progestérone jouent tous deux un rôle dans la dégranulation des éosinophiles (Hellings et al., 2003; Keselman & Heller, 2015; Townsend et al., 2012). De plus, les hormones peuvent réguler directement la transcription des gènes en formant un complexe hormone-récepteur dans les régions promotrices des gènes. Les protéines ainsi traduites peuvent ensuite réguler indirectement la transcription en activant les cascades de signalisation intracellulaires lors de la liaison des hormones avec les protéines G (Fuentes & Silveyra, 2018).

Des marques épigénétiques, plus spécifiquement des différences de méthylation, ont été rapportées comme étant variables selon le sexe et l'âge chez les personnes asthmatiques (Field et al., 2018; Rathod et al., 2022). Une étude de Rutu Patel et ses collègues, réalisée à l'aide d'individus de la *Isle of Wight birth cohort*, a permis d'associer des sites différenciellement méthylés, qui sont spécifiques au sexe des personnes atteintes, à l'asthme (Patel et al., 2021). Une étude d'association longitudinale à l'échelle de l'épigénome réalisée avec les individus de la même cohorte a également permis de soutenir des différences de méthylation entre les sexes et qui, pour certains sites, sont spécifiques à l'âge (Rathod et al., 2022).

### **1.2.2 Ethnicité**

Bien que l'asthme soit un problème de santé à l'échelle mondiale, il est possible de constater certaines différences entre ethnies. Ces différences influencent plusieurs aspects de la maladie, notamment la prévalence, le phénotype et la sévérité (Pham et al., 2021). Une évaluation statistique faite par l'*American Lung Association* en 2018 a permis d'évaluer la prévalence de l'asthme selon l'ethnicité aux États-Unis. Les résultats présentent une forte prévalence d'asthme chez les peuples

autochtones du territoire américain et d'Alaska (12,0 %). Cette tendance est suivie par la population afro-américaine (10,9 %) puis par la population caucasienne (7,7 %), hispanique (6,4 %) et asiatique (4,0 %) (American Lung Association, 2020). Cette différence entre les ethnies peut être également observée entre les populations des différents sous-groupes qui les composent. Par exemple, la prévalence d'asthme est de 14,0 % chez les Portoricains comparativement à 6,4 % pour les groupes hispaniques tels que les Mexicains américains (American Lung Association, 2020; Ruano et al., 2009). De plus, une étude de Cardet et ses collègues a indiqué que les Portoricains présentent une prévalence et une mortalité significativement supérieures aux autres populations hispaniques (Cardet et al., 2022; Y. Y. Han et al., 2020). Ces différences pourraient être causées par plusieurs facteurs, tels que le taux plus élevé d'infections respiratoires chez les enfants de cette île (Pham et al., 2021). En effet, l'exposition microbienne et les infections en bas âge pourraient expliquer, du moins en partie, cette disparité entre les populations (Wohlford et al., 2020). Par ailleurs, des études réalisées auprès de populations amish et huttériennes ont permis de démontrer qu'une exposition à un environnement agricole traditionnel durant l'enfance pourrait avoir un effet préventif dans le développement de l'asthme et de l'allergie par l'établissement d'un microbiote intestinal protecteur (Von Mutius, 2021). Ces deux populations partagent des déterminants génétiques similaires provenant de leurs ancêtres européens (Ober et al., 2017; Stein et al., 2016). Les Amish, qui exercent un mode de vie traditionnel, ont une agriculture de subsistance, soit sans l'utilisation de la technologie. Ce peuple présente une prévalence d'asthme de 5,2 % (Holbreich et al., 2012). À l'opposé, les Huttériens procèdent à une agriculture à plus grande échelle et utilisent une approche moderne par l'utilisation de la technologie dans leur pratique agricole. Cette population présente une prévalence d'asthme de 21,3 % (Motika et al., 2011; Ober et al., 2017). La différence entre ces populations permet de soutenir les découvertes antérieures, identifiant des interactions entre le microbiote et la pollution environnementale en tant que causes aggravantes de la prévalence et de l'exacerbation de l'asthme (Comtet-Marre et al., 2020; Zheng et al., 2020).

### 1.2.3 Statut tabagique

L'exposition active ou passive au tabac est un facteur déterminant dans le développement de maladies respiratoires, de troubles cardiovasculaires, de plusieurs cancers (bouche, gorge, poumons, etc.) et de nombreux problèmes liés à la fertilité. Cette exposition entraîne une diminution de l'efficacité du système immunitaire ainsi que des modifications au niveau de la signalisation cellulaire (Stämpfli & Anderson, 2009).

Le tissu pulmonaire est en contact constant avec les microorganismes, les polluants, les allergènes ainsi que toutes les particules qui composent l'air ambiant. Afin de se protéger contre les agressions environnementales, les organismes ont développé des mécanismes de défense impliquant l'immunité innée et l'immunité adaptative (Strzelak et al., 2018). L'exposition chronique à des agents irritants, tels que les 7 000 composants chimiques qui se forment lors de la combustion des ingrédients retrouvés dans la cigarette (American Lung Association), altère les mécanismes immunitaires et inflammatoires, ce qui conduit à des modifications indésirables des réponses cellulaires (Stämpfli & Anderson, 2009; Strzelak et al., 2018). Par conséquent, l'exposition primaire et secondaire à la fumée de cigarette a un impact sur le développement de l'asthme (Alati et al., 2006; Hu et al., 2017). Les enfants sont plus vulnérables aux impacts négatifs de la fumée secondaire, puisque leurs systèmes immunitaire et respiratoire sont en développement (Hu et al., 2017). L'exposition des jeunes enfants à la fumée secondaire est associée à la diminution des fonctions pulmonaires, une augmentation des risques d'infections respiratoires des voies aériennes supérieures et inférieures, ainsi qu'à l'augmentation du risque de développer de l'asthme (Pattenden et al., 2006; Strzelak et al., 2018). L'exposition prénatale par la consommation maternelle de la cigarette entraîne une augmentation du risque de développement de l'asthme infantile. Les composantes de la cigarette causent de multiples modifications entourant le fonctionnement pulmonaire et la réponse immunitaire, possiblement par le biais de mécanismes épigénétiques qui modulent l'expression des gènes et le niveau de différentes protéines essentielles au bon fonctionnement des tissus respiratoires et immunitaires (Gibbs et al., 2016).

Une étude antérieure de Divya Chhabra et ses collègues a permis d'identifier des modifications de méthylation de l'ADN dans les tissus pulmonaires au niveau du gène *dipeptidyl peptidase like 10 (DPP10)* qui avait déjà été associé à l'asthme dans des études antérieures (Chhabra et al., 2014; Poon et al., 2014; Sim et al., 2022).

Par ailleurs, les connaissances entourant les impacts de la consommation de la cigarette électronique et de la marijuana sont pour le moment incomplètes et demeurent le sujet de nombreuses recherches (Hickman & Jaspers, 2020; Lei & Shao, 2022; Tashkin et al., 2022). Un survol rapide des études publiées indique que la cigarette électronique et la marijuana pourraient induire des symptômes similaires à ceux de l'asthme chez les personnes non asthmatiques, comme la toux, la production d'expectorations et une respiration sifflante, ainsi qu'une augmentation des exacerbations chez les individus asthmatiques (Hickman & Jaspers, 2020; Tashkin et al., 2022). En ce qui concerne le vapotage, les chercheurs parlent même d'une tempête inflammatoire spécifique et d'une potentielle nouvelle étiologie respiratoire, qui serait influencée par d'autres voies biologiques que celles présentement identifiées par la consommation de cigarettes (Wills et al., 2021).

#### **1.2.4 Obésité**

L'obésité est un facteur de risque qui impacte le développement ainsi que le phénotype de l'asthme chez les enfants et chez les adultes atteints (Miethe et al., 2020; Peters et al., 2018). L'obésité, un problème de santé publique, est donc considéré comme une comorbidité de l'asthme et elle est déterminée par l'indice de masse corporelle (IMC), une valeur qui se calcule par un simple rapport mathématique entre le poids et la taille (poids (kg) / taille(m)<sup>2</sup>) (Peters et al., 2018). Ainsi, il est reconnu qu'un IMC >30 correspond à un syndrome d'obésité. Une méta-analyse comprenant 13 études a permis de rapporter un effet dose-réponse de l'IMC et du risque de développement de l'asthme chez les adultes. Cette étude présente une augmentation du risque relatif de 32 % par augmentation de cinq unités de l'IMC (Parasuaraman et al., 2023). Une corrélation similaire peut être constater lorsque l'analyse utilise l'augmentation du tour de taille (cm), une seconde mesure permettant de déterminer le risque de développer une maladie liée à l'obésité, le risque relatif était augmenté de 26% par augmentation de 10 cm du tour de taille (Parasuaraman et al., 2023). Ainsi, il



est reconnu qu'un tour de taille supérieur à 88 cm chez la femme et à 102 cm chez l'homme correspond au seuil déterminant un risque marqué de développer des problèmes de santé associés à l'obésité (Lean et al., 1995). La prise de poids (kg) indiquait une augmentation du risque relatif de 33% par gain de 10 kg chez les personnes asthmatique (Parasuaraman et al., 2023). L'obésité entraîne une diminution de la capacité résiduelle fonctionnelle, du volume de réserve expiratoire, du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) ainsi que de la capacité vitale forcée. Ces modifications des fonctions respiratoires peuvent contribuer au développement de l'asthme (Dixon & Peters, 2018). L'environnement pro-inflammatoire engendré par l'obésité viscérale peut aussi représenter un environnement systémique favorable au développement de l'inflammation bronchique et de l'asthme chez certaines personnes prédisposées. En effet, les adipocytes sécrètent des molécules pro-inflammatoires telles que la leptine, la protéine C réactive, l'IL-6 ainsi que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ce qui correspond aux médiateurs inflammatoires retrouvés dans le tissu bronchique des personnes asthmatiques (Ellulu et al., 2017; Fantuzzi & Mazzone, 2007; Forno et al., 2014; Liu et al., 2020; Scott et al., 2017).

Le poids durant l'enfance peut également présenter un risque aggravant l'incidence d'apparition de la maladie. Deux méta-analyses publiées ont indiqué que les enfants en surpoids avaient un risque de développer de l'asthme de 20 % supérieur à celui des enfants ayant un IMC non lié à un surplus de poids. Ce taux augmente à 40 % chez les enfants atteints d'obésité (Y. C. Chen et al., 2013; Deng et al., 2019).

De plus, l'obésité maternelle durant la grossesse pourrait avoir un impact sur l'incidence de l'asthme chez les enfants (Forno et al., 2014; Polinski et al., 2022; Shufang et al., 2020). Cette augmentation du risque de développer de l'asthme pourrait être dû à une exposition du fœtus à un environnement intra-utérin pro-inflammatoire, qui est associé au risque de présenter de l'obésité et de l'asthme infantile. Certaines de ces molécules, telles que TNF- $\alpha$  et l'IL-6, peuvent être retrouvées dans le placenta et le sérum maternel, ce qui pourrait influencer les mécanismes immunitaires du fœtus (Carpentier et al., 2011; Denizli et al., 2022). Précisément, l'obésité maternelle entraîne des modifications des taux de cytokines inflammatoires associés à l'asthme, tel que l'IL-6 sérique qui serait présent à de plus haute concentration chez les enfants nés de mères atteintes d'obésité

(Fantuzzi & Mazzone, 2007; Forno et al., 2014; Liu et al., 2020). La protéine FoxO1, un membre de la famille des facteurs de transcription Forkhead, est médiée par l'IL-6 (Selle et al., 2022). La protéine FoxO1 régule la différenciation des lymphocytes Th9 ainsi que l'activation des macrophages M2 retrouvés dans les voies respiratoires d'individus allergiques (Adalsteinsson et al., 2012; Chung et al., 2019).

### **1.2.5 Qualité de l'air**

La pollution de l'air est un sujet préoccupant pour les pays industrialisés depuis la fin du XIXe siècle. Au début du XXe siècle, une série d'incidents associés au smog en milieu urbain a démontré l'impact de la pollution sur la santé publique (Goodsite et al., 2021; Ripple et al., 2017). L'urbanisation et l'industrialisation sont deux causes majeures de pollution environnementale, ce qui augmente la prévalence et l'exacerbation de l'asthme dans les populations urbaines (Organisation mondiale de la Santé, 2023). Une étude de Maryam Faraji et ses collègues a permis de constater une augmentation de la prévalence de l'asthme dans la métropole de Téhéran (11,73 %), ce qui est supérieur à la prévalence de l'Iran (8,9 %). Cette variation peut être expliquée par une augmentation des concentrations de monoxyde de carbone (CO) et de particules ayant un diamètre de moins de 10 microns (PM<sub>10</sub>), qui ont une association positive à la prévalence de l'asthme (Faraji et al., 2021). Des études similaires effectuées dans différents pays incluant notamment le Canada, la Chine et l'Allemagne ont permis d'appuyer cette différence dans la prévalence et l'exacerbation de l'asthme entre les milieux ruraux et urbains, qui serait amplifiée par la concentration de polluant dans l'air (Desalu et al., 2021; Lawson et al., 2011; Lawson et al., 2017; W.-J. Zhu et al., 2015).

La pollution environnementale influence les mécanismes physiologiques du corps, ce qui impacte le développement de l'asthme. Une étude de Ping Zheng et ses collègues a identifié des modifications du microbiote intestinal chez des individus exposés à une journée de smog par rapport à des individus non exposés (Zheng et al., 2020). Il est aussi connu que ces changements de compositions peuvent influencer à distance les mécanismes immunitaires, tel que démontré par le profil de cytokines présent dans les voies aériennes (McAleer & Kolls, 2018; Shukla et al., 2017; Sokolowska et al., 2018). L'un des mécanismes possibles est l'augmentation de la quantité de

bactéries sécrétrices d'histamine dans le système digestif, l'histamine provenant du microbiote intestinal peut influencer les mécanismes immunitaires et inflammatoires au niveau du tissu pulmonaire (Barcik et al., 2016).

L'asthme lié à une exposition au travail est dit un asthme professionnel. Ce phénotype d'asthme peut être divisé en deux catégories, soit la sensibilisation due à une exposition prolongée à des agents allergènes (farine, métaux, poussières, produits nettoyants, etc.) ou par l'irritation des bronches par un agent irritant à forte concentration (chlore, ammoniac, fumée, etc.) (Feary et al., 2020; Roio et al., 2021; Tiotiu et al., 2020). Ces molécules sont présentes dans de nombreux cadres de travail et peuvent représenter un risque de santé respiratoire pour les employés de ces milieux professionnels (agroalimentaire, construction, minière, santé, etc.) (Roio et al., 2021).

### **1.3 Phénotypes**

L'asthme présente une grande hétérogénéité clinique, c'est-à-dire qu'il se manifeste avec des symptômes et une sévérité très variable entre les individus et variera aussi durant le parcours de vie (Kuruville et al., 2019; Turkalj et al., 2018). L'asthme peut être classifié par phénotype, ce qui correspond généralement à une classification des formes d'asthme basées sur la réponse à un facteur déclencheur (irritants respiratoires au travail, aéroallergènes, virus, exercice). Une autre classification possible se base sur les endotypes, ce qui correspond à une classification basée sur les mécanismes ou les voies biologiques impliqués (Kuruville et al., 2019).

Les phénotypes cliniques regroupent les manifestations cliniques observables, tels que l'âge d'apparition des symptômes (infantile et/ou adulte) et la sévérité de ceux-ci (léger, modéré, sévère) (Cloutier et al., 2020; Kaur & Chupp, 2019). L'asthme léger est relativement fréquent et les symptômes sont bien contrôlés par les médicaments existants. L'asthme modéré présente des crises plus régulières, avec des symptômes plus incommodes, mais relativement bien contrôlés. En ce qui a trait à l'asthme sévère, les crises sont fréquentes et les symptômes sont difficilement contrôlables, menant parfois à des hospitalisations et au décès de l'individu dans de rares cas. L'asthme sévère nécessite une prise continue des traitements, dont la posologie est plus élevée que

celle recommandée pour les personnes atteintes des phénotypes léger et modéré (Global initiative for Asthma, 2023).

Afin de diagnostiquer le phénotype de l'asthme, le clinicien doit tenir compte de la cause des crises lorsque celle-ci est connue. Il doit également interpréter les résultats des examens cliniques tels que les tests respiratoires (spirométrie et pléthysmographie), le test de provocation bronchique et les tests d'allergies (tests cutanés) (Cloutier et al., 2020). Le phénotype de l'asthme peut être qualifié par le déclencheur des crises lorsque celui-ci est connu, et associé à une condition ou à une situation. Il y a par exemple l'asthme à l'effort qui est causé par l'activité physique, l'asthme professionnel, qui est causée par une molécule spécifique au milieu de travail et il y a l'asthme associé à l'obésité, qui peut être déclenché ou exacerbé par cette comorbidité (Morin, 2012; Peters et al., 2018; Roio et al., 2021). Dans le cas d'une mauvaise ou d'une absence de réponse aux traitements, il est possible de classifier l'asthme comme étant difficilement traitable (Cloutier et al., 2020).

Le phénotype le plus commun de l'asthme est celui de l'asthme atopique déclenché par l'exposition à un allergène. Ce phénotype est aisément identifiable puisqu'il débute généralement durant l'enfance et est associé à un historique familial de maladies allergiques (atopie, dermatite atopique, eczéma, rhinite allergique, allergie alimentaire, etc.) (Kuruvilla et al., 2019; Morin, 2012; Rochat, 2005). Ce phénotype est celui sur lequel se concentre la présente étude à l'aide de la cohorte familiale d'asthme du Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ). Parmi les individus de cette cohorte, 70 % des personnes asthmatiques sont atteints d'allergies comparativement à 40 % pour les individus sans asthme (Laprise, 2014). Un autre phénotype est l'asthme intrinsèque, dit non atopique. Ce type est défini par des tests cutanés négatifs et par l'absence d'immunoglobuline de type E (IgE) sérique spécifique à l'allergène. Lorsque l'un de ces deux tests est positif, il soutient le diagnostic d'un asthme atopique (Kuruvilla et al., 2019; Morin, 2012; Rochat, 2005).

Les phénotypes moléculaires de l'asthme sont caractérisés par une concentration élevée de certains types de cellules immunitaires au niveau des bronches. Il est notamment possible d'identifier l'asthme neutrophilique et éosinophilique à l'aide de l'analyse immunologique des expectorations des

individus qui contiendraient une quantité élevée de neutrophiles ou d'éosinophiles. Toutefois, une éosinophilie peut être présente dans le contexte de l'asthme atopique et non atopique (Boonpiyathad et al., 2019; Carr et al., 2018).

En ce qui concerne les endotypes de l'asthme, ceux-ci peuvent être séparés en deux grandes catégories, soit l'asthme de type 2 (Th2), qui est associé à l'asthme allergique et à la présence d'éosinophile, et l'asthme non-Th2, qui est associé au recrutement des lymphocytes T auxiliaire, des lymphocytes Th17 et des neutrophiles (Seys & Long, 2022).

Bien que de nombreux phénotypes et endotypes d'asthme soient reconnus, ce mémoire se concentre sur l'étude des éosinophiles dans une cohorte construite avec le phénotype asthme allergique.

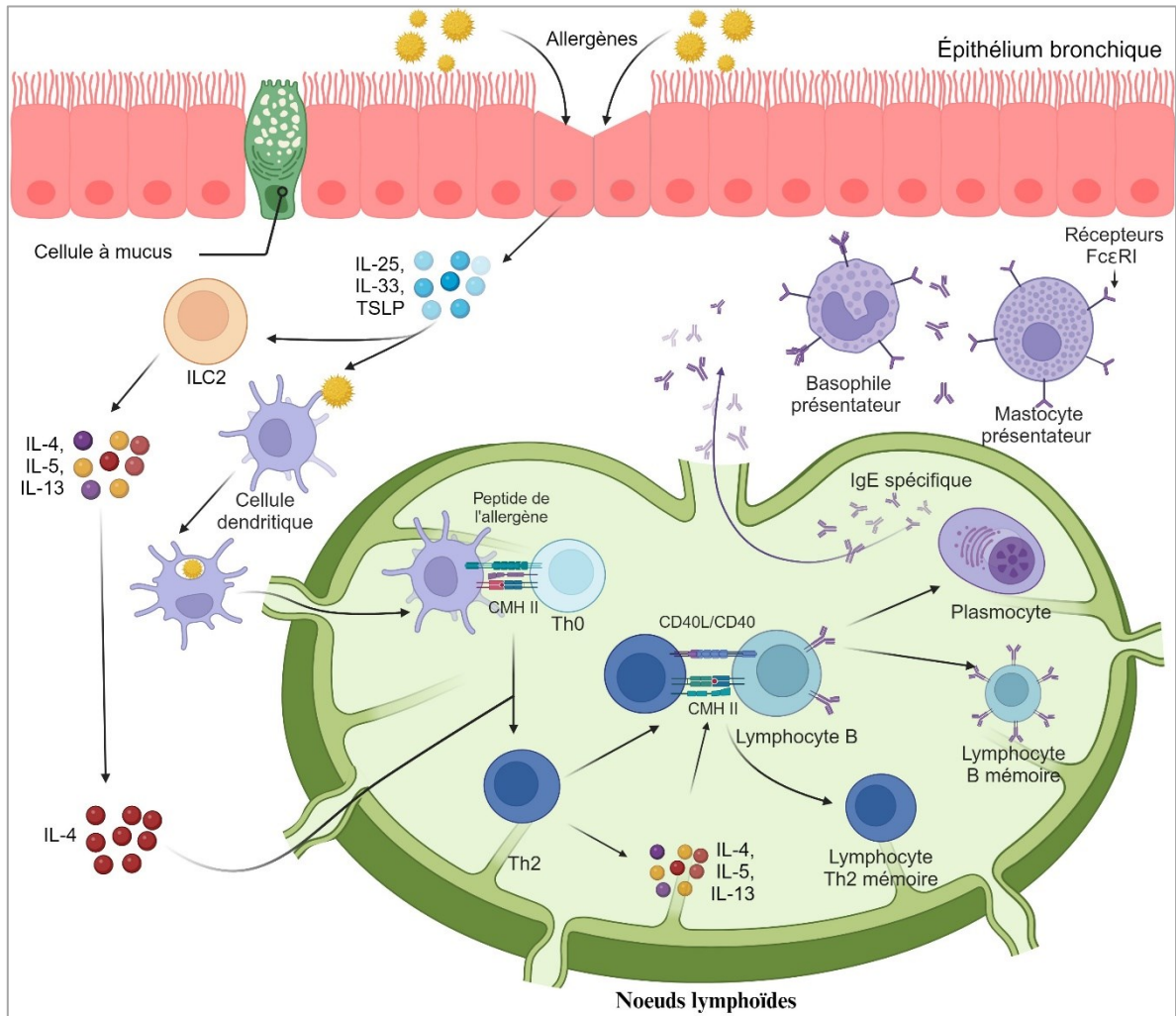
### **1.3.1 Physiopathologie de l'asthme allergique**

L'asthme allergique est caractérisé par une phase de sensibilisation à un allergène qui se déroule généralement sans l'apparition de symptômes (Figure 2). Ce mécanisme est causé par une hypersensibilité des cellules immunitaires lors d'un contact avec une protéine normalement inoffensive (Ahmadi et al., 2016; Komlósi et al., 2022). Ce processus se déroule lorsque les cellules épithéliales sont activées lors d'une liaison entre leurs récepteurs de reconnaissance de motif moléculaire (PRR) et les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMP) présents sur les allergènes. Le système peut également être activé lorsque la cohésion entre les cellules épithéliales est compromise par des lésions tissulaires (Komlósi et al., 2022; Kuruvilla et al., 2019).

Cette activation des cellules épithéliales entraîne la sécrétion de molécules pro-inflammatoires de type Th2, des alarmines, soit l'IL-25, l'IL-33 et la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) (Boonpiyathad et al., 2019; Kaur & Chupp, 2019). Les alarmines amorcent la réaction immunitaire en activant les cellules dendritiques (CD) et les cellules lymphoïdes innées du groupe 2 (ILC2) (Boonpiyathad et al., 2019). Les ILC2 sécrètent d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13). Ces molécules auront différentes actions durant les processus inflammatoires,

notamment le recrutement des éosinophiles et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (Th0) (Hammad & Lambrecht, 2021; Rodriguez-Rodriguez et al., 2021) .

Simultanément, les CD internalisent l'allergène afin de le dégrader en peptides. Elles vont migrer jusqu'aux nœuds lymphoïdes où elles présenteront les antigènes de l'allergène aux lymphocytes Th0 à l'aide du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Holgate, 2012). Lors de la présentation de l'antigène par les CD, l'IL-4 sécrétée précédemment permettra la différenciation des lymphocytes Th0 en lymphocytes Th2 spécifiques qui sécrèteront eux-mêmes de l'IL-4, l'IL-5 et de l'IL-13 (Boonpiyathad et al., 2019; Holgate, 2012). Ces cellules spécialisées vont activer les lymphocytes B en leur présentant les peptides allergéniques via la liaison des récepteurs de hautes affinités, soit le CD40 et de leur ligand, le CD40L (Kawabe et al., 2011). Les lymphocytes B activés deviendront des plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (Ig), tels que les IgE spécifiques à l'allergène sensibilisé. Ces molécules seront perçues par les récepteurs de haute affinité avec les IgE (FcεRI) qui sont exprimés à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette dernière étape est importante afin de conserver l'allergène dans la mémoire immunologique, ce qui accélérera la vitesse de la réponse immunitaire lors d'une réexposition (Bloemen et al., 2007; Holgate, 2012).



**Figure 2.** Mécanismes immunologiques de la sensibilisation allergique

Lors d'une exposition à un allergène, celui-ci interagit avec l'épithélium bronchique, ce qui mène à la sécrétion d'alarmines provenant des cellules épithéliales. Les alarmines activent les cellules (CD) et les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2). Ces dernières vont sécréter des IL-4, IL-5, IL-13. Les CD vont internaliser l'allergène et elles vont le dégrader en peptides afin de les présenter au lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïf (Th0). La présence simultanée de l'IL-4 permettra la différenciation de ces cellules en lymphocyte Th2. Ces cellules vont ensuite activer les lymphocytes B afin de conserver des lymphocytes B et T mémoires dans les nœuds lymphoïdes. Certains lymphocytes B se différencieront en plasmocytes qui sécrètent des IgE spécifiques à l'allergène. Ces molécules se lient aux récepteurs de haute affinité avec les IgE (FcεRI) exprimés à la surface des mastocytes et des basophiles résidents dans les poumons (Figure réalisée avec BioRender®, 2023).

À la suite de la phase de sensibilisation, le système immunitaire entame immédiatement une réponse inflammatoire de type Th2 lors d'une réexposition à l'allergène sensibilisé. La réaction

immunitaire peut se dérouler en deux phases, soit la réponse immédiate et la réponse tardive (Figure 3) (Bloemen et al., 2007). La première réponse se déroule dès le premier contact avec l'allergène puisque ce dernier peut se lier aux IgE spécifiques qui sont liés aux récepteurs FcεRI situés sur les mastocytes et les basophiles. L'allergène peut également être reconnu par les PRR des cellules épithéliales, qui activeront la sécrétion des mêmes alarmines que lors de la phase de sensibilisation (IL-25, IL-33 et TSLP). Les mastocytes et les basophiles activés vont procéder à leur dégranulation, ce qui libère des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine, la prostaglandine D<sub>2</sub> et les cystéinyl-leucotriènes (cysLT), C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) et E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) (Bloemen et al., 2007; Yamauchi & Ogasawara, 2019).

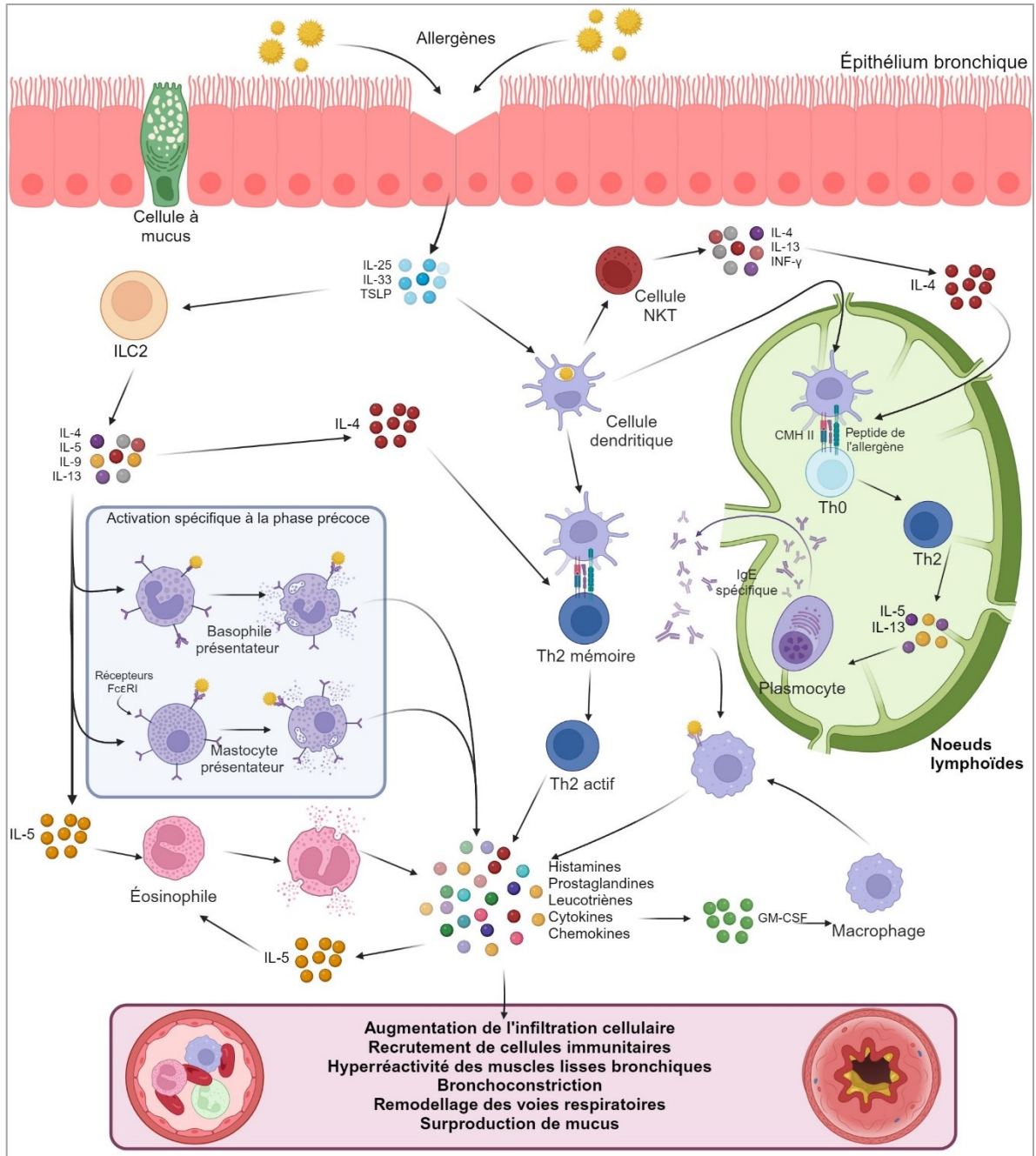
L'histamine participe à la contraction du muscle lisse des bronches, ainsi qu'à la perméabilité tissulaire et à la sécrétion de mucus en se liant au récepteur H<sub>1</sub> (Bloemen et al., 2007; Yamauchi & Ogasawara, 2019). La prostaglandine D<sub>2</sub> intervient dans le recrutement des cellules immunitaires telles que les éosinophiles et dans l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (P. J. Barnes, 2011). Les leucotriènes sont des médiateurs lipidiques qui vont permettre le recrutement des éosinophiles et influencer les mécanismes de bronchoconstriction (Bloemen et al., 2007; Hammad & Lambrecht, 2021; Kuruvilla et al., 2019). L'ensemble de ces molécules vont entraîner des modifications au niveau de la vascularisation du muscle lisse, contribuant à l'infiltration des cellules immunitaires qui seront activées par le milieu inflammatoire pulmonaire. Elles contribueront donc à l'inflammation chronique et au remodelage des voies respiratoires caractéristiques de l'asthme (Hall & Agrawal, 2014).

La phase tardive est caractérisée par une inflammation excessive des voies respiratoires causée par une infiltration des cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T, les neutrophiles et les éosinophiles. Ces cellules sont activées par des médiateurs pro-inflammatoires et elles sécrètent elles-mêmes des molécules pro-inflammatoires, telles que des cytokines et des chimiokines (Bloemen et al., 2007; Boonpiyathad et al., 2019). Lors de la phase tardive, les CD dans les voies respiratoires vont présenter à répétition l'allergène aux lymphocytes Th2 spécifiques qui sont localisés dans le tissu pulmonaire, ainsi qu'aux lymphocytes Th0 localisés dans les nœuds lymphoïdes. Ceci maintiendra et stimulera l'inflammation chronique menant au remodelage des voies respiratoires (Gill, 2012; Komlósi et al., 2022). Les alarmines vont



activer les ILC2, qui secrèteront l'IL-4, une cytokine nécessaire à la différenciation et à l'activation des lymphocytes (Rodriguez-Rodriguez et al., 2021). L'IL-4 peut également provenir des basophiles qui ont sécrété cette cytokine durant la phase immédiate. Les lymphocytes Th2 activés sécrètent différents médiateurs pro-inflammatoires associés à l'asthme tels que des interleukines (IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13), le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), ainsi que des chimiokines (CCL1 et CCL22) (Boonpiyathad et al., 2019; Lloyd & Hessel, 2010). Les CD ont également le rôle d'activer les cellules T Natural Killer (NK) en leur présentant l'antigène lipidique. Les cellules NK activées secrèteront des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-13 et l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (K. W. Kim et al., 2021; Komlósi et al., 2022). Parmi les cellules T qui sont activées durant l'asthme allergique, certaines sont antagonistes à celles présentées précédemment et jouent un rôle dans la régulation de l'activité immunitaire : il s'agit des cellules T régulatrices. Ces cellules vont inhiber l'activité inflammatoire par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Lloyd & Hessel, 2010).

Les principales interleukines abordées ont toutes des actions et des rôles différents au niveau du développement de l'inflammation dans l'asthme. La production d'IL-4 par les lymphocytes T permet de maintenir la différenciation de ces cellules vers le type Th2 en plus de stimuler la production d'IgE spécifiques à l'allergène (Bloemen et al., 2007). L'IL-9 contribuerait au développement de l'inflammation neutrophilique, à l'augmentation de la sécrétion de mucus et à l'hyperréactivité bronchique. L'IL-13 agit d'une manière similaire à l'IL-4, soit la différenciation des lymphocytes B ainsi que la production d'IgE. Cette cytokine augmente la prolifération du muscle lisse des bronches (Marone et al., 2019). Le GM-CSF sécrété permet d'augmenter la prolifération et la maturation des cellules dendritiques et des macrophages, en plus de favoriser la survie des éosinophiles (Komlósi et al., 2022). L'IL-5 est une cytokine particulièrement impliquée dans la migration, la maturation, la prolifération, l'activation et la dégranulation des éosinophiles. Cette molécule se lie à son récepteur spécifique, soit l'IL-5R, qui peut également reconnaître l'IL-3 et le GM-CSF (Lambrecht et al., 2019; Pelaia et al., 2019).



**Figure 3.** Mécanismes immunologiques de l'asthme allergique en phase précoce et en phase tardive

L'allergène traverse l'épithélium et entraîne la sécrétion de médiateurs pro-inflammation (TSLP, IL-25 et IL-33) par les cellules de l'épithélium bronchique. Ces médiateurs vont activer les ILC2 et les cellules dendritiques. Le premier type cellulaire sécrète de l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et de l'IL-13 dans le milieu, tandis que le second type présente l'antigène aux cellules immunitaires cibles. Lors de la phase précoce, les interleukines sécrétées par les ILC2 vont permettre la liaison de l'allergène aux IgE spécifiques qui sont fixés sur les récepteurs FcεRI des mastocytes et des basophiles. Ceci entrainera la dégranulation de ces cellules lors de la phase précoce, ce qui

va relâcher dans les poumons de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes, des cytokines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. L'IL-5 sécrétée par les ILC2 permet l'activation des éosinophiles durant la phase précoce. La phase tardive sera initiée lors de l'activation des cellules dendritiques, qui peuvent entamer deux processus distincts, soit par l'activation des lymphocytes Th2 mémoires qui résident dans les poumons, ou par leur migration dans les nœuds lymphoïdes afin de poursuivre la différenciation cellulaire des lymphocytes Th0, ce qui maintient les mécanismes observés lors de la sensibilisation. L'activation des lymphocytes Th2 dans les poumons permet la sécrétion de médiateurs inflammatoires qui peuvent activer les éosinophiles (IL-5), les macrophages (GM-CSF) et les lymphocytes Th2 (IL-4). Les molécules sécrétées durant les phases précoce et tardive vont entraîner une augmentation de l'infiltration cellulaire (histamine, prostaglandine, etc.), l'augmentation du recrutement des cellules immunitaires (prostaglandine, GM-CSF, etc.), l'hyperréactivité bronchique (IL-9, prostaglandines, etc.), la bronchoconstriction (histamines, leucotriène, etc.), la surproduction de mucus (IL-4, IL-9, etc.) ainsi que le remodelage des voies respiratoires (IL-9, TGF- $\beta$ , etc.) (Figure réalisée avec BioRender®, 2023).

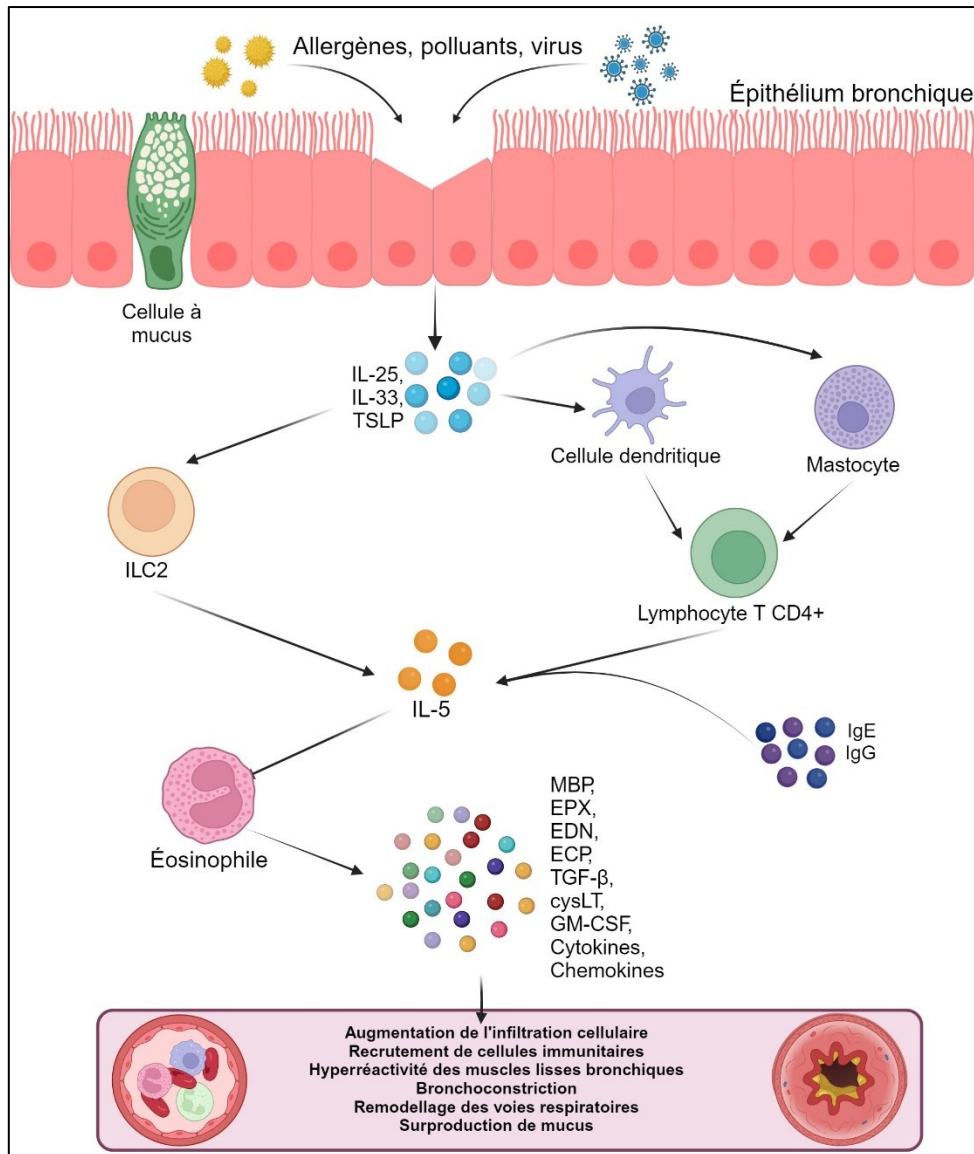
### **1.3.2 Rôle de l'éosinophile dans l'asthme**

Les éosinophiles sont des granulocytes qui représentent moins de 5 % des leucocytes totaux (McBrien & Menzies-Gow, 2017). Les individus atteints d'asthme allergique présentent généralement une augmentation du taux d'éosinophiles et de l'activation de ces cellules. Les éosinophiles possèdent une variété de protéines de surface et de récepteurs qui peuvent reconnaître plusieurs cytokines, chimiokines et facteurs de croissance différents (Vatrella et al., 2022). Les éosinophiles se différencient à partir des cellules myéloïdes progénitrices dans la moelle osseuse (McBrien & Menzies-Gow, 2017). Une fois que la différenciation est complétée, les éosinophiles vont présenter à leur surface des récepteurs de l'IL-5 (IL-5R). La maturation des éosinophiles est complétée lorsqu'il y a une interaction entre des molécules qui reconnaissent l'IL-5R (IL-3, IL-5 et GM-CSF) (Pelaia et al., 2019).

Les éosinophiles sanguins et tissulaires jouent un rôle dans la composante inflammatoire de l'asthme. À la suite d'un stimulus qui amorce la réaction inflammatoire, il y a une sécrétion de chimiokines régulatrices des éosinophiles qui recruteront ce type de cellule en provenance du sang (Figure 4) (M. W. Johansson, 2014). Les éosinophiles peuvent être recrutés par plusieurs protéines différentes, tels que les galectines et l'éotaxine. L'éotaxine est une molécule sécrétée par les lymphocytes Th2 lors d'une stimulation allergique. Cette protéine se lie aux récepteurs CCR3 exprimés à la surface des éosinophiles et permet leur recrutement au niveau des bronches (Conroy

& Williams, 2001; M. W. Johansson, 2014; Lilly et al., 1997; Ying et al., 1997). La galectine-3 se lie aux récepteurs CD66b exprimés à la surface des éosinophiles, ce qui augmente le recrutement de ces cellules sur le site inflammatoire (Rao et al., 2017). Cette liaison entraîne une adhésion cellulaire, une production de superoxydes et la dégranulation des cellules (Gao et al., 2013; Rao et al., 2017).

Lors de la dégranulation des éosinophiles, il y a libération de nombreuses protéines dites cytotoxiques, telles que la protéine basique majeure (MBP), la peroxydase des éosinophiles (EPO), la protéine cationique des éosinophiles (ECP) et la neurotoxine dérivée des éosinophiles (EDN). Les éosinophiles libèrent des cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et IL-25), ainsi que plusieurs cytokines pro-inflammatoires aiguës (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8), des chimiokines et des médiateurs lipidiques (Bloemen et al., 2007; Boonpiyathad et al., 2019; Hammad & Lambrecht, 2021). L'ensemble de ces molécules peuvent infliger des dommages aux cellules épithéliales bronchiques, augmenter la sécrétion de mucus, augmenter la perméabilité des tissus vasculaires, contribuer au remodelage des voies respiratoires, ainsi qu'à l'autostimulation de la réaction immunitaire par recrutement et activation des éosinophiles et des lymphocytes Th2 (Bloemen et al., 2007). En bref, les éosinophiles sont impliqués dans l'asthme, en jouant un rôle dans les mécanismes pathologiques qui mènent à l'hyperréactivité des bronches, à la surproduction de mucus, aux dommages de l'épithélium bronchique et au remodelage des voies respiratoires.



**Figure 4.** Mécanismes immunologiques menant à l'activation des éosinophiles dans l'asthme et à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires

L'irritant traverse l'épithélium bronchique et entraîne la sécrétion de médiateurs pro-inflammation (TSLP, IL-25, IL-33, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 et TGF- $\beta$ ) par les cellules épithéliales. Les ILC2 seront activées par les médiateurs IL-25, IL-33 et TSLP. Ce type cellulaire sécrètera des interleukines, telles que l'IL-5, qui se lieront aux récepteurs IL-5R exprimés par les éosinophiles, activant ces derniers et entraînant leur dégranulation, ce qui libère des produits des éosinophiles (MBP, EPX, EDN, ECP, TGF- $\beta$ , cysLT, GM-CSF, cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 et IL-25) et diverses chemokines (Figure réalisée avec BioRender®, 2023).

### **1.3.3 Mécanisme de remodelage des voies respiratoires**

Le remodelage des voies respiratoires est un mécanisme de modification de la composition cellulaire dans les bronches des personnes asthmatiques. L'inflammation chronique peut entraîner le remodelage des tissus bronchique au niveau de l'épithélium bronchique, du tissu interstitiel et du tissu musculaire lisse (Bergeron et al., 2010). En ce qui concerne les modifications de l'épithélium bronchique, il est possible de constater une perte de l'intégrité des cellules épithéliales par le clivage des protéines de jonction qui maintiennent la cohésion cellulaire. Cela a été observé dans des modèles murins présentant des phénotypes d'asthme éosinophilique, neutrophilique, et de granulocyte mixte (Heijink et al., 2020). Il est également possible de constater une hyperplasie des cellules à gobelets et des glandes à mucus qui complètent le tissu épithélial, augmentant ainsi la production de mucus et obstruant les voies respiratoires chez les personnes asthmatiques. (Al-Muhsen et al., 2011). Au niveau du tissu interstitiel, il y a le développement d'une fibrose sous l'épithélium bronchique. Finalement, les muscles lisses qui forment les voies respiratoires peuvent subir une hypertrophie et une hyperplasie, ce qui entraîne le resserrement des voies respiratoires et une diminution du passage de l'air (Al-Muhsen et al., 2011; Bergeron et al., 2010). Plusieurs des granules toxiques et des cytokines pro-inflammatoires qui sont sécrétées lors de l'activation et lors de la dégranulation des éosinophiles peuvent contribuer au remodelage des voies respiratoires. Il y a notamment le facteur TGF- $\beta$  qui est produit par les éosinophiles et qui joue un rôle dans l'ensemble des modifications énumérées précédemment (Halwani et al., 2011).

## 1.4 Pharmacothérapie

Malgré l'absence de traitement permanent pour guérir l'asthme, il existe tout de même certains médicaments qui permettent de contrôler les symptômes inflammatoires associés à l'asthme. À la suite d'un diagnostic d'asthme, la plupart des personnes atteintes peuvent prendre des médicaments dits d'entretien, pris sur une base régulière afin de contrôler la maladie même en absence de crise. Ces traitements peuvent être regroupés en plusieurs catégories. Il y a en premier lieu les bronchodilatateurs  $\beta_2$ -agonistes qui peuvent être à courte (BACA) ou à longue durée d'action (BALA) (Peter J. Barnes & Page, 2017). Il y a également les corticostéroïdes, le type de médicament le plus communément utilisé dans l'asthme est généralement pris en continu afin de prévenir l'exacerbation de l'asthme. Lorsque les médicaments présentés précédemment sont inefficaces, il est possible d'utiliser des bronchodilatateurs anticholinergiques à courte durée d'action ou des bronchodilatateurs antagonistes muscariniques à longue durée d'action. L'ensemble de ces bronchodilatateurs joueront un rôle dans le relâchement des muscles lisses, ce qui permet d'améliorer les fonctions respiratoires des personnes asthmatiques (Peter J. Barnes & Page, 2017). Les corticostéroïdes agissent directement sur l'inflammation des bronches en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires de l'asthme, ce qui se manifeste par une diminution des exacerbations, de l'hyperréactivité bronchique et par une amélioration de la fonction respiratoire, notamment du VEMS. Lorsque ces médicaments sont peu ou non efficaces, ils peuvent être utilisés en combinaison afin de créer une synergie médicamenteuse qui améliore leur efficacité respective. Il y a également les antagonistes des récepteurs des leucotriènes qui bloquent les récepteurs du même nom, ce qui permet le relâchement musculaire et réduit l'inflammation bronchique. Lorsque l'asthme n'est pas contrôlé, il est possible que le patient ait à utiliser des médicaments qui sont dits agents biologiques. Il s'agit de traitements par des anticorps monoclonaux dirigés contre les immunoglobulines ou les interleukines (IL4, IL-5, IL-9, etc.) qui bloquent la dégranulation des granulocytes ou empêchent l'activation des cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation de l'asthme (Peter J. Barnes & Page, 2017). Le Tableau 1 présente certains médicaments offerts pour traiter l'asthme ou qui sont en processus d'essais cliniques afin d'être prochainement utilisés. Puisque ce mémoire porte sur le rôle de l'éosinophile dans l'asthme allergique, les médicaments qui ciblent

des molécules libérées par l'éosinophile ou qui sont nécessaires à son activation (MBP, EPX, EDN, ECP, TGF- $\beta$ , cysLT, GM-CSF, cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13 et IL-25) et divers chimiokines) sont en caractères gras dans le tableau.



**Tableau 1.** Principaux médicaments utilisés pour le traitement de l'asthme (Peter J. Barnes & Page, 2017; Bordeaux, 2022)

<b>Classe de médicament</b>	<b>Médicament (Nom commercial) *</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
Bronchodilatateurs $\beta_2$ -agonistes à courte durée d'action (BACA)	Salbutamol (Airomir, Ventolin)	Stimule les récepteurs $\beta_2$ -des muscles lisses bronchiques, entraînant le relâchement des muscles bronchiques.
	Terbutaline (Bricanyl Turbuhaler)	
Bronchodilatateurs $\beta_2$ -agonistes à longue durée d'action (BALA)	Fumarate de formotérol (Oxeze, Foradil)	Stimule les récepteurs $\beta_2$ -des muscles lisses, entraînant la bronchodilatation. Médicament utilisé pour le contrôle régulier des symptômes.
	Salmétérol (Serevent)	
<b>Corticostéroïdes inhalés (CSI)</b>	Béclométhasone (QVAR)	Anti-inflammatoires qui inhibent la production des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans les mécanismes de l'asthme.
	Budésonide (Pulmicort)	
	Ciclésonide (Alvesco)	
	Fluticasone (Flovent)	
	Mométasone (Asmanex)	
<b>Combinaison de corticostéroïdes par inhalation et bronchodilatateurs <math>\beta_2</math>-agonistes à longue durée d'action (CSI + BALA)</b>	Budésonide + formotérol (Symbicort)	Mécanismes mixtes entre les BALA et les CSI.
	Salmétérol + Fluticasone (Advair)	
	Fuorate de fluticasone + vilantérol (Breo Ellipta)	
	Mométasone + formotérol (Zenhale)	
Bronchodilatateurs anticholinergiques à courte durée d'action	Ipratopium (Atrovent)	Cible les récepteurs cholinergiques des muscles lisses bronchiques, entraînant la relaxation des muscles lisses.
	Oxitropium (Oxivent)	

<b>Classe de médicament</b>	<b>Médicament (Nom commercial) *</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
<b>Bronchodilatateurs antagonistes muscariniques à longue durée d'action</b>	Tiotropium (Spiriva)	Ciblent spécifiquement les récepteurs muscariniques. Se lient aux récepteurs muscariniques des muscles lisses bronchiques et bloquent la signalisation cholinergique qui mène à la bronchoconstriction.
	Aclidinium (Tudorza Genuair)	
	Glycopyrronium (Seebri Breezhaler)	
	Uméclidinium (Incruse Ellipta)	
<b>Antagonistes des récepteurs de leucotriènes (ARLT)</b>	Montélukast (Singulair)	Cible le récepteur CysLT <sub>1</sub> et inhibe l'activité des cystéinyl-leucotriènes (LTD <sub>4</sub> > LTC <sub>4</sub> >> LTE <sub>4</sub> ), réduisant la production de mucus, la contraction des muscles lisses bronchiques et empêche les processus inflammatoires médiés par la liaison entre les leucotriènes et leur récepteur.
	Zafirlukast (Accolate)	
	Pranlukast (Onon)	
<b>Méthylxanthines</b>	Théophylline (Uniphyll)	Inhibition non sélective de phosphodiésterases sécrétés lors de l'inflammation tels que des prostaglandines et des leucotriènes, ce qui permet le relâchement des muscles lisses et la réduction des fonctions leucocytaires.
<b>Anticorps neutralisant IgE (anti-IgE)</b>	Omalizumab (Xolair)	Bloque les voies d'activation médiées par les IgE en s'y liant, formant un complexe non reconnu par les récepteurs FcεRI.
<b>Anticorps monoclonaux de l'IL-5 et l'IL-5R</b>	Mépolizumab (Nucala)	Reconnaissent l'IL-5 et empêchent sa liaison avec les récepteurs de l'IL-5 (IL-5R), surtout exprimés sur les éosinophiles.
	Reslizumab (Cinqair)	
	Benralizumab (Fasenra)	Se lient spécifiquement à la chaîne α des IL-5R, bloquant la transduction du signal lors de la sécrétion d'IL-5.
<b>Autres anticorps (IL-4, IL-13, IL-9, TNF, etc.)</b>	Dupilumab, Lebrikizumab, MED-528, infliximab, etc.	Mécanismes similaires aux inhibiteurs de l'IL-5, mais spécifiques à l'interleukine testée, ces médicaments sont en phase de test clinique.

\* Le temps d'action et d'effet peut varier en fonction de la marque

## CHAPITRE 2 – GÉNÉTIQUE DE L'ASTHME ET DU DÉCOMPTE DES ÉOSINOPHILES: LOCUS COMMUNS

L'asthme est un trait complexe, ce qui signifie que le phénotype, la sévérité et les mécanismes physiologiques impliqués dans la maladie sont influencés par des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux incluant les marques épigénétiques. Une étape importante à la compréhension de la maladie est de comprendre son mode de transmission. Afin de mieux comprendre l'impact de chacun des facteurs, plusieurs études de jumeaux ont été effectuées et ont permis d'estimer que l'héritabilité génétique de l'asthme serait entre 50 et 90 % (Augustine et al., 2022; Thomsen et al., 2010; Ullemar et al., 2016). Cette variabilité peut être expliquée par les différents phénotypes de l'asthme (Augustine et al., 2022).

De nombreuses études ont permis d'identifier des variants de susceptibilité localisés dans plusieurs gènes d'intérêts. Le *GWAS Catalog*, soit une base de données regroupant les résultats de toutes les études d'association pangénomiques, indique 2 338 associations entre l'asthme (asthme à l'enfance, asthme à l'âge adulte, asthme allergique, rhinite allergique, fonctions et capacités respiratoires, réponses aux bronchodilatateurs) et des variants génétiques différents qui ont été identifiés dans un total de 151 études (Sollis et al., 2023). Les associations faites dans les éosinophiles (décompte des éosinophiles, pourcentage des éosinophiles par rapport aux granulocytes ou aux leucocytes) regroupent 2 607 variants génétiques différents identifiés par 30 études (Sollis et al., 2023). Le Tableau 2 présente plusieurs des régions chromosomiques ayant été associées à l'asthme et aux éosinophiles, ainsi que les gènes communs qui ont été associés à ces deux conditions.

**Tableau 2.** Régions et gènes associés dans l'asthme et les éosinophiles (fait à l'aide de GWAS catalog)

Région du chromosome	# Association avec l'asthme	# Association avec les éosinophiles	Gènes communs à l'asthme et aux éosinophiles	Références de l'asthme	Références des éosinophiles
<b>6p21.32</b>	117	26	<i>HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DPB2 - HLA-DPA3, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DQB1 - MTCO3P1, HLA-DQB2 - HLA-DOB, HLA-DRA, HLA-DRA - HLA-DRB9, HLA-DRB1, HLA-DRB1 - HLA-DQA1, HLA-DRB9, MTCO3P1 - HLA-DQB3, NOTCH4 - TSBP1-AS1, TSBP1-AS1, TSBP1-AS1 - HLA-DRA, ZBTB9 - GGNBP1</i>	(An et al., 2021; Ferreira et al., 2019; A. Johansson et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Hoglund et al., 2022; Kachuri et al., 2021; Vuckovic et al., 2020)
<b>17q21.1</b>	101	16	<i>CSF3, GSDMA, IKZF3, MED24, PSMD3, ZBP2 - GSDMB</i>	(Bonnelykke et al., 2014; Zhou et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>5q31.1</b>	68	40	<i>IL 5, IRF1, IRF1-AS1, KIF3A, MIR3936HG, SLC22A4, P4HA2, RAD 50, RAPGEF6, SEPTIN8, TH2LCRR, VDAC1 - TCF7</i>	(Ferreira et al., 2019; Zhou et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2018)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>10p14</b>	66	32	<i>GATA3, KRT8P37 - CHCHD3P1, LINC 00708, LINC02676, LINC02676 - LINC00709, RNA5SP299 - LINC02676</i>	(G. Jia et al., 2022; A. Johansson et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Hoglund et al., 2022; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>9p24.1</b>	62	33	<i>ERMP1, GLDC, IL 33, JAK2, KIAA2026, RANBP6, GTF3AP1, RCL1, SELENOTP1, TPD52L3, UHRF2</i>	(G. Jia et al., 2022; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2018; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>2q12.1</b>	43	20	<i>IL18R1, IL1RL1, IL18RAP, IL1RL2, SLC9A2, SLC9A4</i>	(Adewuyi et al., 2022; Ferreira et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)

Région du chromosome	# Association avec l'asthme	# Association avec les éosinophiles	Gènes communs à l'asthme et aux éosinophiles	Références de l'asthme	Références des éosinophiles
<b>5q22.1</b>	40	12	<i>BCLAF1P1 - TSLP, TMEM232, TSLP, TSLP - WDR36, WDR36</i>	(Ferreira et al., 2019; A. Johansson et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>6p21.33</b>	35	40	<i>DHFRP2, HLA-B, FGFR3P1 - ZDHHC20P2, LINC01149 - HCP5, LINC 02571 - HLA-B, MICA, NFKBIL1, NFKBIL1 - LTA</i>	(Ferreira et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Kichaev et al., 2019; Sunadome et al., 2020; Vuckovic et al., 2020)
<b>11q13.5</b>	27	10	<i>EMSY, EMSY - LINC02757, LINC02757 - LRRC32</i>	(G. Jia et al., 2022; Pickrell et al., 2016; Pividori et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Hoglund et al., 2022; Vuckovic et al., 2020)
<b>4q27</b>	21	10	<i>ADAD1, BLTP1, IL2, IL21-AS1, RN7SL335P - BLTP1</i>	(Ferreira et al., 2019; A. Johansson et al., 2019; Sakaue et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2018)	(M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>7p21.1</b>	19	19	<i>ITGB8, ITGB8 - EEF1A1P27</i>	(Ferreira et al., 2019; Pividori et al., 2019; Sakaue et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>6p22.1</b>	17	17	<i>HLA-A, HLA-A - HLA-W, HLA-W - MICD, TRIM26, ZSCAN31</i>	(G. Jia et al., 2022; Pividori et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Sunadome et al., 2020; Vuckovic et al., 2020)
<b>8q21.13</b>	14	8	<i>RPL13AP18 - RNU6-1213P</i>	(Ferreira et al., 2019; Pickrell et al., 2016; Pividori et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Sakaue et al., 2021; Vuckovic et al., 2020)
<b>5q31.3</b>	13	14	<i>GNPDA1 - NDFIP1, NDFIP1</i>	(Ferreira et al., 2019; Y. Han et al., 2020; Wan et al., 2012; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)

Région du chromosome	# Association avec l'asthme	# Association avec les éosinophiles	Gènes communs à l'asthme et aux éosinophiles	Références de l'asthme	Références des éosinophiles
<b>12q24.31</b>	13	12	<i>CDK2AP1, PITPNM2, RPL12P33 - HNF1A-AS1, SPPL3</i>	(Ferreira et al., 2019; Y. Han et al., 2020; A. Johansson et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Sakaue et al., 2021; Vuckovic et al., 2020)
<b>2q37.3</b>	13	11	<i>ACKR3 - COPS8-DT, D2HGDH</i>	(Ishigaki et al., 2020; Park et al., 2015; Pividori et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>11q12.2</b>	10	14	<i>FADS1, FADS2, MYRF, TMEM258,</i>	(Y. Han et al., 2020; Olafsdottir et al., 2020; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>13q14.11</b>	9	22	<i>COG6, DGKH, FOXO1, LINC02341</i>	(Ferreira et al., 2019; A. Johansson et al., 2019; K. Wu et al., 2014; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>19q13.32</b>	8	30	<i>APOE, BCL3, FOXA 3, SYMPK</i>	(Adewuyi et al., 2022; Y. Han et al., 2020; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>10q21.2</b>	8	16	<i>LINC02929 - ALDH7A1P4</i>	(Ferreira et al., 2019; Y. Han et al., 2020; Sakaue et al., 2021)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Høglund et al., 2022; Vuckovic et al., 2020)
<b>2q13</b>	8	9	<i>ACOXL, MIR4435-2HG, BCL2L11</i>	(Y. Han et al., 2020; A. Johansson et al., 2019; Z. Zhu et al., 2020)	(Astle et al., 2016; M. H. Chen et al., 2020; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)
<b>1q31.3</b>	8	4	<i>ATP6V1G3 - PTPRC, PTPRC</i>	(Y. Han et al., 2020; Sakaue et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019)	(Astle et al., 2016; Kachuri et al., 2021; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020)

Les études d'association pangénomique (GWAS) permettent d'identifier des variants génétiques qui peuvent influencer le développement et l'évolution de la maladie à l'étude. L'une des limitations de ces études est l'identification précise des gènes influencés par les polymorphismes nucléotidiques associés. Ces études permettent de faire des liens statistiques entre la génétique et la maladie, sans toutefois expliquer les mécanismes d'action qui en découlent. Le mécanisme d'action des gènes peut être expliqué lors d'études fonctionnelles (Cano-Gamez & Trynka, 2020).

L'une des régions qui partage le plus de gènes communément associés à l'asthme et aux éosinophiles est la région chromosomique 17q12-21. Elle contient notamment les gènes *gasdermin B (GSDMB)* et *Ikaros family transcription factor (IKZF3)*. Des variants localisés dans le gène *GSDMB* ont été associés au décompte des éosinophiles, ainsi qu'à une augmentation de l'inflammation éosinophilique chez des enfants asthmatiques (M. H. Chen et al., 2020; Kang et al., 2012; Vuckovic et al., 2020). D'autres variants dans ce même gène ont été associés à la sévérité et à différents phénotypes de l'asthme (asthme infantile, asthme atopique et non atopique, chevauchement entre l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), etc.), et ce, dans plusieurs études (Bonnelykke et al., 2014; A. Johansson et al., 2019; Korytina et al., 2021; Pividori et al., 2019; Sakaue et al., 2021; Zhou et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020; Z. Zhu et al., 2019). Le gène *IKZF3* est également impliqué dans le décompte des éosinophiles en plus d'avoir été associé à la régulation de la migration des éosinophiles dans les tissus lors de l'inflammation (Astle et al., 2016; Felton et al., 2021; Hoglund et al., 2022; Kichaev et al., 2019; Vuckovic et al., 2020). En ce qui a trait aux associations faites avec l'asthme, ce gène a été associé à plusieurs phénotypes différents, soit l'asthme infantile, l'asthme atopique, la marche atopique et l'asthme sévère avec exacerbations (N. Shrine et al., 2019; Zhou et al., 2021; Z. Zhu et al., 2020).

Malgré les gènes associés et les nombreuses études qui ont permis de les identifier, ces gènes ne permettent d'expliquer qu'une part modeste de l'héritabilité de l'asthme. Bien que plusieurs associations pointent vers le rôle des éosinophiles dans cette pathologie, il reste beaucoup d'études à faire pour en comprendre la fonction biologique dans le contexte de la maladie. Parmi les méthodes proposées pour accroître notre compréhension de l'impact de ses associations, l'étude de l'épigénétique (longs ARN non codants, micro-ARN, méthylations, modifications des histones) offrirait

une meilleure identification de l'impact de ces variants sur l'expression des gènes (Augustine et al., 2022; Trerotola et al., 2015). L'ensemble de ces aspects devrait permettre de mieux caractériser les mécanismes de l'asthme en plus de permettre une meilleure compréhension des traitements qui doivent être utilisés pour traiter les symptômes et éventuellement conduire au développement de nouvelles thérapies dites personnalisées.



# CHAPITRE 3 - MÉCANISMES ET ÉTUDES ÉPIGÉNÉTIQUES

## 3.1 Mécanismes épigénétiques

Il est reconnu que l'environnement est impliqué dans le développement et l'incidence de l'asthme. L'environnement influence la génétique par des modifications du génome que l'on regroupe dans l'étude des mécanismes épigénétiques, entraînées à la suite de l'exposition à un stress (Feil & Fraga, 2012). Ces modifications incluent non seulement des changements qui peuvent être causés par l'environnement, mais également des modifications de l'ADN qui peuvent être transmises par les parents sur plusieurs générations (Trerotola et al., 2015). Ces marqueurs sont dynamiques dans le temps et peuvent être réversibles (Tompkins et al., 2012). L'étude de l'épigénétique de l'asthme permettra de documenter les interactions entre l'environnement et la génétique afin de mieux comprendre le rôle de chacun dans l'héritabilité de la maladie (Feil & Fraga, 2012; Trerotola et al., 2015).

L'épigénétique correspond à une modification au niveau moléculaire de l'ADN par l'ajout de molécules, sans modifier la séquence génomique. Ce type de modification regroupe les modifications des histones, ce qui comprend l'acétylation, l'ubiquitination, la méthylation et la phosphorylation de ces protéines. Il existe également les mécanismes d'action des micro-ARN (mi-ARN), des longs ARN non codants (lnc-ARN) et la méthylation de l'ADN, ce dernier type de modifications faisant l'objet de la présente étude (Y.-L. Wu et al., 2023). Ces différentes modifications influencent le niveau d'expression des gènes. L'épigénétique est un mécanisme qui est spécifique au type de cellule, et les altérations entraînent la production de protéines dans des proportions variables (Handy et al., 2011). Précisément, cela influence donc la différenciation et l'activation cellulaire ainsi que la production et la sécrétion des produits cellulaires (Etchegaray & Mostoslavsky, 2016; W. Xu et al., 2016).

La modification des histones par l'ajout d'un groupement phosphate altère la conformation de la chromatide et influence l'accessibilité de l'ADN (Rossetto et al., 2012). L'acétylation des

histones est un mécanisme qui implique l'ajout d'un radical d'acétyle sur les résidus lysine de la partie N-terminal des noyaux des histones. Ce mécanisme joue un rôle dans l'affinité entre les histones et l'ADN (P. J. Barnes et al., 2005). L'ubiquitination des histones impacte la stabilité et la production des protéines nécessaires au fonctionnement cellulaire. La monoubiquitination, soit l'ajout d'une molécule d'ubiquitine, et la polyubiquitination, qui est l'ajout en série de plusieurs ubiquitines, sont des mécanismes essentiels à la translocation des protéines, à la signalisation des dommages de l'ADN ainsi qu'à la régulation transcriptomique (Cao & Yan, 2012). La méthylation des histones influence le recrutement et la liaison des protéines régulatrices de la chromatide. L'ensemble de ces mécanismes peuvent influencer le niveau d'expression des gènes en bloquant le site de fixation lors de la transcription de l'ADN ou en impliquant des répresseurs de la transcription (Alaskhar Alhamwe et al., 2018). Ceci modifie la quantité d'ARNm, ce qui mène à la même tendance lors de la synthèse de la protéine et peut entraîner des modifications au bon fonctionnement des mécanismes fonctionnels des cellules (Etchegaray & Mostoslavsky, 2016).

Les micro-ARN ont un mécanisme d'action différent. Ces courts ARN non codants se lient à la région 3' UTR de l'ARN messager (ARNm), entraînant la dégradation de cet ARNm (Taka et al., 2020). Tout comme la modification des histones, ceci diminue la quantité de molécules produisant la protéine (W. Xu et al., 2016). Les longs ARN non codants (lnc-ARN) sont des transcrits qui ne codent pas pour des protéines et sont faiblement exprimés comparativement aux gènes codants. Les lnc-ARN agissent principalement en régulant l'expression des gènes puisque certains ont même une activité d'amplificateur. Ils peuvent également former des liaisons avec l'ADN, des protéines et d'autres ARN afin de former des complexes qui influencent les processus post-traductionnels liés à l'ARNm comme le recrutement de facteurs de transcription modifiant les histones ou modifiant l'arrangement de la chromatide, ce qui, dans l'ensemble, diminue ou amplifie la transcription des gènes d'intérêts (Mathieu et al., 2014; X. Zhu et al., 2020). La dernière marque épigénétique, la méthylation de l'ADN, sera abordée en détail dans la section suivante puisqu'elle est l'objet du présent mémoire.

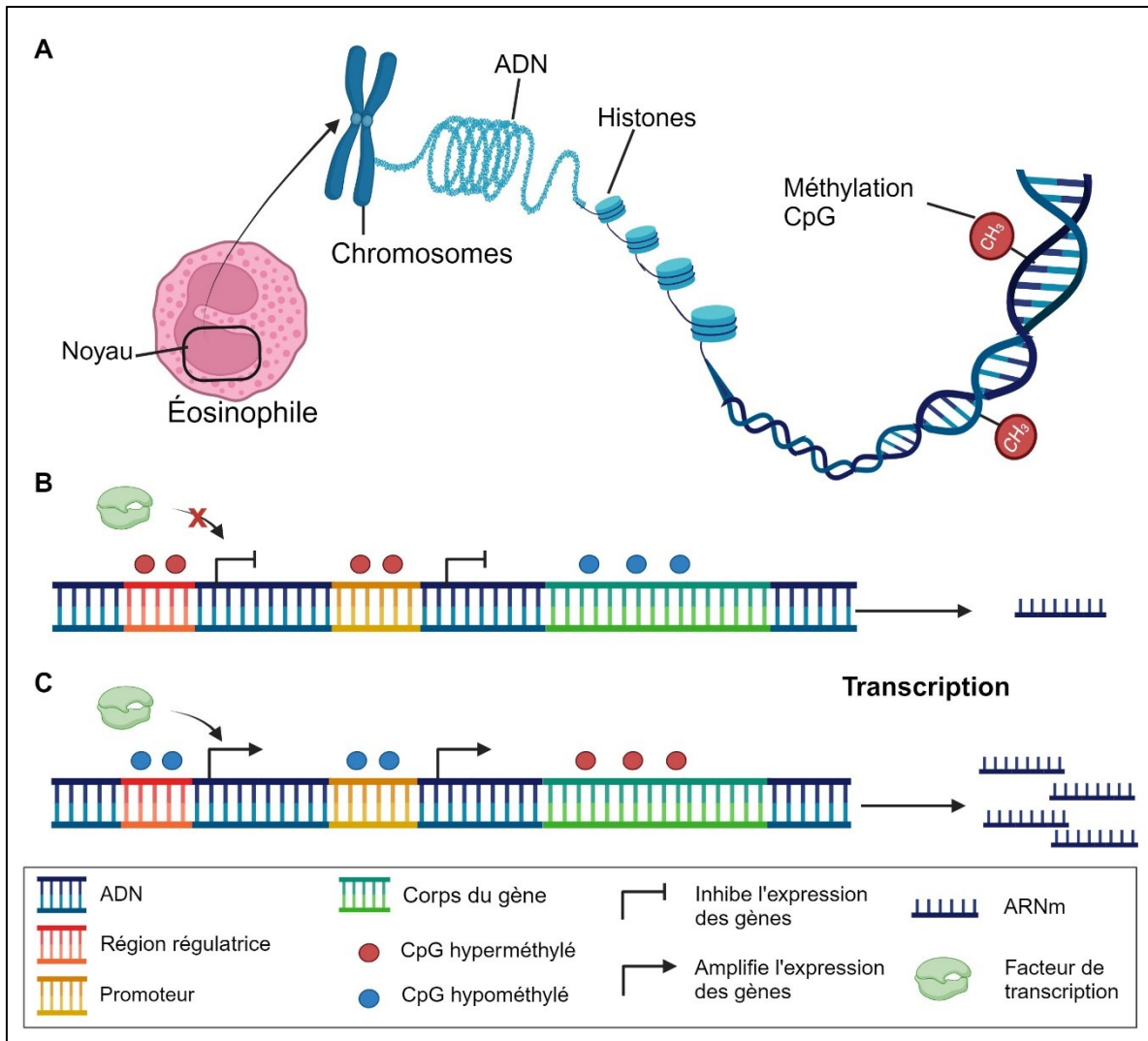
## 3.2 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un mécanisme épigénétique qui consiste en l'ajout covalent d'un groupement méthyle à certains nucléotides de l'ADN. Plus précisément, la molécule est ajoutée sur le cinquième carbone d'une cytosine (C). Ce phénomène se produit plus fréquemment lorsque la cytosine est précédée par une guanine (G), ce qui forme des sites désignés comme des CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) (Villicaña & Bell, 2021; W. Xu et al., 2016). L'ADN regroupe des régions qui sont riches en CG, portant le nom d'îlots CpG et contenant en moyenne 1 000 paires de bases (Deaton & Bird, 2011). Ces îlots sont situés dans des régions régulatrices, des promoteurs, ainsi que directement dans les gènes, ce qui suggère l'implication de la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes lors de la transcription de l'ADN en ARNm (Deaton & Bird, 2011; Durham et al., 2011; Gomez, 2019; Yang et al., 2014).

La méthylation de l'ADN est régulée par une famille de protéines du nom de méthyltransférase (DNMT). Ces protéines ont la capacité de transférer un groupement méthyle de la S-adényl-méthionine (SAM), un métabolite impliqué dans les mécanismes de méthylation, sur les cytosines de l'ADN (Moore et al., 2013). Parmi les membres de la famille des DNMT, trois catalysent directement le mécanisme de méthylation, soit DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (Jin & Robertson, 2013). La DNMT1 est caractérisée comme méthyltransférase de maintenance et elle assure la transmission de la méthylation de l'ADN d'une génération cellulaire à une autre lors de la réplication. Elle assure la méthylation lors de l'état hémiméthylé de l'ADN, soit lorsqu'un seul des deux brins est méthylé (Takehita et al., 2011). Les DNMT3a et DNMT3b sont dites des DNMT *de novo*, car elles induisent la synthèse de nouveaux sites de méthylation de l'ADN (Moore et al., 2013). Malgré cette terminologie qui divise les DNMT ayant un domaine catalytique en deux catégories, il existe des preuves d'un chevauchement dans les mécanismes fonctionnels de ces trois DNMT (Jin & Robertson, 2013).

La méthylation de l'ADN peut influencer l'expression des gènes par deux mécanismes distincts (Figure 5). L'hyperméthylation correspond à l'ajout de groupements méthyles au niveau des sites CpG. Lorsque ce processus se déroule dans la région du promoteur, il bloque l'accès aux sites

d'initiation de la transcription (TSS) de l'ADN empêchant ainsi la fixation des facteurs de transcription et nuit à la synthèse de l'ARNm (Jones, 2012). Le même phénomène de répression de l'expression des gènes peut être observé lorsque la méthylation se situe dans une région régulatrice du gène (Dhar et al., 2021). Le mécanisme inverse, soit l'hypométhylation, correspond à une diminution du niveau de méthylation. L'hypométhylation des TSS mène à une surexpression des gènes visés. En bref, le niveau de méthylation des séquences régulatrices et promotrices est inversement proportionnel au niveau d'expression des gènes (Tompkins et al., 2012). L'hypométhylation et l'hyperméthylation dans le corps d'un gène entraînent l'effet inverse à ceux précédemment abordés et le niveau de méthylation est positivement corrélé à l'expression du gène (Tompkins et al., 2012; Yang et al., 2014). Les régions amplificatrices de l'ADN sont influencées par le niveau de méthylation, ce qui mène à l'inactivation de ces régions (hyperméthylation) ou à la liaison des facteurs de transcription (hypométhylation), et par enchaînement permet l'inactivation ou l'activation de la transcription (Kreibich et al., 2023). L'impact de la méthylation dépend donc de son niveau (hyperméthylé ou hypométhylé), mais également de sa localisation dans l'ADN par rapport aux gènes impliqués (Dhar et al., 2021; Jones, 2012; Tompkins et al., 2012; Yang et al., 2014).



**Figure 5.** Méthylation de l'ADN influençant la régulation de l'expression des gènes

La méthylation de l'ADN ( $\text{CH}_3$ ), consiste en l'ajout d'un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) au niveau des cytosines précédées pas une guanine (CpG) (A). La méthylation de l'ADN régule positivement et négativement l'expression des gènes en fonction de la localisation du site méthylé par rapport au gène. L'hyperméthylation localisée dans les régions régulatrices et promotrices, ainsi que l'hypométhylation du corps du gène, inhibe l'expression génique, diminuant la quantité d'ARNm transcrit (B). À l'inverse, l'hypométhylation localisée dans les régions régulatrices et promotrices, ainsi que l'hyperméthylation du corps du gène, amplifie l'expression génique, augmentant la quantité d'ARNm transcrit (C) (Figure réalisée avec BioRender, 2023).

Ainsi, les sites CpG ont la capacité d'interagir avec les variants génétiques proches et éloignés, ce qui est associé à une augmentation de la régulation des gènes (Hawe et al., 2022). Il existe deux types d'interaction entre les variants génétiques et les sites CpG, soit les interactions en

*cis* ( $\leq$  à un million de paires de bases), et les interactions en *trans* ( $>$  à un million de paires de bases ou situés sur deux chromosomes différents) (Villicaña & Bell, 2021). La méthylation de l'ADN a été associée à de nombreuses maladies, notamment dans les mécanismes immuns de l'allergie et l'asthme (Durham et al., 2011; Larouche et al., 2018; Stefanowicz et al., 2012; Villicaña & Bell, 2021).

L'étude de la méthylation de l'ADN permet d'identifier, de documenter et de mieux comprendre la nature moléculaire influençant la biologie cellulaire qui détermine le développement des maladies à trait complexe. Cet aspect correspond à une portion importante de ces pathologies que les facteurs génétiques ne peuvent pas expliquer. Ceci appuie le rôle d'une composante environnementale dont l'influence pourrait être expliquée, du moins en partie, par l'étude de la méthylation de l'ADN (Hannon et al., 2018).

### **3.3 Revue des études de la méthylation de l'ADN associé à l'asthme**

L'étude de la méthylation de l'ADN dans l'asthme au niveau des différents types cellulaires est nécessaire afin d'améliorer la compréhension de la maladie puisque ce mécanisme est spécifique au type cellulaire (Hudon Thibeault & Laprise, 2019). Plusieurs études effectuées sur du sang complet ou des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont permis d'identifier plusieurs profils de méthylation différentielle sur des gènes impliqués dans les fonctions immunes. L'utilisation de sang complet ou de PBMC entraîne des variabilités entourant les sites identifiés, ce qui peut être expliqué par l'hétérogénéité de l'échantillon sanguin qui regroupe des lymphocytes, des monocytes, des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles (Adalsteinsson et al., 2012). De nombreuses études ont permis d'identifier plusieurs sites de méthylation associés à des phénotypes des maladies allergiques dont plusieurs de ces sites étaient localisés dans des gènes associés à la fonction immune et/ou respiratoire. Plusieurs de ces sites étaient localisés dans des gènes impliqués dans les mécanismes fonctionnels des éosinophiles. Le Tableau 3 présente plusieurs des études qui ont été menées et qui ont soit été répliquées dans une sous-population de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ, soit été ajustées au décompte des éosinophiles ou qui ont été associées à l'éosinophilie.

**Tableau 3.** Études des profils de méthylation associés à un phénotype de l'asthme et aux éosinophiles

Références, PMID	Population à l'étude	Tissu prélevé	Phénotype	# de participants totaux	# de site de méthylation associé au phénotype	# de site de méthylation associé aux éosinophiles	Méthode d'analyse impliquant les éosinophiles
(Jiang et al., 2021)	Latino-américain	Leucocytes	Asthme chez l'enfant	1 136	195	12	Comparaison avec les 14 CpG identifiés dans l'étude de Xu et ses collègues en 2018 (C. J. Xu et al., 2018)
(K. W. Kim et al., 2021)	Coréen	Tissus nasaux et sang complet	Atopie	108	13 556	24 144	Analyse de l'éosinophilie tissulaire
(Recto et al., 2023)	Caucasien	Sang complet	Concentration d'IgE sérique dans l'asthme	4 932	490	25	Ajusté au décompte des éosinophiles
(Liang et al., 2015)	Caucasien	Lymphocyte du sang périphérique	Concentration d'IgE sérique dans l'asthme	664	36	6	Réplication utilisant la cohorte familiale d'asthme du SLSJ
(C. J. Xu et al., 2018)	Caucasien	Sang complet	Asthme chez l'enfant	1 548	14	14	Réplication utilisant la cohorte familiale d'asthme du SLSJ
(C. J. Xu et al., 2021)	Caucasien	Sang complet	Asthme chez l'enfant	5 802	21	21	Réplication utilisant la cohorte familiale d'asthme du SLSJ
(Reese et al., 2019)*	Multiethnique*	Divers (PBMC, leucocytes, sang du cordon ombilical, etc.)	Asthme chez l'enfant	6 434	179	148	Réplication utilisant la cohorte familiale d'asthme du SLSJ

\* Méta-analyse impliquant diverses cohortes et divers prélèvements

Récemment, Recto et ses collègues ont identifié plusieurs sites méthylés de manière différentielle qui étaient associés aux IgE. Les cinq principaux CpG étaient situés près des gènes *NDFIP2* (*Nedd4 Family Interacting Protein 2*), *ZFPM1* (*Zinc Finger Protein, FOG Family Member 1*), *ACOT7* (*Acyl-CoA Thioesterase 7*) et *KSR1* (*Kinase Suppressor of Ras 1*). L'ensemble de ces gènes ont été associés à l'asthme ou à des fonctions immunitaires qui pourraient influencer la pathologie au niveau des mécanismes de signalisation des lymphocytes T. L'étude a également identifié 25 sites CpG ajustés au décompte des éosinophiles. De ce nombre, deux étaient proches du gène *PRKDC* (*Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Subunit*) (Recto et al., 2023). Ce gène code pour la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) qui joue un rôle dans la régulation de l'ADN du système immunitaire innée médié par les infections virales. Il a été démontré sur des modèles murins que l'inhibition de cette protéine permet de bloquer les mécanismes immuns impliqués dans l'asthme (Ghonim et al., 2015).

Une étude effectuée par Jiang et ses collègues a permis d'associer un site CpG, proche du gène *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase ID (CAMK1D)*, au phénotype de l'asthme infantile. Ce gène avait été associé à la régulation de la fonction des granulocytes ainsi qu'à la MPOC (Jiang et al., 2021). Une étude de Won Kim et ses collègues a également permis d'associer ce gène à une méthylation accrue ainsi qu'à une éosinophilie tissulaire lors de l'inflammation allergique (K. W. Kim et al., 2021).

Une étude effectuée par Liang et ses collègues a également permis d'identifier des sites CpG différemment méthylés et ayant une association avec la concentration d'IgE. À l'aide d'une étude d'association épigénomique, ils ont constaté des niveaux de méthylation moins élevés chez les individus ayant des concentrations élevées d'IgE. Ils ont identifié plusieurs sites de méthylation localisés dans des gènes codants pour des protéines spécifiques aux fonctions et/ou aux produits des éosinophiles (*IL5RA*, *CCR3*, *IL1RL1*, *PGR2*, *PGR3* et *GATA1*). Cette étude a permis d'appuyer le rôle des lymphocytes T et B dans la régulation des IgE, ainsi que celui des éosinophiles. Les niveaux de méthylation des sites CpG associés aux IgE étaient plus bas dans les éosinophiles que dans les autres types de cellules immunitaires (Liang et al., 2015).



Xu et ses collègues ont effectué deux études d'association épigénétique à l'échelle du génome, faites respectivement en 2018 et 2021, sur les profils de méthylation de l'asthme infantile et de l'allergie infantile. Les résultats obtenus durant la première étude ont permis d'associer 14 sites CpG au phénotype. Les niveaux de méthylation dans les éosinophiles isolés des individus asthmatiques étaient inférieurs par rapport à ceux des individus non asthmatiques, soutenant ainsi les observations faites par Liang et ses collègues (C. J. Xu et al., 2018). La seconde étude a permis d'identifier 21 sites CpG différemment méthylés et associés à l'allergie, cette maladie étant définie par l'un des phénotypes suivants : l'asthme, la rhinite et/ou l'eczéma. Les 21 sites CpG ont été répliqués dans des échantillons d'éosinophiles isolés de 24 participants de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ. Les sites de méthylation cg11699125, associé à l'asthme infantile (C. J. Xu et al., 2021), et cg21220721, associé à la concentration d'IgE sérique dans l'asthme (Recto et al., 2023), sont tous deux localisés dans le gène *ACOT7* et avaient déjà été associés à la sensibilisation allergique durant l'adolescence (H. Zhang et al., 2019). Reese et ses collègues ont également identifié des sites de méthylation associés à l'asthme durant l'enfance, dont les deux sites abordés précédemment (cg11699125 et cg21220721) ainsi que plusieurs autres localisés dans des gènes impliqués dans les mécanismes immunitaires des éosinophiles (*EPX*, *IL-5RA*, *PRG2*, etc.) (Reese et al., 2019).

Plusieurs des études abordées précédemment ont répliqué leurs résultats en utilisant des données provenant d'individus de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ, qui sera la cohorte étudiée dans la présente étude (Liang et al., 2015; Reese et al., 2019; C. J. Xu et al., 2021; C. J. Xu et al., 2018). Ces multiples recherches soutiennent le rôle de la méthylation de l'ADN dans le phénotype et le développement de l'asthme. Ces marqueurs épigénétiques ont un potentiel en tant que nouvelles cibles thérapeutiques qui pourraient agir en régulant l'expression des gènes.

# CHAPITRE 4 – Eosinophil DNA methylation profile in asthma: Unraveling asthma's epigenetic landscape

**Rébecca Dionne-Gagné<sup>1,2</sup>, Anne-Marie Madore<sup>1,2</sup>, Anne-Marie Boucher-Lafleur<sup>1,2</sup>, Tomi Pastinen<sup>3</sup>, Catherine Laprise<sup>1, 2,4\*</sup>**

<sup>1</sup>Département des sciences fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada

<sup>2</sup>Centre intersectoriel en santé durable, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, QC, Canada

<sup>3</sup>Genomic Medicine Center and Children's Mercy Research Institute, Kansas City, MO, United States.

<sup>4</sup>Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du Saguenay–Lac-Saint-Jean, Saguenay, QC, Canada.

Corresponding author\*:

Catherine Laprise, Ph.D. (ORCID: 0000-0001-5526-9945)

Université du Québec à Chicoutimi

555 Boulevard de l'Université, Saguenay, QC G7H 2B1, Canada

Phone: 418 545-5011 ext. 5659

Fax: 418 615-1203

E-mail: [catherine.laprise@uqac.ca](mailto:catherine.laprise@uqac.ca)

## 4.1 Avant-propos

**Remerciements** : Nous tenons à remercier les participants de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ pour leur précieuse participation à cette étude.

**Contributions des auteurs** : R. D.-G. : génération du modèle statistique, analyses, interprétation des données, rédaction du manuscrit; A-M.B.L. : acquisition de données; A-M.M. : révision des analyses et révision du manuscrit; T.P. : co-chercheur principal; C.L. : a conçu, construit et dirige la cohorte du

SLSJ; a conçu l'étude, a dirigé l'analyse des données, la rédaction et la révision du manuscrit menant à sa publication. Tous les auteurs ont approuvé la version finale.

Financement : R. D.-G. a été soutenu par une bourse de formation de maîtrise du Fonds de recherche du Québec–Santé (FRQS) et par un complément de bourse du Regroupement intersectoriel de recherche en santé de l'Université du Québec (RISUQ).

Ce projet a été soutenu par des subventions de fonctionnement des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC, PI : C.L.). C.L. est directrice du Centre intersectoriel en santé durable, codirectrice de l'axe déterminants biologiques de la santé du Réseau AIRS, investigatrice de l'étude CHILD, membre du consortium international en allergies alimentaires (InFAC) et titulaire de la Chaire de recherche du Canada en génomique de l'asthme et des maladies allergiques ([www.chairs.gc.ca](http://www.chairs.gc.ca)) et co-titulaire de la Chaire de recherche en santé durable du Québec (Chaire FRQS : <https://chairesantedurable.ca/>).

Intérêts concurrentiels : Les auteurs n'ont aucun intérêt concurrentiel à déclarer.

Informations supplémentaires : Cet article a du matériel supplémentaire, il est retrouvé à l'Annexe 1.

## 4.2 Résumé

L'asthme est causé par des facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. Les éosinophiles sont des cellules pro-inflammatoires qui contribuent à l'inflammation asthmatique. Quelques études ont identifié des profils de méthylation des éosinophiles dans l'asthme en utilisant des puces de méthylation. Dans cette étude, nous avons déterminé le profil de méthylome des éosinophiles dans l'asthme en utilisant une approche de séquençage chez un grand nombre d'individus asthmatiques. Une étude d'association épigénomique (EWAS) a été réalisée sur 183 échantillons d'éosinophiles provenant de la cohorte familiale d'asthme de Saguenay–Lac-Saint-Jean en utilisant un panneau de séquençage personnalisé ciblant les régions régulatrices immunitaires (4 609 564 sites CpG). Pour les analyses des loci de traits quantitatifs de méthylation (mQTL), les génotypes utilisés provenaient des puces Illumina 610Quad BeadChips et de l'étape d'imputation ultérieure (7 829 429 variantes génétiques). Pour les analyses de loci de traits quantitatifs d'expression (eQTL), les données d'expression des gènes ont été obtenues par séquençage RNA (17 513 gènes). Deux sites CpG, dans *MAEA* et *SLC9A2*, ont montré des associations significatives,

et cinq sites CpG ont montré des associations suggestives avec le phénotype asthmatique. Les gènes proximaux des deux CpG significatifs ont des fonctions liées aux réponses immunitaires. Ils étaient également associés à 229 variants dans les *cis*-mQTL et 30 variants dans les *trans*-mQTL. Les analyses de loci de traits quantitatifs d'expression (eQTL) ont identifié trois *cis*-eQTL et 714 *trans*-eQTL pour respectivement deux et 55 gènes exprimés. En intégrant les analyses de mQTL et eQTL avec les sites de méthylation de l'ADN identifiés par l'EWAS dans une population asthmatique, nous avons identifié deux sites CpG significatifs et trois des cinq CpG suggestifs, indiquant des gènes potentiellement impliqués dans l'asthme. De plus, plusieurs mécanismes génétiques ont été présentés pour expliquer ces associations, mettant en évidence le rôle possible du site CpG Chr1:6 267 177 et des gènes associés à travers l'analyse des QTL (*ELN*, *LIMK1* et *GNAQ*) dans l'asthme à travers les fonctions des éosinophiles.

**Mots clés :** Asthme, méthylation de l'ADN, éosinophile, étude d'association à l'échelle du génome épigénétique, loci de traits quantitatifs de méthylation, séquençage ciblé au bisulfite.

### 4.3 Abstract

Asthma is caused by environmental, genetic, and epigenetic factors. Eosinophils are pro-inflammatory cells that contribute to asthmatic inflammation. A few studies have identified eosinophil methylation profiles in asthma using methylation microarrays. In this study, we determined the eosinophil methylome profile in asthma using a sequencing approach in a large number of asthmatic individuals. An epigenome-wide association study (EWAS) was performed on 183 eosinophil samples from the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma family cohort using a custom sequencing panel targeting immune regulatory regions (4,609,564 CpG sites). For methylation quantitative trait loci (mQTL) analyses, genotypes used were from Illumina 610Quad BeadChips and subsequent imputation step (7,829,429 genetic variants). For expression quantitative trait loci (eQTL) analyses, gene count expression used were obtained from RNA sequencing (17,513 genes). Two CpG sites, in *MAEA* and *SLC9A2*, showed significant, and five CpG sites showed suggestive associations with the asthma phenotype. Proximal genes of the two significant CpGs have functions linked to immune responses.

They were also associated with 229 variants in *cis*-mQTL and 30 variants in *trans*-mQTL. Expression quantitative trait loci (eQTL) analyses identified three *cis*-eQTLs and 714 *trans*-eQTLs associations for respectively two and 55 expressed genes. By integrating mQTL and eQTL analyses with DNA methylation sites identified through EWAS in an asthma population, we identified two significant CpG sites and three of the five suggestive CpGs pointing to potential genes involved in asthma. Moreover, several genetic mechanisms were presented to explain these associations, highlighting the possible role of CpG site Chr1:6,267,177 and the genes associated through QTL analysis (*ELN*, *LIMK1* and *GNAQ*) in asthma through eosinophil functions.

**Keywords:** Asthma, DNA methylation, Eosinophil, Epigenome-wide association study, Methylation quantitative trait loci, Targeted bisulfite sequencing.

## 4.4 Abbreviations

*ABCA11P*: ATP Binding Cassette Subfamily A Member 11

*AJAP1*: adherens junctions associated protein 1

*AUTS2*: activator of transcription and developmental regulator AUTS2

*BMPR2*: bone morphogenetic protein receptor type 2

*CCDC148*: coiled-coil domain containing 148

*COL22A1*: collagen type XXII Alpha 1 chain

*CNTN5*: contactin 5

COPD: chronic obstructive pulmonary disease

CpG: cytosine-phosphate-guanine

*CRIM1-DT*: CRIM1 divergent transcript

*DLGAP4*: DLG associated protein 4

*DUSP1*: dual specificity phosphatase 1

*EFNA5*: ephrin A5

*ELN*: elastin

eQTL: expression quantitative trait locus

*ERGIC1*: endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment 1

EWAS: Epigenome-wide association study

FDR: false discovery rate

FEV1: forced expiratory volume in 1 sec

*FGFRL1*: fibroblast growth factor receptor like 1

FVC: forced vital capacity

Gαq: alpha Q subunit of the G protein

*GATA3*: GATA binding protein 3

*GNAQ*: G protein subunit Alpha Q

*GRIK3*: glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3

*HEY1*: Hes related family BHLH transcription factor with YRPW motif 1

*HS6ST3*: heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3

IgE: immunoglobulin E

IL: interleukin

*INTS5*: integrator complex subunit 5

JNK: c-Jun N-terminal kinases

*LIMK1*: LIM Domain Kinase 1

*LINC*: long intergenic non-protein coding RNA

*LINGO2*: leucine rich repeat and Ig domain containing 2

*MAEA*: macrophage erythroblast attacher, E3 ubiquitin ligase

MCPIP1: monocyte chemotactic protein-induced protein 1

*MEPCE*: methylphosphate capping enzyme

*MFSD9*: major facilitator superfamily domain containing 9

MOBP: myelin associated oligodendrocyte basic protein

mQTL: methylation quantitative trait locus

*NBAS*: NBAS subunit of NRZ tethering complex

NF-κB: transcription nuclear factor-κB

NHE2: sodium-exchanger 2 protein

*NPHP4*: nephrocystin 4

*OR4E1*: olfactory receptor family 4 subfamily E member 1

*PDIA6*: protein disulfide isomerase family A member 6

*PTPRC*: protein tyrosine phosphatase receptor type C

*RNF207*: ring finger protein 207

*RNF212*: ring finger protein 212

*RPS21*: ribosomal protein S21

*SLC35B3*: solute carrier family 35 member B3

*SLC7A1*: solute carrier family 7 member 1

*SLC9A2*: solute carrier family 9 member A2

*SMC2*: structural maintenance of chromosomes 2

*STK10*: serine/threonine kinase 10

*TMED11P*: transmembrane P24 trafficking protein 11

*TMEM182*: transmembrane protein 182

*TNFRSF25*: tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12

*UBL3*: ubiquitin like 3

*VWC2*: Von Willebrand factor C domain containing 2

Wnt: Wingless/Integrated

*ZC3H12A*: zinc finger CCCH-type containing 12A

*ZCWPW1*: zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1

*ZNF141*: zinc finger protein 141

*ZNF721*: zinc finger protein 721

*ZPLD1*: zona pellucida like domain containing 1

## 4.5 Introduction

Asthma is a chronic respiratory disease caused by the interaction of genetic and environmental factors and is mediated by several processes, including epigenetics<sup>1</sup>. Asthma affects more than 300 million people worldwide, and its prevalence has increased in recent decades. In 2019, the World Health Organization estimated approximately 455,000 asthma-related deaths worldwide<sup>2</sup>. The clinical manifestations of asthma include bronchial hyperresponsiveness, excessive mucus production, bronchoconstriction, inflammation, and airway remodeling<sup>3,4</sup>. During the inflammatory process, several immune cells, including mastocytes, lymphocytes, dendritic cells, neutrophils, and eosinophils, are mobilized and interact via the production of inflammatory mediators<sup>5</sup>.

Eosinophils are leukocytes required for type 2 (T<sub>H</sub>2) immune responses during asthmatic inflammation<sup>6</sup>. Their number is higher in asthmatic peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid than in healthy individuals<sup>4</sup>. Eosinophils are activated by interleukin (IL)-5 secreted by T<sub>H</sub>2 cells. Once activated, they release cytotoxic granule proteins, such as major basic protein, eosinophil peroxidase, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin, which can lead to continued damage to lung cells during chronic airway inflammation<sup>5</sup>. They also release T<sub>H</sub>2 cytokines like IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, and IL-25, as well as, acute pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha, IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8<sup>7</sup>. These molecules alter lung functions and exacerbate asthma severity<sup>8</sup>. Therefore, it is necessary to have a better assessment of the mechanisms and functions of eosinophils that influence asthma development. Estimates of asthma heritability are variable, ranging from 50 to 90%<sup>9-12</sup>. Given the known significant influence of environmental factors on asthma manifestation, investigating the epigenetic mechanisms is a promising avenue to understand asthma pathogenesis.

Methylation is the most studied epigenetic mechanism that plays a central role in the regulation of gene expression. It involves the transfer of a methyl group onto the C5 position of a cytosine pyrimidine, usually followed by a guanine; this is called a cytosine-phosphate-guanine (CpG) site<sup>13-15</sup>. Few studies have assessed whether methylation is altered in the eosinophils of patients with asthma<sup>16-20</sup>. These studies used microarray data from the same 24 eosinophil samples from the



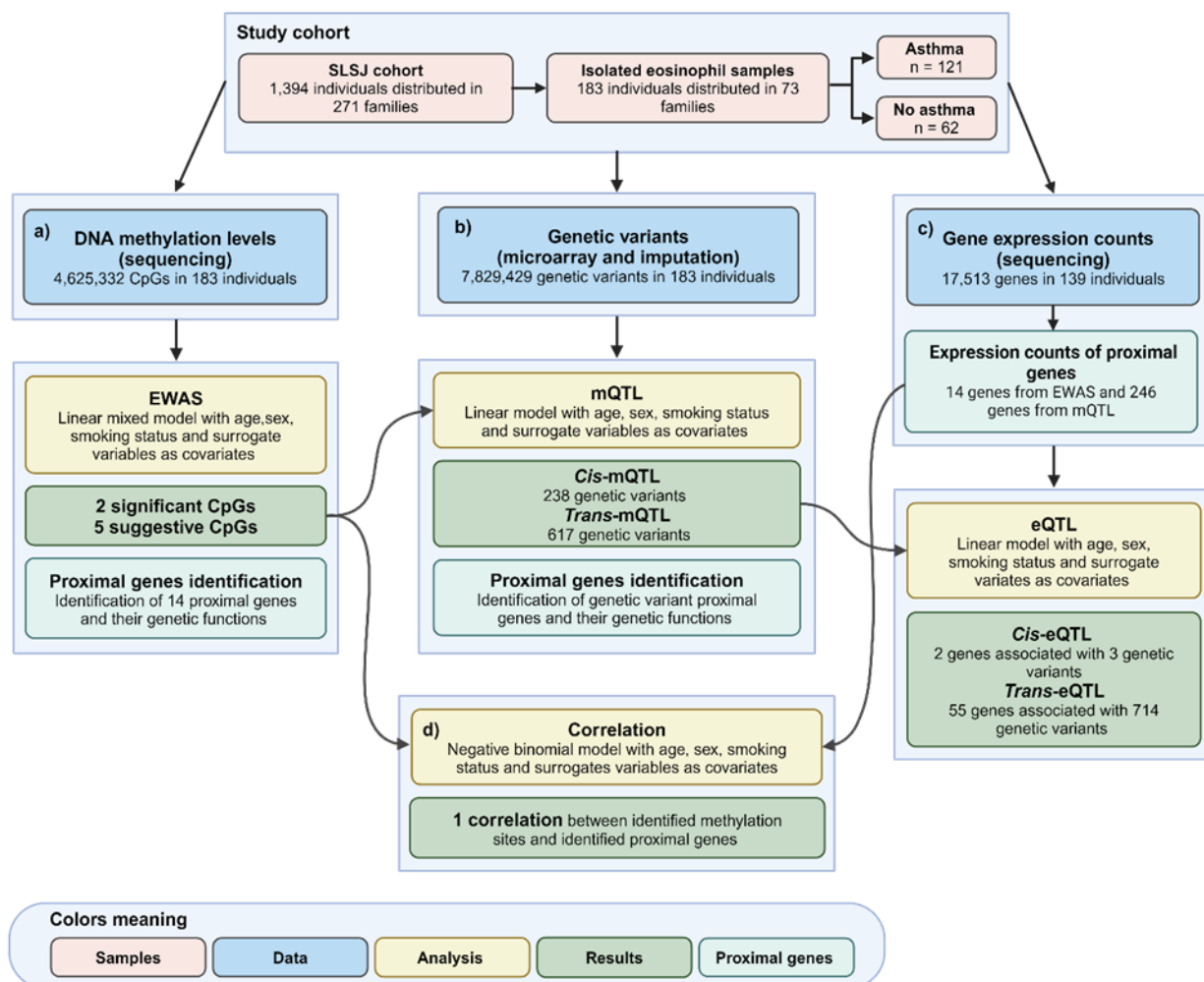
Saguenay–Lac-Saint-Jean (SLSJ) asthma family cohort to validate results previously obtained from blood samples. Liang et al. identified 36 CpGs associated with serum immunoglobulin E (IgE) levels. Those were mostly located in genes encoding proteins characteristic of eosinophils<sup>17</sup>, highlighting the importance of eosinophils in driving epigenetic signals in whole blood and leading to their validation in eosinophil samples. Similar findings were observed in four other studies investigating the associated CpGs, and all or a large proportion of them were validated in eosinophil samples<sup>16,18-20</sup>. Only one study included sequencing data from eosinophil samples and focused on a specific region in the 17q12-21 locus<sup>21</sup>.

Previous studies on the methylome of eosinophils have targeted a limited number of CpG sites using microarray technology in a limited number of samples. Almost all significant associations found in whole blood samples were driven by eosinophils. Moreover, these validation studies focused only on CpGs identified in whole blood. A more complete methylome analysis is required to better understand the role of eosinophils in asthma. This study established the methylome of eosinophils using a large number of asthmatic and non-asthmatic individuals and a custom sequencing panel targeting immune regions across the whole genome. Genomic and transcriptomic data from the same samples were used to understand the genetic mechanisms underlying the identified associations.

## 4.6 Methods

### Study Cohort

The SLSJ asthma family cohort consists of a founder effect French-Canadian population. A complete description of the recruitment and clinical evaluation that began in 1997 is detailed by Laprise et al<sup>23</sup>. The cohort consisted of 1,394 individuals distributed across 271 multigenerational families from the SLSJ region (Québec, Canada). Families were included in the study based on probands identified as having allergic asthma. The overall and respiratory health of the participants were assessed using a standardized questionnaire and pulmonary function tests in line with the American Thoracic Society guidelines<sup>24</sup>. Asthma phenotype was defined as a present or past documented clinical history of asthma. From the SLSJ asthma cohort, 209 individuals were recruited for a new sampling to perform eosinophil isolation from whole blood. Among these, methylation and genotypic information were available for 183 individuals distributed in 73 families, and expression data were available for 139 of them (**Table 4**)<sup>25</sup>. **Figure 6** presents the complete analyses design of the study. The *Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux du SLSJ* ethics committee approved the study (project #0002-001 and #2015-035) and all individuals provided informed consent.



**Figure 6.** Overview of the statistical analyses of the study and their results. a) An epigenome-wide association study (EWAS) was first performed using a targeted sequencing panel to identify associated cytosine-phosphate-guanine (CpG). b) Methylation quantitative trait loci (mQTL) between those CpG and genotypes from microarray and imputation data was then performed to assess genetic variants influencing methylation levels of identified sites. c) Using expression counts from RNA sequencing for the proximal genes identified in EWAS and mQTL analyses as well as genotypes of the genetic variants identified in mQTL analysis, expression quantitative trait loci (eQTL) were performed to study genetic variants influence on gene expression count of proximal genes. d) Finally, correlation analysis between methylation levels of associated CpGs and gene expression counts of proximal genes were performed.

**Table 4.** Phenotypic characteristics of individuals with methylation and gene expression data from eosinophil samples

	DNA methylation			Gene expression		
	All participants (n =183)	Asthma (n=121)	No asthma (n=62)	All participants (n =139)	Asthma (n=91)	No asthma (n=48)
<b>M:F ratio</b>	1:1.01	1:1.2	1:0.72	1:1.01	1:1.17	1:0.78
<b>Age, mean (range)</b>	48 (18-81)	45 (18-79)	55 (24-81)	46 (18-81)	42 (18-71)	53 (24-81)
<b>Age, median</b>	50	43	59	47	36	59
<b>Asthma, n (%)<sup>a</sup></b>	121 (66)	121 (100)	0 (0)	91 (65)	91 (100)	0 (0)
<b>Allergy, n (%)<sup>b</sup></b>	158 (86)	112 (93)	46 (74)	120 (86)	83 (91)	37 (77)
<b>FEV<sub>1</sub>, mean (SD)<sup>c</sup></b>	93.4 (18.6)	88.9 (18.4)	102.5 (15.6)	93.2 (19.2)	88.5 (19.0)	102.5 (16.3)
<b>PC<sub>20</sub>, mean (SD)<sup>c</sup></b>	6.7 (6.1)	3.4 (5.7)	24.5 (2.9)	6.8 (5.6)	3.5 (5.1)	24.1 (3.0)
<b>IgE, µg/L, mean (SD)<sup>c</sup></b>	143 (4.7)	201 (4.8)	74 (3.6)	160 (4.8)	223 (4.9)	86 (3.6)
<b>Smoking Status</b>						
No-smoker, n(%)	90 (49)	65 (54)	25 (40)	73 (52)	52 (57)	21 (44)
Smoker, n(%)	16 (9)	10 (8)	6 (10)	15 (11)	10 (11)	5 (10)
Ex-smoker, n(%)	77 (42)	46 (38)	31 (50)	51 (37)	29 (32)	22 (46)
<b>Total cells count (10x9 cells/L)</b>						
Eosinophils, mean (SD)	0.24 (0.24)	0.28 (0.26)	0.10 (0.07)	0.26 (0.25)	0.30 (0.27)	0.13 (0.05)
Lymphocytes, mean (SD)	1.89 (0.48)	1.95 (0.50)	1.72 (0.42)	1.87 (0.37)	1.87 (0.41)	1.88 (0.28)
Monocytes, mean (SD)	0.51 (0.20)	0.54 (0.20)	0.42 (0.16)	0.54 (0.19)	0.56 (0.21)	0.48 (0.13)
Neutrophils, mean (SD)	3.71 (0.93)	3.72 (0.96)	3.68 (0.95)	3.63 (0.90)	3.62 (1.00)	3.68 (0.61)
Basophils, mean (SD)	0.005 (0.022)	0.007 (0.026)	0 (0)	0.006 (0.023)	0.008 (0.028)	0 (0)

Percentages were calculated considering the total available data for each characteristic only (excluding missing values). <sup>a</sup>Present or past documented clinical history of asthma. <sup>b</sup>Defined as at least one positive response on skin prick testing (wheal diameter ≥ 3 mm of negative control at 10 min). <sup>c</sup>Geometric mean and standard deviation (SD) calculated for immunoglobulin (Ig)E and provocative concentration for a 20% decrease in forced expiratory volume in 1 sec (FEV1) (PC20). Abbreviations: F, female; M, male; FVC, forced vital capacity.

### **Isolation of eosinophils and extraction of DNA and RNA samples**

Eosinophils were isolated from 200 mL of blood samples from 209 individuals as previously described<sup>26,27</sup>. For a complete description of the methods used in this study, refer to Madore et al. 2020<sup>21</sup>. Briefly, the method used was a combination of density gradient and negative selection with anti-CD16 microbeads and, in some cases, anti-CD3 and anti-CD19 microbeads (if > 10% contamination with monocytes; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). A proportion of cells ( $1.00E-06$ ) was snap-frozen until DNA extraction, and the same quantity was suspended in TRIzol for RNA extraction. According to the manufacturer's instructions, DNA and RNA were extracted from eosinophils using the DNeasy Blood & Tissue Kit and RNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada).

### **Determination of DNA methylation levels**

Methylation levels were measured using a custom methyl capture panel that targets the regulatory regions of immune cells<sup>28,29</sup>. The panel covered 4,609,564 CpGs in 822,884 regions which corresponds to 119,089,296 bp sequenced<sup>29</sup>. A complete description of the sequencing procedure has been published by Madore et al. 2020<sup>21</sup>. Sequencing was performed on an Illumina HiSeq 4000 System (Illumina, San Diego, CA, USA), using 100 bp paired-end sequencing.

Targeted bisulfite sequencing reads were aligned to the human genome reference hg19 using the Epigenetics Pipeline available from the DRAGEN Bio-IT Platform (Edico Genomics/Illumina, San Diego, CA, USA)<sup>21</sup>. CpGs that overlapped with genetic variants (from dbSNP 151), the DAC Blacklisted Regions, or Duke Excluded Regions (from the ENCODE project) were excluded. CpGs with less than five reads as well as those located out of the regions targeted by the custom panel (regions  $\pm$  100 bp) were also removed. Only samples with over 1.5 M CpGs, as well as CpGs with data for more than 120 of these samples, were retained for analysis. After filtering and considering the buffer zone of  $\pm$  100 bp around each targeted region, data from 183 eosinophil samples and 4,625,332 CpGs were retained. Methylation levels were calculated by dividing the total number of non-converted C reads (both forward and reverse) by the total number of reads (in both directions).

### **Determination of gene expression counts**

RNA sequencing was performed at McGill University and the G enome Qu ebec Innovation Centre, as described by Madore et al<sup>21</sup>. A 100 bp paired-end sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2000 System (Illumina, San Diego, CA, USA). The reads were aligned to the human genome reference hg19. UCSC gene counts were obtained using HTSeq-count (v.0.6.1)<sup>30</sup>. Genes with ten or more counts considering all samples were retained for analysis. After quality control filtering, transcriptomic data were obtained for 139 eosinophil samples and 17,513 genes.

### **Genetic data**

Genotype data of all 183 individuals with eosinophil samples was obtained using the Illumina 610K Quad array (Illumina, San Diego, CA, USA)<sup>23</sup>. They also fulfilled the following quality criteria for inclusion in genotype imputation: minor allele frequency  $\geq 1\%$ , p-value for Hardy-Weinberg equilibrium  $\geq 1E-05$ , and genotype and individual call rates  $\geq 95\%$ . Pre-phasing was performed with Shapeit2 Software using the duoHMM method, which considers pedigree information in haplotype estimation<sup>31</sup>. Imputation was then performed using Impute2 Software<sup>32</sup>, with the 1,000 Genome Project<sup>33</sup> and the UK10K databases as reference samples. Only the imputed data that met the same quality criteria as the microarray genotypes and had a quality score for imputation of 90% were included in the analyses. After filtering, 7,829,429 genetic variants were included.

### **Epigenome-wide association study**

The association between methylation levels and asthma was assessed using a linear mixed-effects model with the Kenward-Roger method for degrees of freedom approximation<sup>34</sup>. Arcsine square root-transformed methylation levels were used as the dependent variable, and asthma as the independent variable. The fixed effects included age at sampling, sex, smoking status (ever or never smoker), and five surrogate variables to consider unknown confounding factors. Families were used as random variables. These analyses were conducted using R (v4.2.1) and the R package LmerTest (v3.1.3)<sup>34</sup>. QQ-plot and Manhattan plots were created using the R package qqman (v0.1.9)<sup>35</sup>. The threshold for genome-wide significance was set to  $P < 5E-08$  and the suggestive threshold to  $P < 1E-$

06. Violin plots were generated using the R package ggplot2 (v3.5.0)<sup>36</sup> for significant CpG sites to present the methylation level distribution of asthmatic and control individuals in the study cohort.

### **Methylation quantitative trait locus analysis**

To determine whether genetic variants influence methylation levels, methylation quantitative trait locus (mQTL) analysis was conducted to determine the associations between CpGs associated with asthma and genetic variants in eosinophils. The mQTL analyses were performed using the MatrixEQTL package (v2.3) in R<sup>37</sup> with the same covariates as for the epigenome-wide association study (EWAS). Both *cis*- (< 1.00E06 bp) and *trans*-effects ( $\geq 1.00E06$  bp) were considered using the false discovery rate (FDR) threshold ( $FDR \leq 0.05$ ). Violin plots were generated using the R package ggplot2<sup>36</sup> to visualize the distribution of methylation levels by genotypes of associated genetic variants. Those figures were made for significant mQTLs that includes genetic variants already reported in the literature for their link with asthma or allergic diseases.

### **Expression quantitative trait locus analysis**

To determine whether genetic variants identified during mQTL influence expression levels of proximal genes identified in EWAS (nearest upstream and downstream genes of associated CpGs) and mQTL analyses (nearest genes of associated genetic variants), expression quantitative trait locus (eQTL) analysis was conducted. The eQTL analyses were performed using the same package, covariates, distances, and FDR threshold as the mQTL previously described. Gene expression counts were normalized to library size and log2-transformed using the DESeq2 package (v1.44.0)<sup>43</sup>.

### **Correlation analysis between methylation levels and expression counts**

The association between methylation of asthma-associated CpGs and gene expression data from eosinophil samples were evaluated to determine whether differentially methylated CpGs influence the expression of the proximal genes identified in EWAS and mQTL analyses. Gene expression counts were normalized to library size and log2-transformed using the DESeq2 package<sup>43</sup>, whereas methylation levels were subjected to an arcsine square root transformation. The correlation between gene expression counts and methylation levels was evaluated using Pearson's correlation and a negative binomial model considering the same covariates as for EWAS<sup>44</sup>. The

criteria to screen out the significant correlations were defined as the absolute value of correlation coefficient ( $r$ )  $> 0.3$  and  $FDR \leq 0.05$ . The relationship between each CpG-gene pair was independently evaluated.

### **Gene annotation and pathway enrichment analysis**

The genetic functions of all proximal genes identified from EWAS, *cis*-mQTL, and *trans*-mQTL results were classified using the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER 17.0) classification system<sup>45</sup>, GeneCards<sup>46</sup> and g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and a gene identifier mapping classification system<sup>47</sup>. The gene ontology (GO) enrichment analysis and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using g:Profiler. The significant GO terms classified in the three categories named biological process (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF), were determined using multiple testing correction based on the false discovery rate ( $FDR \leq 0.05$ )<sup>48</sup>.

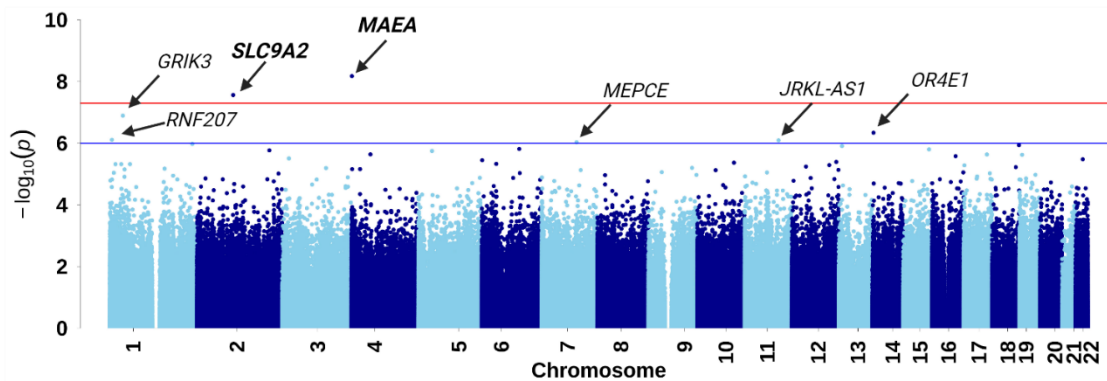
## **4.7 Results**

### **Association between methylation and asthma**

The purpose of this study was to identify the methylome profile of eosinophils associated with asthma and describe the potential genetic mechanisms behind those associations using the samples from the SLSJ asthma family cohort. Through the EWAS, we found a significant association ( $P < 5E-08$ ) between asthma and two CpGs. Moreover, five CpGs with  $P$ -values between  $1E-06$  and the genome-wide cut-off showed suggestive association (**Table 5, Figure 7**). Proximal genes on both sides of each CpG were identified, and these genes' functions and biological pathways were identified. Significant CpG sites were both localized in a gene's body. The first significant CpG (Chr4:1,320,665) was in the gene macrophage erythroblast attacher, E3 Ubiquitin Ligase (*MAEA*), and the second (Chr2:103,279,574) was in the solute carrier family 9 member A2 (*SLC9A2*). The distribution of methylation levels for these two CpG sites according to the asthma phenotype is shown in **Figure 8**. The methylation levels for the CpG on Chr4:1,320,665 were higher in asthmatic



individuals than in controls, and methylation levels for the CpG on Chr2:103,279,574 were lower in asthmatic individuals than in controls. Three of the five CpG sites with suggestive associations were located in the gene bodies of glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 3 (*GRIK3*), ring finger protein 207 (*RNF207*), and methylphosphate capping enzyme (*MEPCE*). The other two suggestive CpGs were localized in intergenic regions, with the closest genes being JRKL antisense RNA 1 (*JRKL-AS1*) and olfactory receptor family 4 subfamily E member 1 (*OR4E1*). The CpGs were respectively at 897,344 bp and 251,477 bp from the 5' end of these genes. Considering both upstream and downstream nearest genes of each CpG (n=14), six genes (*MAEA*, *SLC9A2*, *GRIK3*, *ZC3H12A*, *ZCWPW1*, and *CNTN5*) were associated with the immune response (**Figure 9a**, see **Table 5** for a complete list of proximal genes).

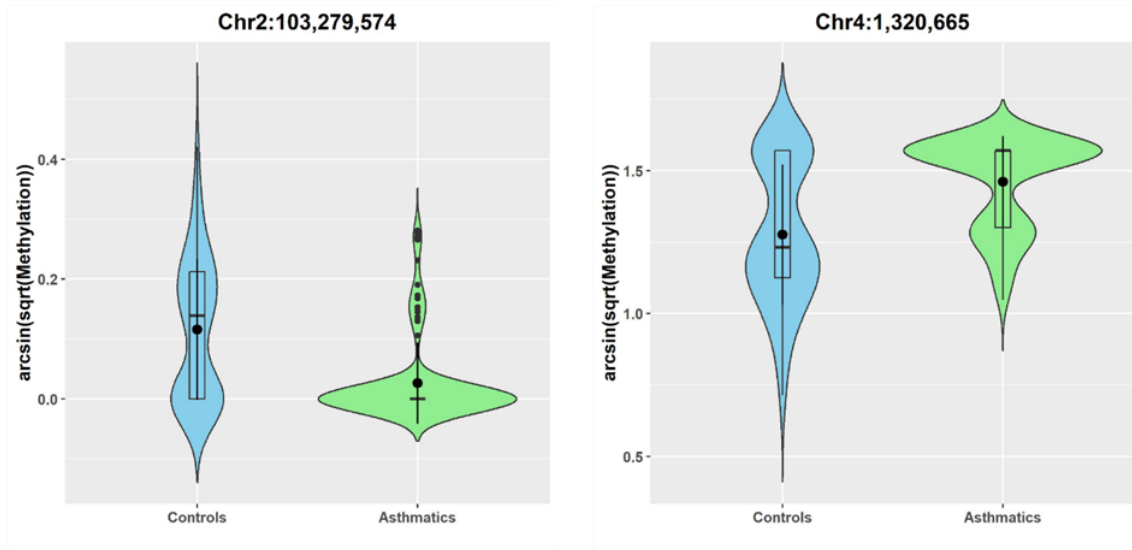


**Figure 7.** Manhattan Plot illustrating results from the epigenome-wide association study of eosinophils for asthma phenotype. Points represent  $-\log_{10} p$  values (y axis) for methylation sites according to their genomic location (x axis). The red horizontal line illustrates the genome-wide threshold ( $p < 5E-08$ ) and the blue line the suggestive threshold ( $p < 1E-06$ ). Proximal genes of the two significant CpGs were indicated.

**Table 5.** Results of the epigenome-wide association study with asthma

<b>CpG<sup>a,b</sup></b>	<b>Locus<sup>b</sup></b>	<b>Flanking genes<sup>c</sup></b>	<b>Location</b>	<b>Coeff</b>	<b>SE</b>	<b>P value</b>	<b>Function category<sup>d</sup></b>
Chr1:37,499,363	1p34.3	<b>GRIK3</b> – ZC3H12A	Gene body	-0.118	0.021	1.28E-07	<b>Immune response</b> – Immune response
Chr1:6,267,177	1p36.31	<b>RNF207</b> – RNF207-AS1	Gene body	-0.105	0.020	7.79E-07	<b>Transmembrane protein</b> – RNA gene
Chr2:103,279,574	2q12.1	<b>SLC9A2</b> – MFSD9	Gene body	-0.089	0.015	2.74E-08	<b>Immune response</b> – Transmembrane protein
Chr4:1,320,665	4p16.3	<b>MAEA</b> – UVSSA	Gene body	0.222	0.036	6.69E-09	<b>Immune response</b> – Protein binding
Chr7:100,027,356	7q22.1	<b>MEPCE</b> – ZCWPW1	Gene body	-0.048	0.009	9.33E-07	<b>Nervous and behavior function</b> – Immune response
Chr11:97,073,789	11q21	<b>JRKL-AS1</b> – CNTN5	Intergenic	-0.218	0.042	8.08E-07	<b>RNA gene</b> – Immune response
Chr14:22,393,510	14q11.2	<b>OR4E1</b> – TRD-AS1	Intergenic	-0.202	0.038	4.60E-07	<b>Other</b> – RNA gene

<sup>a</sup>CpG sites shown are those with a significant p-value (in bold) and suggestive p-value for the EWAS analyses in eosinophils; <sup>b</sup>CpG position and locus on genome according to the human genome reference 19 (hg19); <sup>c</sup>Genes in which the CpG is located in or nearest (gene with nearest transcription start site in bold) to according to the UCSC Genomes browser (hg19); <sup>d</sup>Functional category was classified into functions (function category for the gene with the nearest transcription start site in bold) with the use of the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER 17.0) classification system, GeneCards and g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping classification system. Abbreviations: CpG = cytosine-phosphate-guanine; SE = Standard error.



**Figure 8.** Violin plots showing methylation levels for asthmatic and non asthmatics individuals for genome-wide significant CpGs. Methylation levels are presented as arcsin square root transformed values and individuals are color-coded as follows: blue = controls; green = asthmatics.

#### Association between methylation levels and genetic variants

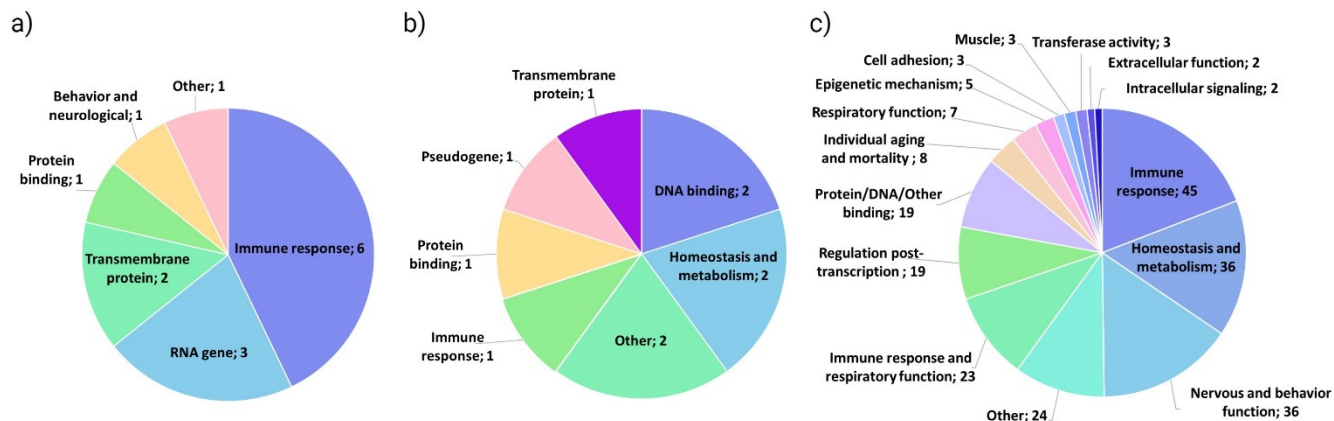
In the context of *cis*-mQTL, the two significant CpGs were associated with genetic variants (FDR  $\leq$  0.05; **Table 6**). CpG located on Chr2:103,279,574 was associated with 115 variants near the transmembrane protein 182 (*TMEM182*) gene. The CpG located on Chr4:1,320,665 was associated with 114 genetic variants located within or near six genes (ATP binding cassette subfamily A member 11 (*ABCA11P*), fibroblast growth factor receptor like 1 (*FGFRL1*), ring finger protein 212 (*RNF212*), transmembrane p24 trafficking protein 11 (*TMED11P*), zinc finger protein 141 (*ZNF141*), and zinc finger protein 721 (*ZNF721*)). One suggestive CpG, located at Chr1:6,267,177, was associated with nine genetic variants within or near three genes (adherens junctions associated protein 1 (*AJAP1*), nephrocystin 4 (*NPHP4*), and tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12 (*TNFRSF25*)). Among these ten proximal genes, one was classified in the immune response category (*TNFRSF25*; **Table 6** and **Figure 9b**). None of these genetic variants were already associated with eosinophil functions, asthma or immune response.

**Table 6.** *Cis*- methylation quantitative trait loci (*cis*-mQTL) information on variants associated to a significant or suggestive CpG in eosinophil

CpG <sup>a,b</sup>	Locus <sup>b</sup>	Number of variants	Most significant variant association with CpG <sup>c</sup>					
			Variant ID	HGVS ID	Beta	FDR	Variant's nearest gene <sup>d</sup>	Function category <sup>e</sup>
Chr1:6,267,177	1p36.31	4	rs79061450	g.5348243T>C	1.01E-01	3.64E-02	495,649 bp from <i>AJAP1</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
		4	rs2071958	g.5555684C>T	-7.41E-02	4.40E-02	367,186 bp from <i>NPHP4</i> 3' end	Protein binding
		1	rs3138157	g.6521170T>A	-2.29E-01	4.23E-02	<i>TNFRSF25</i>	Immune response
<b>Chr2:103,279,574</b>	2q12.1	115	rs747423246	g.104032744_104032755del	-9.08E-02	3.64E-02	598,605 pb from <i>TMEM182</i> 3' end	Transmembrane protein
<b>Chr4:1,320,665</b>	4p16.3	22	rs7676105	g.418924T>C	1.33E-01	3.64E-02	<i>ABCA11P</i>	Pseudogene
		2	rs200072756	g.1036218del	3.64E-01	3.91E-02	15,531 pb from <i>FGFRL1</i> 3' end	Other
		3	rs79329953	g.1081419G>A	3.64E-01	3.91E-02	<i>RNF212</i>	Homeostasis and metabolism
		1	rs201953581	g.1048717del	3.64E-01	3.91E-02	16,550 pb from <i>RNF212</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
		1	rs12506595	g.1119404G>A	3.65E-01	3.91E-02	<i>TMED11P</i>	Other
		1	rs75307101	g.1130203T>A	3.65E-01	3.91E-02	13,251 pb from <i>TMED11P</i> 5' end	Other
		49	rs3037726	g.365332_	1.41E-01	1.56E-02	<i>ZNF141</i>	DNA binding
		12	rs4690176	365333insTG	1.46E-01	1.56E-02	11,229 pb from <i>ZNF141</i> 3' end	DNA binding
		23	rs57797921	g.388989T>C	1.33E-01	3.64E-02	<i>ZNF721</i>	DNA binding

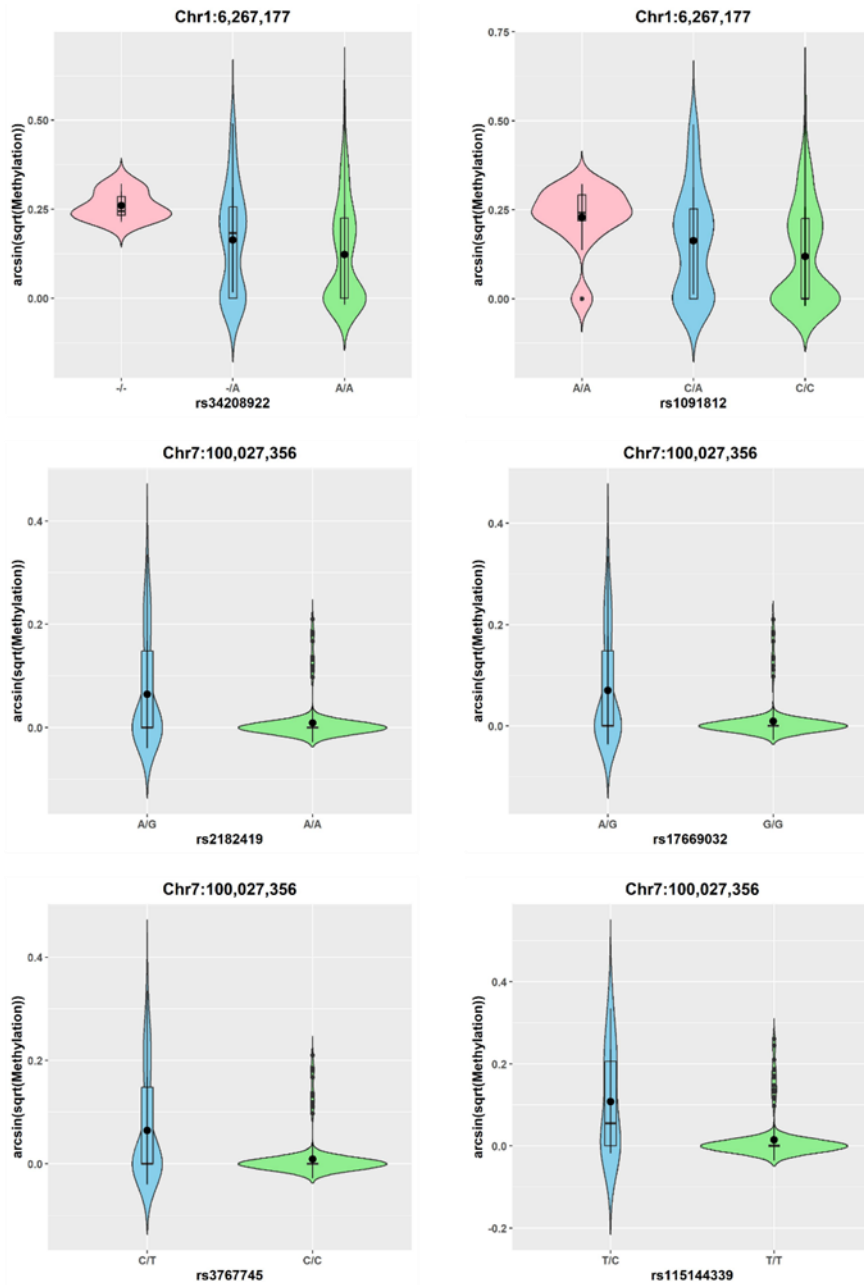
<sup>a</sup>CpG sites shown are those with a significant p-value (in bold) or suggestive p-value for the EWAS analyses in eosinophils; <sup>b</sup>CpG position and locus on genome according to the human genome reference 19 (hg19); <sup>c</sup>Genetic variant and association values for the mQTL result with best p-value for each CpG and classified by nearest gene; <sup>d</sup>Gene in which the variant is located in or nearest to according to the UCSC Genomes browser (hg19). For variant which are intergenic, the distance from the nearest gene is indicated with the gene direction; <sup>e</sup>Function category was determined using the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER 17.0) classification system, GeneCards and g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping classification system.

In the context of *trans*-mQTL, the two significant CpGs located on Chr2:103,279,574 and Chr4:1,320,665 were associated with seven and 23 genetic variants, respectively, within or near six genes (dual specificity phosphatase 1 (*DUSP1*), long intergenic non-protein coding RNA (*LINC*) 656 (*LINC00656*), *LINC00862*, activator of transcription and developmental regulator AUTS2 (*AUTS2*), endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment 1 (*ERGIC1*) and CRIM1 divergent transcript (*CRIM1-DT*) and nine genes (uncharacterized LOC285889 (*LOC285889*), Von Willebrand factor C domain containing 2 (*VWC2*), serine/threonine kinase 10 (*STK10*), myelin associated oligodendrocyte basic protein (*MOBP*), solute carrier family 7 member 1 (*SLC7A1*), ubiquitin like 3 (*UBL3*), zona pellucida like domain containing 1 (*ZPLD1*), structural maintenance of chromosomes 2 (*SMC2*) and *LINC02120*). Three suggestive CpGs were associated with genetic variants in *trans*-mQTL analyses. The CpGs on Chr1:37,499,363 and Chr1:6,267,177 were associated with one and three genetic variants in one gene (heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 3 (*HS6ST3*)) and two genes (elastin (*ELN*) and LIM domain kinase 1 (*LIMK1*)), respectively. CpG located on Chr7:100,027,356 was associated with 583 genetic variants within or near 217 different genes (see **Table 9** for the complete list). Based on gene functions, 45 of the 236 genes were associated with immune functions alone, seven were associated with respiratory functions alone, and 23 were associated with both (**Figure 9c**). Enrichment analyses of GO classification using genes identified in *trans*-mQTL shown significant enrichment for those top-ranked biological processes terms: “multicellular organism development”, “regulation of signaling”, “system development” and “regulation of cell communication”. The significantly enriched cellular component terms were “cell junction”, “neuron to neuron synapse”, “adherents’ junction”, “postsynaptic specialization”, “postsynaptic density” and “catenin complex” (**Figure 11**).



**Figure 9.** Function categories for proximal genes of a) significant and suggestive CpGs from the epigenome-wide association study<sup>44</sup>, b) genetic variants in significant *cis*-methylation quantitative trait loci (*cis*-mQTL) analysis, and c) genetic variants in significant *trans*-mQTL. Genes were classified into functions based on the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER 17.0) classification system, GeneCards and g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping classification system.

Among the genetic variants identified through the *trans*-mQTL analysis, six were associated with immune response, respiratory functions, asthma, or atopy according to the GWAS Catalog<sup>49</sup> and PubMed databases (research terms: rs ID, asthma, allergy, atopic, inflammation, immunity, eosinophil, and methylation). The methylation levels of CpG according to the genotypes of these genetic variants are shown using violin plots (**Figure 10**). Two of the six genetic variants, namely, rs34208922 and rs1091812, were associated with the CpG on Chr1:6,267,177. For these significant mQTLs, methylation levels were lower in individuals with the heterozygous or homozygous genotype for the major allele than in individuals with the homozygous genotype for the minor allele. The last four genetic variants, namely, rs2182419, rs3767745, rs17669032, and rs115144339 were associated with the CpG on Chr7:100,027,356. The methylation levels for these genetic variants were higher in individuals with the heterozygous genotype than in those with the homozygous genotype for the major allele (**Figure 10**). No individual in the studied cohort was homozygous for the minor allele of these four genetic variants.



**Figure 10.** Violin plots showing methylation levels of CpG sites categorized by genotype of mQTL significant genetic variants. Significant results shown are for mQTL-identified genetic variants, which were already documented in the literature. Methylation levels are presented as arcsin square root transformed values and genotypes are color-coded as follows: pink = homozygous for the minor allele; blue = heterozygous; green = homozygous for the major allele.

## Association between expression levels and genetic variants

We performed *cis*- and *trans*-eQTL analyses in eosinophil samples using expression counts of proximal genes from EWAS and mQTL analyses and genotypes of genetic variants from mQTL analysis. Results identified three significant *cis*-eQTLs (FDR  $\leq$  0.05), where three genetic variants were associated with two proximal genes (**Table 7**). Two of the three genetic variants, rs2855726 and rs1091812 were associated with the *LIMK1* gene. The third genetic variant, namely, rs76037969, was associated with the coiled-coil domain containing 148 (*CCDC148*) gene.

**Table 7.** *Cis*-expression quantitative trait loci (*cis*-eQTL) information on variants associated to proximal genes (EWAS and mQTL) in eosinophils

Gene <sup>a</sup>	Gene position <sup>a</sup>	Variant ID	HGVS ID	Beta	FDR
<i>LIMK1</i>	Chr7:73498134-73536855	rs2855726	g.73517114G>A	1.56E-01	7.83E-04
		rs1091812	g.73490656A>C	1.52E-01	9.59E-04
<i>CCDC148</i>	Chr2:159027869-159313265	rs76037969	g.159237518T>C	1.25E-05	9.64E-03

<sup>a</sup>Genes shown are the nearest genes identified during EWAS and mQTL analyses in eosinophils. Gene symbols, positions and chromosome according to human genome reference 19 (hg19)

In the context of *trans*-eQTL, 55 genes were associated with 389 genetic variants, identifying 714 *trans*-eQTLs (see **Table 10** for the complete list). Among these identified interactions, two of the three genetic variants associated in the *cis*-eQTL, namely, rs1091812 and rs2855726 were also associated in *trans*-eQTL with G protein subunit Alpha Q (*GNAQ*) gene. A third genetic variant in the *ELN* gene, rs34208922, was also associated with the *GNAQ* gene. These three genetic variants were all associated in *trans*-mQTL with the CpG on Chr1:6,267,177. Among these *trans*-eQTL associations, the collagen type XXII alpha 1 chain (*COL22A1*) gene was associated with 186 genetic variants, meaning that *COL22A1* is the gene with the most *trans*-eQTL associations identified in this study, followed by the ephrin A5 (*EFNA5*) which were associated to 56 genetic variants. Most of the remaining associations, specifically 358 associations, were distributed among ten genes (bone morphogenetic protein receptor type 2 (*BMP2*), *CCDC148*, DLG associated protein 4 (*DLGAP4*), *ERGIC1*, integrator complex subunit 5 (*INTS5*), *LINC00486*, leucine rich repeat and Ig domain



containing 2 (*LINGO2*), NBAS subunit of NRZ tethering complex (*NBAS*), protein disulfide isomerase family A member 6 (*PDIA6*) and ribosomal protein S21 (*RPS21*). The most relevant QTL results and their information are summarized in the **table 8**. These findings support the association of two CpGs of interest with asthma through identified interactions between methylation sites, associated variants, and associated genes related to asthma, allergies, eosinophils, respiratory and/or immune functions.

**Table 8.** Summary of most relevant variants associated by methylation quantitative trait loci with CpGs of interest, and by expression quantitative trait loci with candidate genes

EWAS		mQTL analysis					eQTL analysis			
CpG <sup>a,b</sup>	Cis-mQTL	Variant's nearest gene <sup>c</sup>	FDR	Trans-mQTL's variant	Variant's nearest gene <sup>c</sup>	FDR	Cis-eQTL's gene	FDR	Trans-eQTL's gene	FDR
Chr1:6,267,177				rs34208922	<i>ELN</i>	4.27E-02			<i>GNAQ</i>	2.14E-02
				rs1091812	<i>LIMK1</i>	4.41E-02	<i>LIMK1</i>	7.68E-04	<i>GNAQ</i>	2.76E-02
				rs2855726	<i>LIMK1</i>	4.41E-02	<i>LIMK1</i>	6.27E-04	<i>GNAQ</i>	1.07E-02
<b>Chr2:103,279,574</b>	115 genetic variants	549,133 to 724,064 bp from <i>TMEM182</i> 5' end	Ranging from 3.64E-02 to 4.48E-02						56/115 genetic variants associated with <i>EFNA5</i>	1.07E-02

<sup>a</sup>CpG sites shown are those with a significant p-value (in bold) or suggestive p-value from the EWAS analyses in eosinophils; <sup>b</sup>CpG position and locus on the genome according to the human genome reference 19 (hg19); <sup>c</sup>Gene within or nearest to which the variant is according to the UCSC Genome browser (hg19). For intergenic variants, the distance from the nearest gene, as well as the gene's end, is provided.

### Correlation analysis between methylation levels and expression counts

Correlation analyses were performed between the gene expression counts of the proximal genes from EWAS and mQTL analyses and methylation levels of the seven CpGs identified in the EWAS. There was one significant correlation ( $r > 0.3$ ;  $FDR \leq 0.05$ ) between the methylation levels of the CpG on Chr7:100,027,356 and expression counts of Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1 (*HEY1*) gene ( $r = 3.13E-01$ ;  $FDR = 9.98E-03$ ; see **Table 11**).

## 4.8 Discussion

This study aimed at identifying the methylome profile of eosinophils associated with asthma. An EWAS was performed on a subset of 183 samples from the SLSJ asthma family cohort and identified two significant CpGs and five CpGs with suggestive associations with asthma. Eosinophils are an immune cell type found in low proportion in the blood, usually less than 5%<sup>4</sup>. Considering its rarity, this study includes a high number of individuals and represents a great addition to the existing knowledge about eosinophil's function in asthma.

None of the seven identified CpGs has been previously associated with asthma, allergy, respiratory functions, or immune functions. However, six of the 14 proximal genes identified, and several genetic variants associated in mQTL analyses or their proximal genes have previously been linked with asthma. This observation reinforces the possibility that these CpGs may directly or indirectly affect eosinophil functions in asthma.

Several studies have shown the importance of eosinophils in explaining methylation signals in whole blood. Five EWAS studies on asthma, allergy, and IgE level phenotypes validated the signals obtained from whole blood in eosinophil samples. Liang et al. validated all 36 CpGs associated with serum IgE levels in eosinophil samples<sup>17</sup>. Reese et al. validated 148 of 179 CpGs related to childhood asthma in eosinophil samples<sup>18</sup>. Xu et al. validated 14 of 14 CpGs associated with childhood asthma in eosinophil samples<sup>20</sup> and, in another study, validated 21 of 21 CpG sites associated with allergy<sup>19</sup>. Hoang et al. validated 50 of 509 CpGs associated with non-atopic asthma and 274 of 1,076 CpGs

associated with atopic asthma in eosinophil samples<sup>16</sup>. Recto et al. identified 490 CpGs associated with IgE levels in whole blood samples from individuals with asthma. After adjusting for eosinophil count, the association remained for only 25 CpGs, highlighting the importance of eosinophils in the associations found in whole blood, even though validation was not performed in eosinophil samples<sup>22</sup>. The seven CpGs identified in this study have not been previously documented. As previous studies were limited to CpGs identified in whole blood and used microarray data, this study is the first to provide an extensive overview of the methylation profile of isolated eosinophils, leading to the identification of novel methylation sites.

Thus, the main strengths of this study are the use of a custom sequencing panel for DNA methylation and the large sample size of eosinophil samples. A high blood volume was processed to obtain enough cells to extract DNA and RNA. It is a time-consuming and costly method, which might explain the lack of similar cohorts in the literature. Validation in another cohort is thus impossible for now. Also, the custom methyl capture panel yield better coverage than microarrays and targets CpGs within regulatory regions of immune cells, narrowing raw results to CpGs with potential biological impact.

The two significant CpGs identified in this study were located in genes involved in the immune response. The CpG on Chr4:1,320,665 is located in the body (intron 3 or 4, depending on the transcript) of the *MAEA* gene. *MAEA* encodes an E3 ubiquitin ligase subunit, is highly expressed in hematopoietic stem cells, and influences autophagy and quiescence<sup>50</sup>. It is also expressed in eosinophils<sup>51</sup> and may exert the same influences. *MAEA*-mediated ubiquitination modulates surface cytokine receptors via autophagy<sup>50</sup>. It can also directly ubiquitinate  $\beta$ -catenin, causing its degradation<sup>52</sup>.  $\beta$ -catenin plays an important role in airway remodeling via the Wntless/Integrated (Wnt) signaling pathway<sup>53</sup>. The second significant CpG on Chr2:103,279,574 is located in the body (intron 2) of the *SLC9A2* gene. This gene codes for the sodium-exchanger protein 2 (NHE2), which contains a binding site for the transcription nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>54</sup>. NF- $\kappa$ B plays an important role in innate and adaptive immune responses in asthma<sup>55,56</sup>. In the literature, some genetic variants localized in *SLC9A2* have been associated with atopy, asthma<sup>57</sup>, and eosinophil count<sup>58</sup>. The same CpG is located 73,773 bp from the 3' end of the *MFSD9* gene, which encodes major facilitator

superfamily domain-containing protein 9, which is involved in transmembrane transport. It has been associated with asthma by identifying sentinel asthma risk variants<sup>59</sup>.

Furthermore, among the suggestive CpGs, three sites were located near or within genes implicated in the immune response. The CpG on Chr1:37,499,363 is located in the body (intron 1) of the *GRIK3* gene<sup>60</sup>. Previous studies have identified an association between variants in this gene and the forced expiratory volume in 1 sec /forced vital capacity (FEV<sub>1</sub>/FVC) ratio<sup>61</sup> and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in smokers<sup>62</sup>. Another study associated a CpG site near the *GRIK3* gene with non-atopic asthma<sup>16</sup>. The same CpG is also located 440,818 bp from the 5' end of the zinc finger CCCH-type containing 12A (*ZC3H12A*) gene, which encodes the monocyte chemotactic protein-induced protein 1 (MCPIP1). This protein is involved in pulmonary inflammation by regulating GATA binding protein 3 (*GATA3*) mRNA decay in mice<sup>63</sup>, affecting NF- $\kappa$ B signaling and regulating T<sub>H</sub>2 cells, which promote eosinophilia by secreting IL-5<sup>63,64</sup>. A second CpG with suggestive association, Chr7:100,027,356, is located at 1,425 bp from the 5' end of the zinc finger CW-type and PWWP domain containing 1 (*ZCWPW1*) gene. One CpG site located 198,626 bp from the 5' end of this gene has previously been associated in *cis*-mQTL with non-atopic asthma<sup>16</sup>. A third CpG on Chr11:97,073,789 is located 897,344 bp from the 5' end of *JRKL-AS1* non-coding RNA and 2,817,890 bp from the 5' end of the *CNTN5* gene, which encodes a member of the immunoglobulin superfamily and the contactin family. It is associated with COPD but not with asthma<sup>65</sup>. However, the distance between *CNTN5* and the CpG on Chr11:97,073,789 was too large to assume a direct link between them.

Two of the aforementioned genes have not been previously documented to be expressed in eosinophils: *SLC9A2* and *GRIK3*<sup>51</sup>. In this study, *SLC9A2* and *GRIK3* were expressed in eosinophils at remarkably low levels, which may explain why they were not identified in other samples in the public databases. However, only very few samples from healthy individuals are included in these public databases. This can indeed affect publicly available data and explain the differences observed in the samples in this study. In this study, although the 14 proximal genes to the seven associated CpGs were expressed in eosinophils, no significant correlation could be found after multiple testing

corrections. However, the effect of these CpGs on the expression of the nearest genes may be indirect, leading to a less linear relationship between the two measurements. Moreover, the effect of these CpGs may be mediated through interactions with genetic variants.

The second part of this study involved quantitative trait locus (mQTL and eQTL) analyses to describe the genetic mechanisms underlying the association of CpG with asthma and suggest possible mechanisms to explain these associations. The two significant CpGs and one suggestive CpG were associated in *cis*-mQTL with genetic variants. Among these, the CpG on Chr2:103,279,574 was associated with 115 variants near the *TMEM182* gene. Another genetic variant (rs62153409) in this gene has been previously associated with eosinophil count<sup>58</sup>. One genetic variant associated with the CpG on Chr1:6,267,177 was in the *TNFRSF25* gene, which is involved in the immune response and associated with effector function in T<sub>H</sub>2 CD4<sup>+</sup> cells during allergic lung inflammation<sup>66</sup>.

In the *trans*-mQTL analysis, the two significant CpGs identified were associated with 30 variants, none of which were previously associated with asthma-related phenotypes. Those variants are proximal to 15 genes among which four have previously been associated with respiratory functions (*AUT2*, *ERGIC1*, *VWC2*, and *ZPLD1*)<sup>58,61,67</sup>. Furthermore, some genes have been associated with allergic diseases (*DUSP1*)<sup>68,69</sup>, lymphocyte count (*AUT2*)<sup>58,70</sup> and methylation (*ZPLD1*)<sup>71</sup>. Among the 587 variants associated with three of the five CpG sites with suggestive associations, six were associated with asthma or respiratory functions. Of these six, two were associated with the CpG on Chr1:6,267,177 and localized in the *ELN* gene (rs34208922 and rs1091812). The first is associated with the accelerated degradation of *ELN* mRNA<sup>72</sup>. The second is associated with the FEV<sub>1</sub>/FVC ratio<sup>58,67</sup>, supporting the role of elastin in asthma<sup>73</sup>. Interestingly, 583 of the 587 variants were associated with the CpG on Chr7:100,027,356. Three of these variants (rs17669032, rs3767745, and rs2182419) in the *PTPRC* gene have been associated with asthma<sup>57,74-76</sup> and eczema<sup>58</sup>. Moreover, other variants in the same gene have also been associated with eosinophil count<sup>57-59</sup>. Finally, a sixth genetic variant (rs115144339) has been associated with the FEV<sub>1</sub> and bronchodilator response<sup>61</sup>. These 587 genetic variants were proximal to 221 genes, of which 31 were associated with asthma, eight with allergy, seven with eczema, 18 with eosinophil

count, 54 with leukocyte count and eight with methylation process (see **Table 12** for the complete list of genes).

The results of the eQTL analysis support these associations and their involvement in asthma. The three variants (rs34208922, rs1091812 and rs2855726) that were associated by *trans*-mQTL to CpG on Chr1:6,267,177 were associated by *cis*-eQTL and/or *trans*-eQTL to two candidate genes. In the *cis*-eQTL analysis, two of these variants (rs1091812 and rs2855726) were associated with the *LIMK1* gene<sup>58,67,77</sup>. Variant rs2855726 had been related to the *LIMK1* gene as being involved in the EphrinA-EphR signaling pathway in the heritability of femoral neck bone geometry<sup>77</sup>, which supports our association between this variant and the *LIMK1* gene. Several actors involved in this signaling pathway have been associated with immune cells or asthma and allergy symptomatology. Decreased ephrin-A1 expression in asthmatics was associated with suppression of T<sub>H</sub>2 cell activation and T<sub>H</sub>2 cytokine expression<sup>78</sup>, while inhibition of ephA2 was associated with a reduction in bronchial hyperreactivity, pulmonary inflammation and remodeling in lung epithelial cells from mouse asthma model induced by house dust mite allergy<sup>79</sup>.

The second candidate gene with which the three variants (rs34208922, rs1091812 and rs2855726) were associated was the *GNAQ* gene. This gene encodes for the alpha Q subunit of the G protein (G<sub>αq</sub>), a protein previously associated with asthma<sup>80</sup> and allergen-induced pulmonary eosinophilia<sup>81</sup>. This gene is involved in the regulation of several biological pathways that have been identified as being associated with asthma, allergy, and the respiratory or immune system.<sup>82</sup> Among those, it is involved in two common biological pathways with *LIMK1* gene that are linked with asthma<sup>82</sup>. The first pathway is ADORA2B-mediated production of anti-inflammatory cytokines, which is associated with asthma and eosinophilia<sup>83-85</sup>. In studies of allergic asthma, genetic deletion of ADORA2B or treatment with ADORA2B antagonists have been associated with a reduction in disease symptomatology, including airway remodeling<sup>86</sup>. The second pathway is the G-protein signaling regulation of p38 and c-Jun N-terminal kinases (JNK) signaling mediated by G-proteins, which are implicated in allergic asthma<sup>87</sup>. JNK, a member of the mitogen-activated protein kinase family, is an essential player in the apoptotic process and airway remodeling in asthma by activating the

Wnt5a/JNK signaling pathway<sup>87</sup>. The Wnt5A receptor is involved in asthma inflammation, and the ligand influences structural and immunological processes<sup>88</sup>. Taken together, these results and the existing literature support the involvement of this methylated site (Chr1:6,267,177), genetic variants (rs34208922, rs1091812 and rs2855726), and associated genes (*ELN*, *LIMK1* and *GNAQ*) in the context of asthma.

Another interesting results of *trans*-eQTL is the association between 56 genetic variants and the *EFNA5* gene. The 56 genetic variants are all associated by *cis*-mQTL with CpG on Chr2:103,279,574. Although these variants have never been associated with respiratory or immune function, their interactions with the *EFNA5* gene imply their involvement in asthmatic and/or immune mechanisms. This gene is notably involved in the Ephrin-Eph biological pathway, a common pathway to the *LIMK1* gene discussed above<sup>89</sup>. *EFNA5* also shares the G-protein signaling Ras homolog family member A regulation pathway with the *GNAQ* gene<sup>82</sup>.

Several processes can explain these *trans* interactions between genetic variants, CpGs and gene expression levels<sup>90</sup>. A variant may influence a *cis*-eQTL methylation site, which in turn may influence the expression level of a gene regulating methylation process. A genetic variant may directly influence a gene that regulates DNA methylation, indirectly influencing the methylation levels of several *trans*-CpGs. Methylation sites can be influenced by distant genetic variants, which can influence distal genes through the small range caused by 3D DNA organization<sup>90</sup>. The mechanisms underlying *trans* interactions were not analyzed during this specific study but may explain the observed results.

Finally, according to the classification using PANTHER, GeneCards, and g:Profiler based on the functions of proximal genes, one gene from the 10 proximal genes from *cis*-mQTL and 75 genes from the 235 proximal genes from *trans*-mQTL were linked to the immune response, respiratory functions, or both. While the genes previously discussed are likely to be involved in eosinophil functions in asthma, many other genes identified, such as those previously assoc



## 4.9 Conclusion

This study identified two CpG sites in eosinophils showing significant association and five sites showing suggestive association with asthma in 183 French Canadian individuals. Almost half of the genes proximal to these CpGs have been previously associated with asthma-related phenotypes. The mQTL and eQTL analyses identified interactions between genetic variants, methylation sites and genes associated with asthma, immune response, and respiratory functions. This study corroborates previous results by proposing several genetic mechanisms to link previously associated genetic variants and genes, highlighting the potential of the eosinophil methylome to better understand the underlying mechanisms of asthma and its missing heritability. Results of this study suggest that DNA methylation sites in eosinophil samples, such as Chr1:6,267,177, may serve as biomarkers of allergic asthma in the SLSJ cohort. This specific site interacts with genes (*LIMK1*, *ELN* and *GNAQ*) and genetic variants associated with asthma, allergy, and/or eosinophils, supporting its role in the studied disease.

## 4.10 Acknowledgements

The authors thank the participants of the Saguenay–Lac-Saint-Jean asthma family cohort for their valuable participation in this study. RDG received a scholarship from the *Fonds de recherche du Québec – santé* (FRQS) and the *Regroupement intersectoriel de recherche en santé de l'Université du Québec* (RISUQ). This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant #133605) and the Joint Translational Call of the CIHR-Agence Nationale de la Recherche (ANR) 2015 in the Epigenomics of Complex Diseases (#EGM-CIHR 141900). The GWAS data were made available by the European Commission as part of GABRIEL (a multidisciplinary study to identify the genetic and environmental causes of asthma in the European Community) contract number 018996 under the Integrated Program LSH-2004-1.2.5-1 Post genomic approaches to understand the molecular basis of asthma aiming at a preventive or therapeutic control. This study used data generated by the UK10K Consortium. A complete list of the investigators

who contributed to the generation of the data is available from [www.UK10K.org](http://www.UK10K.org). Funding for UK10K was provided by the Wellcome Trust under award WT091310. CL is part of the Quebec Respiratory Health Network (RHN; <https://rsr-qc.ca/en/>), investigator of CHILD Study, the director of the *Centre intersectoriel en santé durable de l'Université du Québec à Chicoutimi*, is chairholder of the Tier 1 Canada Research Chair in Genomics of Asthma and Allergic Diseases and co-chairholder of the *Chaire de recherche en santé durable du Québec*.

### **Authors contributions**

RDG performed the analyses, generated the results, and wrote the first version, and revised the manuscript. AMM supervised the analyses and revised the results and the manuscript. AMBL performed the isolation of eosinophils, DNA and RNA extraction, and revised the manuscript. TP co-designed the study and revised the manuscript. CL supervised and designed the study as well as the research team (RDG, AMM and AMBL), provided funding, and revised and approved the final version of the manuscript.

### **Disclosure of potential conflicts of interest**

Authors have no potential conflicts of interest.

## 4.11 References

- 1 Lundbäck, B., Backman, H., Lötvall, J. & Rönmark, E. Is asthma prevalence still increasing? *Expert review of respiratory medicine* **10**, 39-51 (2016). <https://doi.org/10.1586/17476348.2016.1114417>
- 2 Organisation mondiale de la Santé. *Asthma*, <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>> (2023).
- 3 Chapman, D. G. & Irvin, C. G. Mechanisms of airway hyper-responsiveness in asthma: the past, present and yet to come. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **45**, 706-719 (2015). <https://doi.org/10.1111/cea.12506>
- 4 McBrien, C. N. & Menzies-Gow, A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in medicine* **4** (2017). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>
- 5 Hammad, H. & Lambrecht, B. N. The basic immunology of asthma. *Cell* **184**, 2521-2522 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.019>
- 6 Li, B. *et al.* Shared genetic architecture of blood eosinophil counts and asthma in UK Biobank. *ERJ open research* **9** (2023). <https://doi.org/10.1183/23120541.00291-2023>
- 7 Lombardi, C., Berti, A. & Cottini, M. The emerging roles of eosinophils: Implications for the targeted treatment of eosinophilic-associated inflammatory conditions. *Current Research in Immunology* **3**, 42-53 (2022). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2022.03.002>
- 8 Lambrecht, B. N., Hammad, H. & Fahy, J. V. The Cytokines of Asthma. *Immunity* **50**, 975-991 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018>
- 9 Ullemar, V. *et al.* Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy* **71**, 230-238 (2016). <https://doi.org/10.1111/all.12783>
- 10 Thomsen, S. F., Van Der Sluis, S., Kyvik, K. O., Skytthe, A. & Backer, V. Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clinical & Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **40**, 1054-1061 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03525.x>
- 11 Hernandez-Pacheco, N., Pino-Yanes, M. & Flores, C. Genomic Predictors of Asthma Phenotypes and Treatment Response. *Frontiers in pediatrics* **7**, 6 (2019). <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00006>
- 12 Augustine, T., Al-Aghbar, M. A., Al-Kowari, M., Espino-Guarch, M. & van Panhuys, N. Asthma and the Missing Heritability Problem: Necessity for Multiomics Approaches in Determining Accurate Risk Profiles. *Frontiers in immunology* **13** (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822324>
- 13 Larouche, M. *et al.* Methylation profiles of IL33 and CCL26 in bronchial epithelial cells are associated with asthma. *Epigenomics* **10**, 1555-1568 (2018). <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0044>
- 14 Ntontsi, P., Photiades, A., Zervas, E., Xanthou, G. & Samitas, K. Genetics and Epigenetics in Asthma. *International journal of molecular sciences* **22** (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22052412>
- 15 Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P. & Nag Chaudhuri, R. DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *Nucleus* **64**, 259-270 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13237-021-00367-y>
- 16 Hoang, T. T. *et al.* Epigenome-wide association study of DNA methylation and adult asthma in the Agricultural Lung Health Study. *The European respiratory journal* **56** (2020). <https://doi.org/10.1183/13993003.00217-2020>
- 17 Liang, L. *et al.* An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. *Nature* **520**, 670-674 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature14125>
- 18 Reese, S. E. *et al.* Epigenome-wide meta-analysis of DNA methylation and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 2062-2074 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.043>
- 19 Xu, C. J. *et al.* Shared DNA methylation signatures in childhood allergy: The MeDALL study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **147**, 1031-1040 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.044>

- 20 Xu, C. J. *et al.* DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis. *Lancet Respiratory Medicine* **6**, 379-388 (2018). [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30052-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30052-3)
- 21 Madore, A. M. *et al.* Asthma-associated polymorphisms in 17q12-21 locus modulate methylation and gene expression of GSDMA in naïve CD4(+) T cells. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* **47**, 171-174 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.03.002>
- 22 Recto, K. *et al.* Epigenome-wide DNA methylation association study of circulating IgE levels identifies novel targets for asthma. *EBioMedicine* **95** (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104758>
- 23 Laprise, C. The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes & Immunity* **15**, 247-255 (2014). <https://doi.org/10.1038/gene.2014.12>
- 24 American Thoracic Society. ATS statement--Snowbird workshop on standardization of spirometry. *The American review of respiratory disease* **119**, 831-838 (1979). <https://doi.org/10.1164/arrd.1979.119.5.831>
- 25 American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *The American review of respiratory disease* **136**, 225-244 (1987). <https://doi.org/10.1164/ajrcm.136.1.225>
- 26 Ferland, C. *et al.* Eotaxin promotes eosinophil transmigration via the activation of the plasminogen-plasmin system. *Journal of leukocyte biology* **69**, 772-778 (2001).
- 27 Guilbert, M. *et al.* 5-Oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid induces important eosinophil transmigration through basement membrane components: comparison of normal and asthmatic eosinophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **21**, 97-104 (1999). <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.21.1.3517>
- 28 Allum, F. *et al.* Characterization of functional methylomes by next-generation capture sequencing identifies novel disease-associated variants. *Nature communications* **6**, 7211 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms8211>
- 29 Cheung, W. A. *et al.* Functional variation in allelic methylomes underscores a strong genetic contribution and reveals novel epigenetic alterations in the human epigenome. *Genome biology* **18**, 50 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1173-7>
- 30 Putri, G. H., Anders, S., Pyl, P. T., Pimanda, J. E. & Zanini, F. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics* **38**, 2943-2945 (2022). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>
- 31 O'Connell, J. *et al.* A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS genetics* **10**, e1004234 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004234>
- 32 Howie, B. N., Donnelly, P. & Marchini, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS genetics* **5**, e1000529 (2009). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000529>
- 33 Auton, A. *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68-74 (2015). <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- 34 Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. & Christensen, R. H. B. ImerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software* **82**, 1 - 26 (2017). <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13>
- 35 Stephen, D. T. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *Journal of Open Source Software* **3**, 731 (2018). <https://doi.org/10.21105/joss.00731>
- 36 Wickham, H. *Ggplot2 : elegant graphics for data analysis*. Second edition edn, xvi, 260 pages : illustrations ; 24 cm (Springer International Publishing, 2016).
- 37 Shabalin, A. A. Matrix eQTL: ultra fast eQTL analysis via large matrix operations. *Bioinformatics* **28**, 1353-1358 (2012). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts163>
- 38 Kaplow, I. M. *et al.* A pooling-based approach to mapping genetic variants associated with DNA methylation. *Genome research* **25**, 907-917 (2015). <https://doi.org/10.1101/gr.183749.114>

- 39 Lemire, M. *et al.* Long-range epigenetic regulation is conferred by genetic variation located at thousands of independent loci. *Nat Commun* **6**, 6326 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7326>
- 40 Heyn, H. *et al.* DNA methylation contributes to natural human variation. *Genome research* **23**, 1363-1372 (2013). <https://doi.org/10.1101/gr.154187.112>
- 41 Guo, X. *et al.* A Comprehensive cis-eQTL Analysis Revealed Target Genes in Breast Cancer Susceptibility Loci Identified in Genome-wide Association Studies. *Am J Hum Genet* **102**, 890-903 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.016>
- 42 Vosa, U. *et al.* Large-scale cis- and trans-eQTL analyses identify thousands of genetic loci and polygenic scores that regulate blood gene expression. *Nature genetics* **53**, 1300-1310 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00913-z>
- 43 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* **15**, 550 (2014). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 44 Potaczek, D. P. *et al.* Development and characterization of DNazyme candidates demonstrating significant efficiency against human rhinoviruses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **143**, 1403-1415 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.026>
- 45 Thomas, P. D. *et al.* PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Sci* **31**, 8-22 (2022). <https://doi.org/10.1002/pro.4218>
- 46 Stelzer, G. *et al.* The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics* **54**, 1 30 31-31 30 33 (2016). <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- 47 Kolberg, L. *et al.* g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic acids research* **51**, W207-W212 (2023). <https://doi.org/10.1093/nar/gkad347>
- 48 Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**, 25-29 (2000). <https://doi.org/10.1038/75556>
- 49 Sollis, E. *et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog: knowledgebase and deposition resource. *Nucleic acids research* **51**, D977-D985 (2023). <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1010>
- 50 Wei, Q. *et al.* MAEA is an E3 ubiquitin ligase promoting autophagy and maintenance of haematopoietic stem cells. *Nature communications* **12**, 2522 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22749-1>
- 51 Expression Atlas. Gene expression across species and biological conditions. (2023).
- 52 Sato, A. *et al.* WNK regulates Wnt signalling and  $\beta$ -Catenin levels by interfering with the interaction between  $\beta$ -Catenin and GID. *Communications biology* **3**, 666 (2020). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01386-2>
- 53 Jia, X. X. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway regulates asthma airway remodeling by influencing the expression of c-Myc and cyclin D1 via the p38 MAPK-dependent pathway. *Experimental and therapeutic medicine* **18**, 3431-3438 (2019). <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7991>
- 54 Malakooti, J., Dahdal, R. Y., Dudeja, P. K., Layden, T. J. & Ramaswamy, K. The human Na(+)/H(+) exchanger NHE2 gene: genomic organization and promoter characterization. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **280**, G763-773 (2001). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.4.G763>
- 55 Janssen-Heininger, Y. M. *et al.* Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proceedings of the American Thoracic Society* **6**, 249-255 (2009). <https://doi.org/10.1513/pats.200806-054RM>
- 56 Amin, M. R. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  represses the expression of NHE2 through NF- $\kappa$ B activation in intestinal epithelial cell model, C2BB $\beta$ 1. *Inflammatory bowel diseases* **17**, 720-731 (2011). <https://doi.org/10.1002/ibd.21419>
- 57 Zhu, Z. *et al.* Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **145**, 537-549 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.035>
- 58 Kichaev, G. *et al.* Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *American Journal of Human Genetics* **104**, 65-75 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.11.008>

- 59 Ferreira, M. A. R. *et al.* Genetic Architectures of Childhood- and Adult-Onset Asthma Are Partly Distinct. *American Journal of Human Genetics* **104**, 665-684 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.02.022>
- 60 Sturgill, J. L., Mathews, J., Scherle, P. & Conrad, D. H. Glutamate signaling through the kainate receptor enhances human immunoglobulin production. *Journal of Neuroimmunology* **233**, 80-89 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.11.014>
- 61 Lutz, S. M. *et al.* A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC genetics* **16** (2015). <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0299-4>
- 62 Korytina, G. F. *et al.* Role of Neurotransmitter System Genes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Russian Journal of Genetics* **57**, 1294-1303 (2021). <https://doi.org/10.1134/S1022795421110065>
- 63 Peng, H. *et al.* Monocyte chemotactic protein-induced protein 1 controls allergic airway inflammation by suppressing IL-5-producing T(H)2 cells through the Notch/Gata3 pathway. *The Journal of allergy and clinical immunology* **142**, 582-594 e510 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.031>
- 64 Wang, W. *et al.* TRAF Family Member-associated NF- $\kappa$ B Activator (TANK) Inhibits Genotoxic Nuclear Factor  $\kappa$ B Activation by Facilitating Deubiquitinase USP10-dependent Deubiquitination of TRAF6 Ligase\*. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 13372-13385 (2015). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643767>
- 65 Kaneko, Y. *et al.* The search for common pathways underlying asthma and COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* **8**, 65-78 (2013). <https://doi.org/10.2147/copd.S39617>
- 66 Fang, L., Adkins, B., Deyev, V. & Podack, E. R. Essential role of TNF receptor superfamily 25 (TNFRSF25) in the development of allergic lung inflammation. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1037-1048 (2008). <https://doi.org/10.1084/jem.20072528>
- 67 Shrine, N. *et al.* Multi-ancestry genome-wide association analyses improve resolution of genes and pathways influencing lung function and chronic obstructive pulmonary disease risk. *Nature genetics* **55**, 410-422 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01314-0>
- 68 Budu-Aggrey, A. *et al.* European and multi-ancestry genome-wide association meta-analysis of atopic dermatitis highlights importance of systemic immune regulation. *Nature Communications* **14** (2023). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41180-2>
- 69 Grosche, S. *et al.* Rare variant analysis in eczema identifies exonic variants in DUSP1, NOTCH4 and SLC9A4. *Nature Communications* **12** (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26783-x>
- 70 Vuckovic, D. *et al.* The Polygenic and Monogenic Basis of Blood Traits and Diseases. *Cell* **182**, 1214-1231, e1211 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.008>
- 71 Zhang, Q. *et al.* Genotype effects contribute to variation in longitudinal methylome patterns in older people. *Genome medicine* **10**, 75 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0585-7>
- 72 Akagawa, H. *et al.* A haplotype spanning two genes, ELN and LIMK1 , decreases their transcripts and confers susceptibility to intracranial aneurysms. *Human molecular genetics* **15**, 1722-1734 (2006). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl096>
- 73 Reddel, C. J., Weiss, A. S. & Burgess, J. K. Elastin in asthma. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* **25**, 144-153 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.02.001>
- 74 Han, Y. *et al.* Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun* **11**, 1776 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15649-3>
- 75 Sleiman, P. M. *et al.* Variants of DENND1B associated with asthma in children. *N Engl J Med* **362**, 36-44 (2010). <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0901867>
- 76 Tsuo, K. *et al.* Multi-ancestry meta-analysis of asthma identifies novel associations and highlights the value of increased power and diversity. *Cell Genom* **2**, 100212 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2022.100212>
- 77 Chen, Y. *et al.* Pathway-based genome-wide association analysis identified the importance of EphrinA-EphR pathway for femoral neck bone geometry. *Bone* **46**, 129-136 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.09.025>



- 78 Wohlfahrt, J. G. *et al.* Ephrin-A1 suppresses Th2 cell activation and provides a regulatory link to lung epithelial cells. *J Immunol* **172**, 843-850 (2004). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.843>
- 79 Xu, Z. *et al.* EphA2 recognizes Dermatophagoides pteronyssinus to mediate airway inflammation in asthma. *International immunopharmacology* **111**, 109106 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109106>
- 80 Chiba, Y., Shinozaki, K., Ueno, A., Sakai, H. & Misawa, M. Increased expression of G alpha q protein in bronchial smooth muscle of mice with allergic bronchial asthma. *J Smooth Muscle Res* **44**, 95-100 (2008). <https://doi.org/10.1540/jsmr.44.95>
- 81 Borchers, M. T. *et al.* Gq signaling is required for allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* **168**, 3543-3549 (2002). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3543>
- 82 Belinky, F. *et al.* PathCards: multi-source consolidation of human biological pathways. *Database (Oxford)* **2015** (2015). <https://doi.org/10.1093/database/bav006>
- 83 Ferrari, D. *et al.* Eosinophils and Purinergic Signaling in Health and Disease. *Frontiers in immunology* **11**, 1339 (2020). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01339>
- 84 Shen, Z. J., Hu, J., Esnault, S., Dozmorov, I. & Malter, J. S. RNA Seq profiling reveals a novel expression pattern of TGF-beta target genes in human blood eosinophils. *Immunology letters* **167**, 1-10 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.06.012>
- 85 Thompson, R. J., Sayers, I., Kuokkanen, K. & Hall, I. P. Purinergic Receptors in the Airways: Potential Therapeutic Targets for Asthma? *Frontiers in allergy* **2**, 677677 (2021). <https://doi.org/10.3389/falgy.2021.677677>
- 86 Karmouty-Quintana, H., Xia, Y. & Blackburn, M. R. Adenosine signaling during acute and chronic disease states. *J Mol Med (Berl)* **91**, 173-181 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00109-013-0997-1>
- 87 Athari, S. S. Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal transduction and targeted therapy* **4**, 45 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0079-0>
- 88 Singla, A., Reuter, S., Taube, C., Peters, M. & Peters, K. The molecular mechanisms of remodeling in asthma, COPD and IPF with a special emphasis on the complex role of Wnt5A. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* **72**, 577-588 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00011-023-01692-5>
- 89 Milacic, M. *et al.* The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic acids research* **52**, D672-D678 (2024). <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1025>
- 90 Villicaña, S. & Bell, J. T. Genetic impacts on DNA methylation: research findings and future perspectives. *Genome biology* **22**, 127 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02347-6>

## DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude était de documenter le profil de méthylation des éosinophiles, une cellule immunitaire impliquée dans les mécanismes inflammatoires de l'asthme. Le second objectif était d'étudier les interactions entre les variants génétiques associés et les sites de méthylation associés pour comprendre l'impact potentiel sur l'expression des gènes et de surcroît sur la maladie.

Dans un premier temps, cette recherche a permis d'identifier deux sites de méthylation qui sont significativement associés à l'asthme dans les éosinophiles, soit Ch4:1320665 et Chr2:103279574, ainsi que cinq sites ayant une association suggestive (Chr1:37499363, Chr1:6267177, Chr7:100027356, Chr11:97073789 et Chr14:22393510). Ces sites de méthylation (CpG) n'ont jamais été associés à l'asthme, à l'allergie ou à une fonction immunitaire dans la littérature. Ces résultats novateurs ont permis d'effectuer des analyses (QTL) qui soutiennent l'implication des CpG significatifs ainsi que celle de trois des cinq CpG suggestifs (Chr1:37499363, Chr1:6267177 et Chr7:100027356) dans l'asthme et dans les mécanismes immunitaires des éosinophiles.

Tout d'abord, le site Ch4:1320665 est dans le corps (intron 3 ou 4, dépendamment du transcrit) du gène *MAEA*. Ce gène code pour une sous-unité de la ligase E3 ubiquitine, une protéine fortement exprimée dans les cellules souches hématopoïétiques et les éosinophiles matures (Expression Atlas, 2023). Ce gène code pour l'une des sous-unités impliquées dans le complexe GID, qui permet de réguler de multiples fonctions en participant aux transferts de l'ubiquitine, ce qui module des activités métaboliques (Mohamed et al., 2021). Plus spécifiquement, ce gène serait impliqué dans la régulation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine et de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Maitland et al., 2022). L'activation de l'AMPK permet d'inhiber la prolifération des cellules du muscle lisse des voies respiratoires induites par le facteur de croissance transformant  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Pan et al., 2018). Tandis que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est fortement impliquée dans la pathogénicité de l'asthme en modulant les mécanismes de remodelages des voies



respiratoires (X. X. Jia et al., 2019). L'ajout d'une méthylation sur le gène *MAEA* pourrait influencer les mécanismes de transferts de l'ubiquitine du complexe GID, ce qui pourrait affecter les mécanismes biologiques médiés par ces protéines (Nishiyama et al., 2016; Sridhar et al., 2007). De plus amples recherches seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle de ce complexe et l'influence que peut avoir la méthylation de l'un des gènes codant pour l'une des sous-unités du complexe en question. Le second CpG significatif, soit Chr2:103279574, se situe dans le corps (intron 2) du gène *SLC9A2*. Ce gène code pour la sous-unité de la protéine échangeuse de sodium 2 (NHE2), qui contient un site de liaison pour la molécule NF-κB (Malakooti et al., 2001). Ce gène est faiblement exprimé dans les poumons et dans les éosinophiles (Expression Atlas, 2023). Dans des études antérieures, plusieurs variants localisés dans ce gène ont été associés à différents phénotypes de l'asthme sans qu'un mécanisme ou une fonction biologique y ait été associé (Adewuyi et al., 2022; Z. Zhu et al., 2020). L'un des mécanismes étudiés par rapport à ce gène suggère qu'il pourrait contribuer à modifier l'acidité du milieu pulmonaire, ce qui améliorerait la viabilité des éosinophiles, contribuant ainsi au maintien de l'inflammation dans les voies respiratoires asthmatiques (Kottyan et al., 2009).

Dans un second temps, les analyses QTL (mQTL et eQTL) ont permis d'identifier un grand nombre d'interactions proximales et distales, soit 238 *cis*-mQTL, 617 *trans*-mQTL, trois *cis*-eQTL et 714 *trans*-eQTL. Ces deux analyses soutiennent l'interaction entre la méthylation, le niveau d'expression des gènes et les variants génétiques, ces derniers pouvant influencer les sites méthylés. Ces analyses permettent également de valider l'association entre les CpG identifiés, les variants associés, les gènes proximaux identifiés, le phénotype de l'asthme et/ou des fonctions associées aux éosinophiles.

Les variants génétiques identifiés en position *cis*-mQTL étaient associés aux deux sites de méthylation significatifs et à un site ayant une association suggestive. Le Chr4:1320665 a été associé à 11 variants génétiques différents répartis sur six gènes distincts. Le second CpG significatif (Chr2:103279574) a été associé à 115 variants génétiques, tous localisés près du gène *TMEM182*. L'un de ces variants, non associé dans la présente étude, avait précédemment été associé au décompte des éosinophiles (Kichaev et al., 2019). L'implication de ce site CpG dans l'asthme est

également soutenue par les résultats du *trans*-eQTL, 56/115 variants génétiques ont été associés au gène codant pour la protéine éphrine A5 (*EFNA5*), qui est un acteur de la voie de signalisation Eph/Éphrine (Belinky et al., 2015). De plus, une étude antérieure effectuée sur des souris a permis d'identifier le gène *EFNA5* comme étant une cible immédiate de la protéine NF-κB dans les cellules interstitielles NG2<sup>+</sup> lors du développement musculaire néonatal. L'éphrine A5 synthétisée par les cellules interstitielles permettrait de promouvoir la migration des myoblastes (Gu et al., 2016). Il serait donc envisageable que ces gènes et ces variants soient de potentiels acteurs qui influencent la voie de signalisation Eph/Éphrine dans les éosinophiles des personnes asthmatiques.

En ce qui concerne les associations en *trans*-mQTL, un total de 617 variants génétiques ont été associés aux deux sites CpG significatifs et à trois sites CpG suggestifs. Les sites de méthylation Chr2:103279574 et Chr4:1320665 étaient respectivement associés à sept et à 23 variants génétiques répartis dans six et neuf gènes. Parmi les gènes associés au CpG en position Chr2:103279574, un seul gène, soit le *DUSP1*, présentait une association avec les maladies allergiques (Budu-Aggrey et al., 2023; Grosche et al., 2021).

Un variant sur le gène *STK10*, qui code pour la protéine *lymphocyte-oriented kinase* (LOK), est associé au Chr4:1320665. Ce gène est impliqué dans la réponse immunitaire innée, notamment en contribuant à la dégranulation des neutrophiles (Milacic et al., 2024), à la migration des lymphocytes (Belkina et al., 2009) et en interagissant avec les membres de la sous-famille A de l'homologue Ras (RhoA) (Bagci et al., 2020). Cette dernière protéine contribue à la régulation de la réponse lors de la liaison des chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance. Elle est impliquée lors des mécanismes de polarisation et de migration des macrophages, elle régule l'activation et l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T, et elle contribue à la translocation du CMH II à la surface des cellules présentatrices d'antigène (Bros et al., 2019). Ces divers rôles de la protéine RhoA dans de multiples cellules immunitaires innées de la lignée myéloïde semblent indiquer un rôle potentiel dans les éosinophiles des personnes asthmatiques.

Cela peut notamment être appuyé par une étude de Xu et ses collègues, qui soutient que cette protéine était significativement activée dans les éosinophiles des enfants atteints d'asthme

allergique et dans les cellules du modèle murin (C. Xu et al., 2019). Une étude de Shen et ses collègues soutient également l'activation de cette protéine via des médiateurs pro-inflammatoires associés aux éosinophiles (IL-5, CCL11 et éotaxine-1), ce qui mènerait la sécrétion des granules cytotoxiques dans les éosinophiles (Shen et al., 2021; Y. Zhang et al., 2020). La forme active de RhoA permet l'activation dépendante de la phosphorylation de la kinase du domaine LIM (LIMK), une protéine qui est codée par le gène *LIMK1* (Bros et al., 2019). Certaines études ci-dessus suggèrent un mécanisme de régulation via l'activation de la RhoA, de la LIMK et de la cofiline, ce qui régulerait plusieurs mécanismes de signalements cellulaires (motilité, polarisation, migration, etc.) dans les éosinophiles (Shen et al., 2021; Y. Zhang et al., 2020). Le gène *LIMK1* a notamment été identifié lors de cette étude par la présence d'une association significative de deux variants génétiques, qui sont localisés sur ce gène, avec le site de méthylation Chr1:6267177. Ce qui suggère une interaction potentielle entre les gènes *STK10* et *LIMK1* via leur régulation par des sites de méthylation de l'ADN (Bros et al., 2019; Shen et al., 2021). Il serait possible d'envisager l'implication de ces gènes dans les mécanismes cellulaires des éosinophiles matures, ces gènes étant fortement exprimés dans ce type cellulaire (Expression Atlas, 2023). Cela peut être soutenu par une étude antérieure qui suggère que des modifications du gène *STK10* par des variants génétiques pourraient influencer les mécanismes d'infiltration des éosinophiles ainsi que dans la réponse biologique dans le développement de l'asthme (J. H. Kim et al., 2011).

Les 587 autres variants génétiques sont répartis sur 221 gènes et ont été associés à trois des cinq CpG suggestifs (Chr1:37499363, Chr1:6267177 et Chr7:100027356). Selon la classification, 44 des 221 gènes sont impliqués dans les fonctions immunitaires, sept étaient associés à des fonctions respiratoires et 22 étaient associés aux fonctions immunitaires et respiratoires simultanément. Parmi ces variants, six avaient été associés à l'asthme ou à une fonction respiratoire dans la littérature (Akagawa et al., 2006; Ferreira et al., 2019; Kichaev et al., 2019; Lutz et al., 2015; Nick Shrine et al., 2023; Z. Zhu et al., 2020), ce qui soutient le rôle de ces gènes dans les mécanismes pathologiques et immunitaires de l'asthme. Ces résultats soutiennent des interactions complexes qui pourraient influencer l'expression génique à longue distance.

L'analyse de la corrélation entre les niveaux de méthylation et les niveaux d'expression des gènes n'a pas donné de résultats nous permettant d'effectuer des liens avec l'asthme, l'allergie ou les éosinophiles. Cela peut être expliqué par le type de données de méthylation analysées. La plupart des études identifient des régions différentiellement méthylées (DMR), ce qui correspond au niveau de méthylation de plusieurs sites méthylés dans une région prédéterminée de l'ADN. Les sites méthylés adjacents s'influencent les uns par rapport aux autres et leurs niveaux de méthylation présentent des corrélations entre les sites méthylés d'un DMR. Un site de méthylation influence moins le niveau d'expression des gènes que la moyenne de plusieurs sites, ce qui diminue le niveau de corrélation qui serait observé en utilisant des DMR (Campagna et al., 2021). La dernière analyse effectuée consistait à identifier les fonctions moléculaires des gènes proximaux identifiés par le EWAS et par l'analyse mQTL. Parmi les gènes proximaux identifiés par le *trans*-mQTL, plusieurs ont été associés à différents phénotypes de l'asthme via d'autres variants génétiques, qui n'ont pas été associés dans le cadre de la présente étude. Ces constatations permettent de soutenir le rôle de la méthylation dans les mécanismes de l'asthme et dans les fonctions des éosinophiles. Toutefois, plus d'études seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle et l'impact biologique que ces marques de méthylation et leurs interactions entraînent.

Cette étude présente de nombreux points forts. L'une des principales est la disponibilité des données d'expression et de méthylation pour les éosinophiles isolés du sang pour de nombreux individus de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ. Les éosinophiles sont un type cellulaire retrouvé dans le sang à une très faible proportion par rapport à d'autres types cellulaires. L'isolation de ces cellules nécessite donc une quantité de sang importante afin d'avoir suffisamment de cellules pour en extraire le matériel génétique afin d'effectuer le séquençage de l'ADN et de ses sites de méthylation. De ce fait, cette étude concernant l'association à l'échelle épigénomique est la première documentée sur des éosinophiles isolés. Cet aspect représente en lui-même une limite, car les résultats obtenus lors de cette étude n'ont pu être répliqués, puisqu'aucune autre cohorte d'asthmatiques ne dispose de données aussi complètes entourant des éosinophiles isolés. Une force de cette étude est l'utilisation d'un panel de séquençage personnalisé de la méthylation dans des régions régulatrices de gènes impliqués dans l'immunité. Cette technologie permet de mieux

documenter le méthylome en couvrant une quantité plus élevée de sites CpG que les puces (4 609 564 versus 482 000) qui sont davantage utilisées dues à leur coût moins élevé (Kurdyukov & Bullock, 2016; Morin, 2012).

La méthylation de l'ADN est un mécanisme de l'épigénétique qui, depuis sa découverte, soulève un important intérêt dans la recherche des maladies dites à traits complexes. Les profils de méthylation sont spécifiques au type cellulaire, influençant ainsi la réponse cellulaire et donc le phénotype de la maladie à l'étude. Toutefois, la plupart des études sur le sujet ont été effectuées sur des échantillons de sang complet, ce qui ne permet pas de comprendre l'implication des méthylations spécifiques à un type cellulaire ni de comprendre les processus moléculaires, cellulaires et biologiques associés à la maladie. Plusieurs de ces études ont utilisé des modèles statistiques afin d'ajuster leur analyse en fonction du décompte cellulaire, ce qui ne garantit pas que les résultats ne sont pas influencés par la variabilité cellulaire. Afin d'étudier les sites différenciellement méthylés, il est nécessaire de procéder à des études sur des échantillons cellulaires isolés. Ainsi, l'étude du méthylome des éosinophiles isolés permet le développement des connaissances actuelles quant au rôle de la méthylation de l'ADN dans la régulation des mécanismes inflammatoires de l'asthme. Cette étude permet notamment de mieux comprendre ce mécanisme épigénétique sans nécessiter un ajustement supplémentaire du modèle afin de tenir compte de l'hétérogénéité de l'échantillon. Ainsi, cette étude est la première à analyser la méthylation de l'ADN dans des éosinophiles isolés du sang de 183 participants. Les analyses ont permis d'isoler deux CpG qui n'avaient jamais été précédemment associés à aucune maladie, ainsi que cinq sites qui ont une association suggestive. De plus, l'analyse mQTL de ces sites révèle des interactions importantes avec des variants génétiques localisées dans des gènes associés aux réponses immunitaires, à l'homéostasie et au métabolisme, aux fonctions du système nerveux et du comportement, aux fonctions respiratoires, aux mécanismes épigénétiques, ainsi que plusieurs autres gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires. Ces constatations soutiennent le rôle de la méthylation de l'ADN dans les processus inflammatoires et respiratoires dans l'asthme.

## CONCLUSION

La présente étude a permis de documenter le profil de méthylation ainsi que les interactions entre ces CpG et les variants génétiques dans des éosinophiles provenant d'un échantillon de 183 individus de la cohorte familiale d'asthme du SLSJ. L'étude des profils de méthylation permet une meilleure compréhension des mécanismes épigénétiques impliqués dans le développement et le phénotype de la maladie. L'étude de ces marques permet également d'estimer l'influence de l'environnement sur la génétique des maladies à trait complexe. Malgré le fait que la méthylation de l'ADN soit l'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés, très peu d'études utilisent des échantillons cellulaires purifiés, ce qui peut altérer l'interprétation des résultats. Cette étude sur les éosinophiles isolés du sang est donc la première de ce genre à avoir été effectuée. L'étude des interactions de ces sites avec les variants génétiques permet de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliqués dans la fonction immunitaire propre aux éosinophiles. Il sera toutefois nécessaire de procéder à des études fonctionnelles afin de mieux comprendre leur rôle dans les mécanismes de la maladie.

Les analyses effectuées à l'aide des prélèvements de la population étudiée ont permis d'identifier deux sites de méthylation localisés sur deux gènes distincts. Ces deux sites sont associés à un total de 229 variants génétiques en *cis*-mQTL et à 30 variants génétiques en *trans*-mQTL. Les gènes proximaux de ces sites sont associés à des fonctions immunitaires ou à des fonctions d'homéostasie cellulaire, des rôles qui, lorsqu'altérés, peuvent modifier le fonctionnement cellulaire. L'analyse a également permis de faire une association suggestive de cinq sites de méthylation, dont trois ont un fort potentiel d'implication dans le développement de l'asthme. L'un d'eux présente une association avec neuf variants génétiques en *cis*-mQTL, tandis que c'est une association avec 587 variants génétiques en *trans*-mQTL, dont plusieurs ont déjà été associés à l'asthme ou à une fonction respiratoire. Cette étude permet de soutenir l'importance de la méthylation dans les mécanismes inflammatoires de l'asthme, en particulier dans les éosinophiles.

Pour conclure, l'étude du méthylome à partir de cellules isolées reconnues pour leur rôle majeur dans les maladies respiratoires telle que l'asthme est nécessaire à une meilleure compréhension de l'implication de ces mécanismes épigénétiques dans la régulation des gènes impliqués dans la maladie. Les découvertes faites dans le cadre de cette étude devront être validées à l'aide d'études de réplication ou en combinant plusieurs cohortes différentes afin d'obtenir un nombre de participants plus élevé. Le fait que ces marques soient dynamiques durant la vie d'un individu suggère de procéder à des études longitudinales afin de vérifier l'évolution des modifications qui peuvent avoir lieu. Il serait particulièrement intéressant d'analyser ces marqueurs en comparant des individus ayant des épisodes d'exacerbations ou de rémissions de l'asthme afin de constater les modifications du méthylome qui pourrait avoir contribué à ce changement. Il serait également intéressant de procéder à une analyse similaire en analysant les régions différenciellement méthylées, soit en calculant la moyenne des sites méthylés d'une région (100 à 200 pb), ces sites interagissant fortement les uns avec les autres. Plus précisément, il pourrait être très intéressant de procéder à des études fonctionnelles au niveau des gènes impliqués dans les voies de signalisation Wnt, Rhoa,  $\beta$ -caténine, NF- $\kappa$ b et Eph/Éphrine, et ce afin de mieux comprendre l'impact et le chevauchement de ces mécanismes cellulaires dans les éosinophiles des personnes asthmatiques. Concernant les perspectives à long terme, la compréhension de ces mécanismes pourrait éventuellement permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques ou même permettre l'identification de marqueurs qui pourraient guider les diagnostics cliniques vers du soutien ou des traitements personnalisés.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adalsteinsson, B. T., Gudnason, H., Aspelund, T., Harris, T. B., Launer, L. J., ... Gudnason, V. (2012). Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One*, 7(10), Article e46705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046705>
- Adewuyi, E. O., Mehta, D., & Nyholt, D. R. (2022). Genetic overlap analysis of endometriosis and asthma identifies shared loci implicating sex hormones and thyroid signalling pathways. *Human Reproduction*, 37(2), 366-383. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab254>
- Agence de santé publique du Canada. (2018). *Rapport du système canadien de surveillance des maladies chroniques : l'asthme et la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) au Canada, 2018*. Ottawa, Canada : Agence de la santé publique du Canada/ Public Health Agency of Canada. [http://publications.gc.ca/collections/collection\\_2018/aspc-phac/HP35-90-2018-fra.pdf](http://publications.gc.ca/collections/collection_2018/aspc-phac/HP35-90-2018-fra.pdf)
- Ahmadi, Z., Hassanshahi, G., Khorramdelazad, H., Zainodini, N., & Koochakzadeh, L. (2016). An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis. *Inflammation*, 39(3), 1253-1267. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0303-9>
- Akagawa, H., Tajima, A., Sakamoto, Y., Kirschke, B., Yoneyama, T., ... Inoue, I. (2006). A haplotype spanning two genes, ELN and LIMK1, decreases their transcripts and confers susceptibility to intracranial aneurysms. *Human Molecular Genetics*, 15(10), 1722-1734. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl096>
- Al-Muhsen, S., Johnson, J. R., & Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 128(3), 451-462. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.047>
- Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J., von Bülow, V., Harb, H., ... Potaczek, D. P. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(39), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0259-4>
- Alati, R., Al Mamun, A., O'Callaghan, M., Najman, J. M., & Williams, G. M. (2006). In utero and postnatal maternal smoking and asthma in adolescence. *Epidemiology*, 17(2), 138-144. <https://doi.org/10.1097/01.ede.0000198148.02347.33>
- American Lung Association. (2020, 13-06-2024). Current Asthma Demographics. Repéré le 29-06-2023 à <https://www.lung.org/research/trends-in-lung-disease/asthma-trends-brief/current-demographics#raceEthnicity>
- American Lung Association. (2023, 31-05-2023). What's In a Cigarette? Repéré le 19-06-2023 à <https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette#:~:text=There%20are%20approximately%20600%20ingredients,such%20as%20at%20poison%20packaging.>



- An, J., Do, A. R., Kang, H. Y., Kim, W. J., Lee, S., ... Kim, T. B. (2021). Genome-Wide Association Study of Korean Asthmatics: A Comparison With UK Asthmatics. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 13(4), 609-622. <https://doi.org/10.4168/aaair.2021.13.4.609>
- Astle, W. J., Elding, H., Jiang, T., Allen, D., Ruklisa, D., ... Soranzo, N. (2016). The Allelic Landscape of Human Blood Cell Trait Variation and Links to Common Complex Disease. *Cell*, 167(5), 1415-1429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.042>
- Augustine, T., Al-Aghbar, M. A., Al-Kowari, M., Espino-Guarch, M., & van Panhuys, N. (2022). Asthma and the Missing Heritability Problem: Necessity for Multiomics Approaches in Determining Accurate Risk Profiles. *Frontiers in Immunology*, 13, Article 822324. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822324>
- Bagci, H., Sriskandarajah, N., Robert, A., Boulais, J., Elkholi, I. E., ... Cote, J. F. (2020). Mapping the proximity interaction network of the Rho-family GTPases reveals signalling pathways and regulatory mechanisms. *Nature Cell Biology*, 22(1), 120-134. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0438-7>
- Barcik, W., Pugin, B., Westermann, P., Perez, N. R., Ferstl, R., ... O'Mahony, L. (2016). Histamine-secreting microbes are increased in the gut of adult asthma patients. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 138(5), 1491-1494. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.049>
- Barnes, P. J. (2011). Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunological reviews*, 242, 31-50. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01020.x>
- Barnes, P. J., Adcock, I. M., & Ito, K. (2005). Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *European Respiratory Journal*, 25(3), 552-563. <https://doi.org/10.1183/09031936.05.00117504>
- Barnes, P. J., & Page, C. P. (2017). *Pharmacology and therapeutics of asthma and COPD*. Cham, Switzerland : Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52175-6>
- Bélanger, E., & Laprise, C. (2021). Could the epigenetics of eosinophils in asthma and allergy solve parts of the puzzle? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), Article 8921. <https://doi.org/10.3390/ijms22168921>
- Belinky, F., Nativ, N., Stelzer, G., Zimmerman, S., Iny Stein, T., Safran, M., & Lancet, D. (2015). PathCards: multi-source consolidation of human biological pathways. *Database (Oxford)*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav006>
- Belkina, N. V., Liu, Y., Hao, J. J., Karasuyama, H., & Shaw, S. (2009). LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4707-4712. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805963106>
- Bergeron, C., Tulic, M. K., & Hamid, Q. (2010). Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Canadian Respiratory Journal*, 17(4), e85-93. <https://doi.org/10.1155/2010/318029>

- Bhatia, R. (2022, 03-2024). Asthme chez l'enfant. Repéré le 01-03-2023 à <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/accueil/probl%C3%A8mes-de-sant%C3%A9-infantiles/affections-respiratoires-chez-le-nourrisson-et-l-enfant/asthme-chez-l-enfant>
- Bloemen, K., Verstraelen, S., Van Den Heuvel, R., Witters, H., Nelissen, I., & Schoeters, G. (2007). The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*, 113(1), 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.07.010>
- Bonnelykke, K., Sleiman, P., Nielsen, K., Kreiner-Moller, E., Mercader, J. M., ... Bisgaard, H. (2014). A genome-wide association study identifies CDHR3 as a susceptibility locus for early childhood asthma with severe exacerbations. *Nature genetics*, 46(1), 51-55. <https://doi.org/10.1038/ng.2830>
- Boonpiyathad, T., Sözener, Z. C., Satitsuksanoa, P., & Akdis, C. A. (2019). Immunologic mechanisms in asthma. *Seminars in Immunology*, 46, Article 101333. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101333>
- Bordeaux, M. M. (2022, 29-05-2024). \*Antiasthmatiques : Les points essentiels. Repéré le 15-01-2023 à <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antiasthmatiques-les-points-essentiels>
- Boutin, H., & Boulet, L.-P. (2014). *Understand and Control Your Asthma*. Montréal, Canada : McGill-Queen's University Press. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3330983>
- Bros, M., Haas, K., Moll, L., & Grabbe, S. (2019). RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells*, 8(7), Article 733. <https://doi.org/10.3390/cells8070733>
- Budu-Aggrey, A., Kilanowski, A., Sobczyk, M. K., andMe Research, T., Shringarpure, S. S., ... Paternoster, L. (2023). European and multi-ancestry genome-wide association meta-analysis of atopic dermatitis highlights importance of systemic immune regulation. *Nature Communications*, 14(1), Article 6172. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41180-2>
- Campagna, M. P., Xavier, A., Lechner-Scott, J., Maltby, V., Scott, R. J., ... Lea, R. A. (2021). Epigenome-wide association studies: current knowledge, strategies and recommendations. *Clinical Epigenetics*, 13(1), Article 214. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01200-8>
- Cano-Gamez, E., & Trynka, G. (2020). From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00424>
- Cao, J., & Yan, Q. (2012). Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription, DNA damage response, and cancer. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00026>
- Cardet, J. C., Shenoy, K., Baydur, A., Carroll, J. K., Celedón, J. C., ... Israel, E. (2022). Caribbean Latinx with moderate-severe asthma bear greater asthma morbidity than other Latinx. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 150(5), 1106-1113. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.05.026>

- Carpentier, P. A., Dingman, A. L., & Palmer, T. D. (2011). Placental TNF-alpha signaling in illness-induced complications of pregnancy. *American Journal of Pathology*, 178(6), 2802-2810. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.042>
- Carr, T. F., Zeki, A. A., & Kraft, M. (2018). Eosinophilic and Noneosinophilic Asthma. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, 197(1), 22-37. <https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2232PP>
- Cephus, J. Y., Stier, M. T., Fuseini, H., Yung, J. A., Toki, S., ... Newcomb, D. C. (2017). Testosterone Attenuates Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Airway Inflammation. *Cell Reports*, 21(9), 2487-2499. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.110>
- Chen, M. H., Raffield, L. M., Mousas, A., Sakaue, S., Huffman, J. E., ... Lettre, G. (2020). Trans-ethnic and Ancestry-Specific Blood-Cell Genetics in 746,667 Individuals from 5 Global Populations. *Cell*, 182(5), 1198-1213. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.045>
- Chen, Y. C., Dong, G. H., Lin, K. C., & Lee, Y. L. (2013). Gender difference of childhood overweight and obesity in predicting the risk of incident asthma: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews : an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 14(3), 222-231. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01055.x>
- Cheung Wong, E. H., & Farne, H. A. (2020). Asthma: diagnosis and management in adults. *Medicine*, 48(5), 303-313. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.02.001>
- Chhabra, D., Sharma, S., Kho, A. T., Gaedigk, R., Vyhldal, C. A., ... DeMeo, D. L. (2014). Fetal lung and placental methylation is associated with in utero nicotine exposure. *Epigenetics*, 9(11), 1473-1484. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.971593>
- Chun, Y., Lee, J. H., & Bunyavanich, S. (2024). Epigenomic and epigenetic investigations of food allergy. *Pediatric Allergy & Immunology*, 35(1), Article e14065. <https://doi.org/10.1111/pai.14065>
- Chung, S., Kim, J. Y., Song, M. A., Park, G. Y., Lee, Y. G., ... Christman, J. W. (2019). FoxO1 is a critical regulator of M2-like macrophage activation in allergic asthma. *Allergy*, 74(3), 535-548. <https://doi.org/10.1111/all.13626>
- Cloutier, M. M., Baptist, A. P., Blake, K. V., Brooks, E. G., Bryant-Stephens, T., ... Walsh, C. G. (2020). 2020 Focused Updates to the Asthma Management Guidelines: A Report from the National Asthma Education and Prevention Program Coordinating Committee Expert Panel Working Group. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 146(6), 1217-1270. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.10.003>
- Comtet-Marre, S., Mosoni, P., & Peyret, P. (2020). Effets des polluants environnementaux et alimentaires sur le microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Di t tique*, 55(5), 255-262. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2020.07.004>
- Conroy, D. M., & Williams, T. J. (2001). Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung. *Respiratory Research*, 2(3), 150-156. <https://doi.org/10.1186/rr52>

- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010-1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Deng, X., Ma, J., Yuan, Y., Zhang, Z., & Niu, W. (2019). Association between overweight or obesity and the risk for childhood asthma and wheeze: An updated meta-analysis on 18 articles and 73 252 children. *Pediatric Obesity*, 14(9), Article e12532. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12532>
- Denizli, M., Capitano, M. L., & Kua, K. L. (2022). Maternal obesity and the impact of associated early-life inflammation on long-term health of offspring. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 12, Article 940937. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.940937>
- Desalu, O. O., Adeoti, A. O., Ojuawo, O. B., Aladesanmi, A. O., Oguntoye, M. S., ... Fawibe, A. E. (2021). Urban-Rural Differences in the Epidemiology of Asthma and Allergies in Nigeria: A Population-Based Study. *Journal of Asthma & Allergy*, 14, 1389-1397. <https://doi.org/10.2147/JAA.S333133>
- Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P., & Nag Chaudhuri, R. (2021). DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *Nucleus*, 64(3), 259-270. <https://doi.org/10.1007/s13237-021-00367-y>
- Dixon, A. E., & Peters, U. (2018). The effect of obesity on lung function. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 12(9), 755-767. <https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1506331>
- Durham, A. L., Wiegman, C., & Adcock, I. M. (2011). Epigenetics of asthma. *BBA - General Subjects*, 1810(11), 1103-1109. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.006>
- Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. *Archives of Medical Science : AMS*, 13(4), 851-863. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928>
- Etchegaray, J. P., & Mostoslavsky, R. (2016). Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Molecular Cell*, 62(5), 695-711. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.029>
- Expression Atlas. (2023). Gene expression across species and biological conditions. <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>
- Fantuzzi, G., & Mazzone, T. (2007). *Adipose tissue and adipokines in health and disease*. Totowa, USA : Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-370-7>
- Faraji, M., Mohammadi, A., Najmi, M., Fallahnezhad, M., Sabetkish, N., ... Moin, M. (2021). Exposure to ambient air pollution and prevalence of asthma in adults. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 14(8), 1211-1219. <https://doi.org/10.1007/s11869-021-01011-z>
- Feary, J., Suojalehto, H., & Cullinan, P. (2020). *Environmental and Occupational Lung Disease*. Sheffield, England : European Respiratory Society. <http://public.eblib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=6420673>

- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature reviews. Genetics*, 13(2), 97-109. <https://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Felton, J. M., Bouffi, C., Schwartz, J. T., Schollaert, K. L., Malik, A., ... Rothenberg, M. E. (2021). Aiolos regulates eosinophil migration into tissues. *Mucosal Immunology*, 14(6), 1271-1281. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00416-4>
- Ferreira, M. A. R., Mathur, R., Vonk, J. M., Szwajda, A., Brumpton, B., ... Almquist, C. (2019). Genetic Architectures of Childhood- and Adult-Onset Asthma Are Partly Distinct. *American Journal of Human Genetics*, 104(4), 665-684. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.02.022>
- Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular Cell*, 71(6), 882-895. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>
- Forno, E., Young, O. M., Kumar, R., Simhan, H., & Celedon, J. C. (2014). Maternal obesity in pregnancy, gestational weight gain, and risk of childhood asthma. *Pediatrics*, 134(2), e535-546. <https://doi.org/10.1542/peds.2014-0439>
- Fuchs, O., Bahmer, T., Rabe, K. F., & Von Mutius, E. (2017). Asthma transition from childhood into adulthood. *Lancet Respiratory Medicine*, 5(3), 224-234. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30187-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30187-4)
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2018). Endocrine regulation of lung disease and inflammation. *Experimental Biology & Medicine*, 243(17-18), 1313-1322. <https://doi.org/10.1177/1535370218816653>
- Gao, P., Simpson, J. L., Zhang, J., & Gibson, P. G. (2013). Galectin-3: its role in asthma and potential as an anti-inflammatory target. *Respiratory research*, 14(1), Article 136. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-136>
- Ghonim, M. A., Pyakurel, K., Ju, J., Rodriguez, P. C., Lammi, M. R., ... Boulares, A. H. (2015). DNA-dependent protein kinase inhibition blocks asthma in mice and modulates human endothelial and CD4<sup>+</sup> T-cell function without causing severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 135(2), 425-440. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.005>
- Gibbs, K., Collaco, J. M., & McGrath-Morrow, S. A. (2016). Impact of Tobacco Smoke and Nicotine Exposure on Lung Development. *Chest*, 149(2), 552-561. <https://doi.org/10.1378/chest.15-1858>
- Gill, M. A. (2012). The role of dendritic cells in asthma. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 129(4), 889-901. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.028>
- Global initiative for Asthma. (2023). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. <https://ginasthma.org/2023-gina-main-report/>

- Gomez, J. L. (2019). Epigenetics in Asthma. *Current Allergy & Asthma Reports*, 19(12), Article 56. <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0886-y>
- Goodsite, M. E., Johnson, M. S., & Hertel, O. (2021). *Air pollution sources, statistics and health effects* (Second edition.). New York, USA : Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0596-7>
- Grosche, S., Marenholz, I., Esparza-Gordillo, J., Arnau-Soler, A., Pairo-Castineira, E., ... Lee, Y. A. (2021). Rare variant analysis in eczema identifies exonic variants in DUSP1, NOTCH4 and SLC9A4. *Nature Communications*, 12(1), Article 6618. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26783-x>
- Gu, J. M., Wang, D. J., Peterson, J. M., Shintaku, J., Liyanarachchi, S., ... Guttridge, D. C. (2016). An NF-kappaB--EphrinA5-Dependent Communication between NG2(+) Interstitial Cells and Myoblasts Promotes Muscle Growth in Neonates. *Developmental Cell*, 36(2), 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.018>
- Gülşen, A. (2022). Asthma Phenotypes and Current Biological Treatments. Dans S. P. Chapoval, *Recent advances in asthma research and treatments*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91510>
- Hall, S., & Agrawal, D. K. (2014). Key mediators in the immunopathogenesis of allergic asthma. *International Immunopharmacology*, 23(1), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.05.034>
- Halwani, R., Al-Muhsen, S., Al-Jahdali, H., & Hamid, Q. (2011). Role of transforming growth factor- $\beta$  in airway remodeling in asthma. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, 44(2), 127-133. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0027TR>
- Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2021). The basic immunology of asthma. *Cell*, 184(9), 2521-2522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.019>
- Han, Y., Jia, Q., Jahani, P. S., Hurrell, B. P., Pan, C., ... Allayee, H. (2020). Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nature Communications*, 11(1), Article 1776. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15649-3>
- Han, Y. Y., Jerschow, E., Forno, E., Hua, S., Mossavar-Rahmani, Y., ... Celedon, J. C. (2020). Dietary Patterns, Asthma, and Lung Function in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Annals of the American Thoracic Society*, 17(3), 293-301. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201908-629OC>
- Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, 123(19), 2145-2156. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.110.956839>
- Hannon, E., Gorrie-Stone, T. J., Smart, M. C., Burrage, J., Hughes, A., ... Mill, J. (2018). Leveraging DNA-Methylation Quantitative-Trait Loci to Characterize the Relationship between Methylomic Variation, Gene Expression, and Complex Traits. *American Journal of Human Genetics*, 103(5), 654-665. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.007>



- Hawe, J. S., Wilson, R., Schmid, K. T., Zhou, L., Lakshmanan, L. N., ... Mu, T. C. (2022). Genetic variation influencing DNA methylation provides insights into molecular mechanisms regulating genomic function. *Nature Genetics*, 54(1), 18-29. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00969-x>
- Heijink, I. H., Kuchibhotla, V. N. S., Roffel, M. P., Maes, T., Knight, D. A., Sayers, I., & Nawijn, M. C. (2020). Epithelial cell dysfunction, a major driver of asthma development. *Allergy*, 75(8), 1902-1917. <https://doi.org/10.1111/all.14421>
- Hekking, P. W., Wener, R. R., Amelink, M., Zwinderman, A. H., Bouvy, M. L., & Bel, E. H. (2015). The prevalence of severe refractory asthma. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 135(4), 896-902. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.042>
- Hellings, P. W., Vandekerckhove, P., Claeys, R., Billen, J., Kasran, A., & Ceuppens, J. L. (2003). Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clinical & Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 33(10), 1457-1463. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01743.x>
- Hickman, E., & Jaspers, I. (2020). Current E-Cigarette Research in the Context of Asthma. *Current Allergy & Asthma Reports*, 20(10), Article 62. <https://doi.org/10.1007/s11882-020-00952-2>
- Hoglund, J., Hadizadeh, F., Ek, W. E., Karlsson, T., & Johansson, A. (2022). Gene-Based Variant Analysis of Whole-Exome Sequencing in Relation to Eosinophil Count. *Frontiers in Immunology*, 13, Article 862255. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.862255>
- Holbreich, M., Genuneit, J., Weber, J., Braun-Fahrländer, C., Waser, M., & Von Mutius, E. (2012). Amish children living in northern Indiana have a very low prevalence of allergic sensitization. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 129(6), 1671-1673. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.016>
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 673-683. <https://doi.org/10.1038/nm.2731>
- Hu, L. W., Yang, M., Chen, S., Shah, K., Hailegiorgis, Y., ... Dong, G. H. (2017). Effects of in utero and Postnatal Exposure to Secondhand Smoke on Lung Function by Gender and Asthma Status: The Seven Northeastern Cities (SNEC) Study. *Respiration*, 93(3), 189-197. <https://doi.org/10.1159/000455140>
- Hudon Thibeault, A.-A., & Laprise, C. (2019). Cell-Specific DNA Methylation Signatures in Asthma. *Genes*, 10(11), Article 932. <https://doi.org/10.3390/genes10110932>
- Institut canadien d'information sur la santé. (2018). Hospitalisations liées à l'asthme chez les enfants et les jeunes au Canada : tendances et inégalités. *Institut canadien d'information sur la santé/Canadian Institute for Health Information*. <https://www.cihi.ca/sites/default/files/document/asthma-hospitalization-children-2018-chartbook-fr-web.pdf>

- Ishigaki, K., Akiyama, M., Kanai, M., Takahashi, A., Kawakami, E., ... Kamatani, Y. (2020). Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. *Nature Genetics*, 52(7), 669-679. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0640-3>
- Ismaila, A., Blais, L., Dang-Tan, T., Zhang, S., Forget, A., ... Lemiere, C. (2019). Direct and indirect costs associated with moderate and severe asthma in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Respiratory, Critical Care, & Sleep Medicine*, 3(3), 134-142. <https://doi.org/10.1080/24745332.2018.1544839>
- Jia, G., Zhong, X., Im, H. K., Schoettler, N., Pividori, M., ... Solway, J. (2022). Discerning asthma endotypes through comorbidity mapping. *Nature Communications*, 13(1), Article 6712. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33628-8>
- Jia, X. X., Zhu, T. T., Huang, Y., Zeng, X. X., Zhang, H., & Zhang, W. X. (2019). Wnt/beta-catenin signaling pathway regulates asthma airway remodeling by influencing the expression of c-Myc and cyclin D1 via the p38 MAPK-dependent pathway. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 18(5), 3431-3438. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7991>
- Jiang, Y., Forno, E., Han, Y. Y., Xu, Z., Hu, D., ... Celedon, J. C. (2021). A genome-wide study of DNA methylation in white blood cells and asthma in Latino children and youth. *Epigenetics*, 16(5), 577-585. <https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1809872>
- Jin, B., & Robertson, K. D. (2013). DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. Dans A. Karpf, *Epigenetic Alterations in Oncogenesis. Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9967-2_1)
- Johansson, A., Rask-Andersen, M., Karlsson, T., & Ek, W. E. (2019). Genome-wide association analysis of 350 000 Caucasians from the UK Biobank identifies novel loci for asthma, hay fever and eczema. *Human Molecular Genetics*, 28(23), 4022-4041. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz175>
- Johansson, M. W. (2014). Activation states of blood eosinophils in asthma. *Clinical & Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy & Clinical Immunology*, 44(4), 482-498. <https://doi.org/10.1111/cea.12292>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews. Genetics*, 13(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kachuri, L., Jeon, S., DeWan, A. T., Metayer, C., Ma, X., ... de Smith, A. J. (2021). Genetic determinants of blood-cell traits influence susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Human Genetics*, 108(10), 1823-1835. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.08.004>
- Kang, M. J., Yu, H. S., Seo, J. H., Kim, H. Y., Jung, Y. H., ... Hong, S. J. (2012). GSDMB/ORMDL3 variants contribute to asthma susceptibility and eosinophil-mediated bronchial hyperresponsiveness. *Human Immunology*, 73(9), 954-959. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2012.06.009>



- Kaur, R., & Chupp, G. (2019). Phenotypes and endotypes of adult asthma: Moving toward precision medicine. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 144(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.05.031>
- Kawabe, T., Matsushima, M., Hashimoto, N., Imaizumi, K., & Hasegawa, Y. (2011). CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya Journal of Medical Science*, 73(3-4), 69-78. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831216/>
- Keselman, A., & Heller, N. (2015). Estrogen Signaling Modulates Allergic Inflammation and Contributes to Sex Differences in Asthma. *Frontiers in Immunology*, 6, Article 568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00568>
- Kichaev, G., Bhatia, G., Loh, P. R., Gazal, S., Burch, K., ... Price, A. L. (2019). Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *American Journal of Human Genetics*, 104(1), 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.11.008>
- Kim, J. H., Park, B. L., Cheong, H. S., Pasaje, C. F., Bae, J. S., ... Shin, H. D. (2011). Variations in the STK10 gene and possible associations with aspirin-intolerant asthma in a Korean population. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 21(5), 378-388. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21905501>
- Kim, K. W., Park, S.-C., Cho, H.-J., Jang, H., Park, J., ... Sohn, M. H. (2021). Integrated genetic and epigenetic analyses uncover MSI2 association with allergic inflammation. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 147(4), 1453-1463. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.040>
- Komlósi, Z. I., Van de Veen, W., Kovács, N., Szűcs, G., Sokolowska, M., ... Akdis, C. A. (2022). Cellular and molecular mechanisms of allergic asthma. *Molecular Aspects of Medicine*, 85, Article 100995. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100995>
- Korytina, G. F., Akhmadishina, L. Z., Kochetova, O. V., Nasibullin, T. R., Aznabaeva, Y. G., ... Victorova, T. V. (2021). Role of Neurotransmitter System Genes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Russian Journal of Genetics*, 57(11), 1294-1303. <https://doi.org/10.1134/S1022795421110065>
- Kottyan, L. C., Collier, A. R., Cao, K. H., Niese, K. A., Hedgebeth, M., ... Zimmermann, N. (2009). Eosinophil viability is increased by acidic pH in a cAMP- and GPR65-dependent manner. *Blood*, 114(13), 2774-2782. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-220681>
- Kovats, S. (2015). Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. *Cellular Immunology*, 294(2), 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.01.018>
- Kreibich, E., Kleinendorst, R., Barzaghi, G., Kaspar, S., & Krebs, A. R. (2023). Single-molecule footprinting identifies context-dependent regulation of enhancers by DNA methylation. *Molecular Cell*, 83(5), 787-802 e789. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.01.017>
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>

- Kuruville, M. E., Lee, F. E., & Lee, G. B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(2), 219-233. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>
- Lambrecht, B. N., Hammad, H., & Fahy, J. V. (2019). The Cytokines of Asthma. *Immunity*, 50(4), 975-991. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.018>
- Laprise, C. (2014). The Saguenay-Lac-Saint-Jean asthma familial collection: the genetics of asthma in a young founder population. *Genes & Immunity*, 15(4), 247-255. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.12>
- Larouche, M., Gagne-Ouellet, V., Boucher-Lafleur, A. M., Larose, M. C., Plante, S., ... Laprise, C. (2018). Methylation profiles of IL33 and CCL26 in bronchial epithelial cells are associated with asthma. *Epigenomics*, 10(12), 1555-1568. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0044>
- Lawson, J. A., Janssen, I., Bruner, M. W., Madani, K., & Pickett, W. (2011). Urban-rural differences in asthma prevalence among young people in Canada: the roles of health behaviors and obesity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 107(3), 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2011.06.014>
- Lawson, J. A., Rennie, D. C., Cockcroft, D. W., Dyck, R., Afanasieva, A., Oluwole, O., & Afsana, J. (2017). Childhood asthma, asthma severity indicators, and related conditions along an urban-rural gradient: a cross-sectional study. *BMC pulmonary medicine*, 17(1), Article 4. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0355-5>
- Lean, M. E., Han, T. S., & Morrison, C. E. (1995). Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*, 311(6998), 158-161. <https://doi.org/10.1136/bmj.311.6998.158>
- Lei, J., & Shao, M. (2022). Marijuana smoking and asthma: a protocol for a meta-analysis. *BMJ open*, 12(1), Article e047324. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-047324>
- Leynaert, B., Le Moual, N., Neukirch, C., Siroux, V., & Varraso, R. (2019). Facteurs environnementaux favorisant le développement d'un asthme. *La Presse Médicale*, 48(3), 262-273. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.02.022>
- Liang, L., Willis-Owen, S. A. G., Laprise, C., Wong, K. C. C., Davies, G. A., ... Cookson, W. (2015). An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. *Nature*, 520(7549), 670-674. <https://doi.org/10.1038/nature14125>
- Lilly, C. M., Nakamura, H., Kesselman, H., Nagler-Anderson, C., Asano, K., ... Luster, A. D. (1997). Expression of eotaxin by human lung epithelial cells: induction by cytokines and inhibition by glucocorticoids. *Journal of clinical investigation*, 99(7), 1767-1773. <https://doi.org/10.1172/jci119341>

- Liu, S., Zhou, B., Wang, Y., Wang, K., Zhang, Z., & Niu, W. (2020). Pre-pregnancy Maternal Weight and Gestational Weight Gain Increase the Risk for Childhood Asthma and Wheeze: An Updated Meta-Analysis. *Frontiers in pediatrics*, 8, Article 134. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00134>
- Lloyd, C. M., & Hessel, E. M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews. Immunology*, 10(12), 838-848. <https://doi.org/10.1038/nri2870>
- Lutz, S. M., Cho, M. H., Young, K., Hersh, C. P., Castaldi, P. J., ... Silverman, E. K. (2015). A genome-wide association study identifies risk loci for spirometric measures among smokers of European and African ancestry. *BMC genetics*, 16, Article 138. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0299-4>
- Mahmoudi, M. (2019). *Allergy and asthma : the basics to best practices* (1). Cham, Switzerland : Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58726-4>
- Maitland, M. E. R., Lajoie, G. A., Shaw, G. S., & Schild-Poulter, C. (2022). Structural and Functional Insights into GID/CTLH E3 Ligase Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), Article 5863. <https://doi.org/10.3390/ijms23115863>
- Malakooti, J., Dahdal, R. Y., Dudeja, P. K., Layden, T. J., & Ramaswamy, K. (2001). The human Na(+)/H(+) exchanger NHE2 gene: genomic organization and promoter characterization. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 280(4), G763-773. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.4.G763>
- Marone, G., Granata, F., Pucino, V., Pecoraro, A., Heffler, E., ... Varricchi, G. (2019). The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. *Frontiers in pharmacology*, 10, Article 1387. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01387>
- Mathieu, E. L., Belhocine, M., Dao, L. T., Puthier, D., & Spicuglia, S. (2014). Functions of lncRNA in development and diseases. *Médecine sciences*, 30(8-9), 790-796. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143008018>
- McAleer, J. P., & Kolls, J. K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *European Journal of Immunology*, 48(1), 39-49. <https://doi.org/10.1002/eji.201646721>
- McBrien, C. N., & Menzies-Gow, A. (2017). The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00093>
- Miethe, S., Karsonova, A., Karaulov, A., & Renz, H. (2020). Obesity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(4), 685-693. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.08.011>
- Milacic, M., Beavers, D., Conley, P., Gong, C., Gillespie, M., ... D'Eustachio, P. (2024). The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D672-D678. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1025>
- Mirabelli, M. C., Beavers, S. F., Chatterjee, A. B., & Moorman, J. E. (2013). Age at asthma onset and subsequent asthma outcomes among adults with active asthma. *Respiratory Medicine*, 107(12), 1829-1836. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.09.022>

- Mohamed, W. I., Park, S. L., Rabl, J., Leitner, A., Boehringer, D., & Peter, M. (2021). The human GID complex engages two independent modules for substrate recruitment. *EMBO Reports*, 22(11), Article e52981. <https://doi.org/10.15252/embr.202152981>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morin, A. (2012). *Étude d'association entre l'asthme et les gènes associés à ce phénotype et à la pollution de l'air, dans un échantillon d'asthme provenant d'un environnement régional caractérisé par différentes industries* [Mémoire de maîtrise]. Université du Québec à Chicoutimi, <https://constellation.uqac.ca/id/eprint/2524/>. constellation.uqac.ca.
- Motika, C. A., Papachristou, C., Abney, M., Lester, L. A., & Ober, C. (2011). Rising prevalence of asthma is sex-specific in a US farming population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(4), 774-779. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.046>
- Nasreen, S., Wilk, P., Mullowney, T., & Karp, I. (2019). Asthma exacerbation trajectories and their predictors in children with incident asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 123(3), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2019.05.013>
- Nishiyama, A., Yamaguchi, L., & Nakanishi, M. (2016). Regulation of maintenance DNA methylation via histone ubiquitylation. *Journal of Biochemistry*, 159(1), 9-15. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv113>
- Ober, C., Sperling, A. I., Von Mutius, E., & Vercelli, D. (2017). Immune development and environment: lessons from Amish and Hutterite children. *Current Opinion in Immunology*, 48, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.08.003>
- Olafsdottir, T. A., Theodors, F., Bjarnadottir, K., Bjornsdottir, U. S., Agustsdottir, A. B., ... Stefansson, K. (2020). Eighty-eight variants highlight the role of T cell regulation and airway remodeling in asthma pathogenesis. *Nature communications*, 11(1), 393. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14144-8>
- Organisation mondiale de la Santé. (2023, 06-04-2024). Asthma. Repéré le 28-02-2023 à <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/asthma>
- Pan, Y., Liu, L., Li, S., Wang, K., Ke, R., ... Li, M. (2018). Activation of AMPK inhibits TGF- $\beta$ 1-induced airway smooth muscle cells proliferation and its potential mechanisms. *Scientific Reports*, 8(1), Article 3624. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21812-0>
- Parasuraman, G., Ayyasamy, L., Aune, D., Sen, A., Nagarajan, R., ... Sivaprakasam, S. (2023). The association between body mass index, abdominal fatness, and weight change and the risk of adult asthma: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Scientific Reports*, 13(1), Article 7745. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31373-6>

- Park, H. W., Ge, B., Tse, S., Grundberg, E., Pastinen, T., Kelly, H. W., & Tantisira, K. G. (2015). Genetic risk factors for decreased bone mineral accretion in children with asthma receiving multiple oral corticosteroid bursts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1240-1246. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.04.014>
- Patel, R., Solatikia, F., Zhang, H., Wolde, A., Kadalayil, L., ... Holloway, J. W. (2021). Sex-specific associations of asthma acquisition with changes in DNA methylation during adolescence. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 51(2), 318-328. <https://doi.org/10.1111/cea.13776>
- Pattenden, S., Antova, T., Neuberger, M., Nikiforov, B., De Sario, M., ... Fletcher, T. (2006). Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure. *Tobacco Control*, 15(4), 294-301. <https://doi.org/10.1136/tc.2005.015065>
- Pelaia, C., Paoletti, G., Puggioni, F., Racca, F., Pelaia, G., Canonica, G. W., & Heffler, E. (2019). Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Frontiers in Physiology*, 10, Article 1514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01514>
- Peters, U., Dixon, A. E., & Forno, E. (2018). Obesity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(4), 1169-1179. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.004>
- Pham, J., Hew, M., & Dharmage, S. C. (2021). Is ethnicity a 'treatable trait' in asthma? *Respirology*, 26(6), 529-531. <https://doi.org/10.1111/resp.14058>
- Pickrell, J. K., Berisa, T., Liu, J. Z., Segurel, L., Tung, J. Y., & Hinds, D. A. (2016). Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits. *Nature Genetics*, 48(7), 709-717. <https://doi.org/10.1038/ng.3570>
- Pividori, M., Schoettler, N., Nicolae, D. L., Ober, C., & Im, H. K. (2019). Shared and distinct genetic risk factors for childhood-onset and adult-onset asthma: genome-wide and transcriptome-wide studies. *Lancet Respiratory Medicine*, 7(6), 509-522. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30055-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30055-4)
- Polinski, K. J., Bell, G. A., Trinh, M. H., Sundaram, R., Mendola, P., ... Yeung, E. H. (2022). Maternal obesity, gestational weight gain, and offspring asthma and atopy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 129(2), 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.04.032>
- Poon, A. H., Houseman, E. A., Ryan, L., Sparrow, D., Vokonas, P. S., & Litonjua, A. A. (2014). Variants of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Genes and Lung Function Decline in Aging. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(7), 907-913. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt179>
- Postma, D. S. (2007). Gender differences in asthma development and progression. *Gender Medicine*, 4(2), S133-146. [https://doi.org/10.1016/s1550-8579\(07\)80054-4](https://doi.org/10.1016/s1550-8579(07)80054-4)

- Potaczek, D. P., Unger, S. D., Zhang, N., Taka, S., Michel, S., ... Renz, H. (2019). Development and characterization of DNzyme candidates demonstrating significant efficiency against human rhinoviruses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(4), 1403-1415. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.026>
- Rao, S. P., Ge, X. N., & Sriramarao, P. (2017). Regulation of Eosinophil Recruitment and Activation by Galectins in Allergic Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4, Article 68. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00068>
- Rathod, A., Zhang, H., Arshad, S. H., Ewart, S., Relton, C. L., Karmaus, W., & Holloway, J. W. (2022). DNA Methylation and Asthma Acquisition during Adolescence and Post-Adolescence, an Epigenome-Wide Longitudinal Study. *Journal of Personalized Medicine*, 12(2), Article 202. <https://doi.org/10.3390/jpm12020202>
- Recto, K., Kachroo, P., Huan, T., Van Den Berg, D., Lee, G. Y., ... DeMeo, D. L. (2023). Epigenome-wide DNA methylation association study of circulating IgE levels identifies novel targets for asthma. *EBioMedicine*, 95, Article 104758. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104758>
- Reese, S. E., Xu, C. J., Den Dekker, H. T., Lee, M. K., Sikdar, S., ... London, S. J. (2019). Epigenome-wide meta-analysis of DNA methylation and childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(6), 2062-2074. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.043>
- Ripple, W. J., Wolf, C., Newsome, T. M., Galetti, M., Alamgir, M., ... Laurance, W. F. (2017). World Scientists' Warning to Humanity: A Second Notice. *BioScience*, 67(12), 1026-1028. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix125>
- Rochat, T. (2005). L'asthme intrinsèque ou non atopique est-il une entité à part ? *Revue Médicale Suisse*, 1(41), 2640-2643. <https://doi.org/10.53738/REVMED.2005.1.41.2640>
- Rodriguez-Rodriguez, N., Gogoi, M., & McKenzie, A. N. J. (2021). Group 2 Innate Lymphoid Cells: Team Players in Regulating Asthma. *Annual Review of Immunology*, 39, 167-198. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-110119-091711>
- Roio, L. C. D., Mizutani, R. F., Pinto, R. C., Terra-Filho, M., & Santos, U. P. (2021). Work-related asthma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia : Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*, 47(4), Article e20200577. <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20200577>
- Rossetto, D., Avvakumov, N., & Côté, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098-1108. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
- Ruano, G., Duconge, J., Windemuth, A., Cadilla, C. L., Kocherla, M., ... Santiago-Borrero, P. J. (2009). Physiogenomic analysis of the Puerto Rican population. *Pharmacogenomics*, 10(4), 565-577. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.5>



- Safar, R., Oussalah, A., Mayorga, L., Vieths, S., Barber, D., Torres, M. J., & Gueant, J. L. (2023). Epigenome alterations in food allergy: A systematic review of candidate gene and epigenome-wide association studies. *Clinical & Experimental Allergy*, 53(3), 259-275. <https://doi.org/10.1111/cea.14277>
- Sakaue, S., Kanai, M., Tanigawa, Y., Karjalainen, J., Kurki, M., ... Okada, Y. (2021). A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes. *Nature Genetics*, 53(10), 1415-1424. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00931-x>
- Scott, H. A., Wood, L. G., & Gibson, P. G. (2017). Role of Obesity in Asthma: Mechanisms and Management Strategies. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17(8), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0719-9>
- Selle, J., Dinger, K., Jentgen, V., Zanetti, D., Will, J., ... Alejandre Alcazar, M. A. (2022). Maternal and perinatal obesity induce bronchial obstruction and pulmonary hypertension via IL-6-FoxO1-axis in later life. *Nature Communications*, 13(1), Article 4352. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31655-z>
- Seys, S. F., & Long, M. B. (2022). The quest for biomarkers in asthma: challenging the T2 versus non-T2 paradigm. *The European respiratory journal*, 59(2), Article 2102669. <https://doi.org/10.1183/13993003.02669-2021>
- Shen, Z. J., Hu, J., O'Neal, M. A., & Malter, J. S. (2021). Pin1 Regulates IL-5 Induced Eosinophil Polarization and Migration. *Cells*, 10(2), Article 221. <https://doi.org/10.3390/cells10020211>
- Shrine, N., Izquierdo, A. G., Chen, J., Packer, R., Hall, R. J., ... Consortium Lead Principal, I. (2023). Multi-ancestry genome-wide association analyses improve resolution of genes and pathways influencing lung function and chronic obstructive pulmonary disease risk. *Nature Genetics*, 55(3), 410-422. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01314-0>
- Shrine, N., Portelli, M. A., John, C., Soler Artigas, M., Bennett, N., ... Sayers, I. (2019). Moderate-to-severe asthma in individuals of European ancestry: a genome-wide association study. *The Lancet. Respiratory medicine*, 7(1), 20-34. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(18\)30389-8](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(18)30389-8)
- Shufang, L., Bo, Z., Yunfeng, W., Kundi, W., Zhixin, Z., & Wenquan, N. (2020). Pre-pregnancy Maternal Weight and Gestational Weight Gain Increase the Risk for Childhood Asthma and Wheeze: An Updated Meta-Analysis. *Frontiers in Pediatrics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00134>
- Shukla, S. D., Budden, K. F., Neal, R., & Hansbro, P. M. (2017). Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clinical & Translational Immunology*, 6(3), Article e133. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.6>
- Sim, S., Choi, Y., Lee, D.-H., Lee, H.-R., Seob Shin, Y., & Park, H.-S. (2022). Contribution of dipeptidyl peptidase 10 to airway dysfunction in patients with NSAID-exacerbated respiratory disease. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 52(1), 115-126. <https://doi.org/10.1111/cea.14003>

- Simard, M., Madore, A. M., Girard, S., Wasserman, S., Duan, Q., ... Laprise, C. (2021). Polygenic risk score for atopic dermatitis in the Canadian population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(1), 406-409. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.057>
- Sokolowska, M., Frei, R., Lunjani, N., Akdis, C. A., & O'Mahony, L. (2018). Microbiome and asthma. *Asthma Research and Practice*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s40733-017-0037-y>
- Sollis, E., Mosaku, A., Abid, A., Buniello, A., Cerezo, M., ... Harris, L. W. (2023). The NHGRI-EBI GWAS Catalog: knowledgebase and deposition resource. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D977-D985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1010>
- Sridhar, V. V., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., ... Zhu, J. K. (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*, 447(7145), 735-738. <https://doi.org/10.1038/nature05864>
- Stämpfli, M. R., & Anderson, G. P. (2009). How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nature reviews. Immunology*, 9(5), 377-384. <https://doi.org/10.1038/nri2530>
- Statistique Canada. (2015). *Asthme, 2014* [Information archivée]. Statistique Canada,. Repéré le 28-02-2023 à <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-625-x/2015001/article/14179-fra.htm>
- Statistique Canada. (2022). *Asthme, selon le groupe d'âge (13-10-0096-08)* [Données d'enquête]. Statistique Canada,. Repéré le 28-02-2023 à <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=1310009608&pickMembers%5B0%5D=1.1&pickMembers%5B1%5D=3.1&cubeTimeFrame.startYear=2020&cubeTimeFrame.endYear=2021&referencePeriods=20200101%2C20210101>
- Stefanowicz, D., Hackett, T. L., Garmaroudi, F. S., Gunther, O. P., Neumann, S., ... Knight, D. A. (2012). DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. *PLoS One*, 7(9), Article e44213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044213>
- Stein, M. M., Hrusch, C. L., Gozdz, J., Igartua, C., Pivniouk, V., ... Sperling, A. I. (2016). Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *New England Journal of Medicine*, 375(5), 411-421. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508749>
- Strzelak, A., Ratajczak, A., Adamiec, A., & Feleszko, W. (2018). Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), Article 1033. <https://doi.org/10.3390/ijerph15051033>
- Su, Z., Marin, M., Sayani, A., & Ismaila, A. (2013). Clinical, economic, and humanistic burden of asthma in Canada: a systematic review. *BMC Pulmonary Medicine*, 13(1), 1-23. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-13-70>



- Sunadome, H., Matsumoto, H., Izuhara, Y., Nagasaki, T., Kanemitsu, Y., ... Hirai, T. (2020). Correlation between eosinophil count, its genetic background and body mass index: The Nagahama Study. *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology*, 69(1), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2019.05.012>
- Taka, S., Tzani-Tzanopoulou, P., Wanstall, H., & Papadopoulos, N. G. (2020). MicroRNAs in Asthma and Respiratory Infections: Identifying Common Pathways. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 12(1), 4-23. <https://doi.org/10.4168/aaair.2020.12.1.4>
- Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., & Tajima, S. (2011). Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(22), 9055-9059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019629108>
- Tashkin, D. P., Tan, & Wan-Cheng Division of Respiratory Medicine Department of Medicine University of British Columbia Kelowna B. C. Canada. (2022). Inhaled Marijuana and the Lung. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 10(11), 2822-2829. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2022.05.009>
- Thomsen, S. F., Van Der Sluis, S., Kyvik, K. O., Skytthe, A., & Backer, V. (2010). Estimates of asthma heritability in a large twin sample. *Clinical & Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 40(7), 1054-1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03525.x>
- Tiotiu, A. I., Novakova, S., Labor, M., Emelyanov, A., Mihaicuta, S., Novakova, P., & Nedeva, D. (2020). Progress in Occupational Asthma. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 17(12), Article 4553. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124553>
- Tompkins, J. D., Hall, C., Chen, V. C., Li, A. X., Wu, X., ... Riggs, A. D. (2012). Epigenetic stability, adaptability, and reversibility in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(31), 12544-12549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209620109>
- Townsend, E. A., Miller, V. M., & Prakash, Y. S. (2012). Sex Differences and Sex Steroids in Lung Health and Disease. *Endocrine Reviews*, 33(1), 1-47. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0031>
- Trerotola, M., Relli, V., Simeone, P., & Alberti, S. (2015). Epigenetic inheritance and the missing heritability. *Human Genomics*, 9(1), Article 17. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0041-3>
- Turkalj, M., Erceg, D., & Dubravčić, I. D. (2018). Noninvasive Biomarkers of Asthma. Dans H. Kuan-Hsiang Gary, & T. Chen Hsuan Sherry (Éds.), *Asthma Diagnosis and Management - Approach Based on Phenotype and Endotype*. InTech. <http://resolver.ebscohost.com/Redirect/PRL?EPPackageLocationID=4377.19089780.42336650&epcustomerid=s8491974&db=4377>
- Ullemar, V., Magnusson, P. K., Lundholm, C., Zettergren, A., Melen, E., Lichtenstein, P., & Almqvist, C. (2016). Heritability and confirmation of genetic association studies for childhood asthma in twins. *Allergy*, 71(2), 230-238. <https://doi.org/10.1111/all.12783>

- Vatrella, A., Maglio, A., Pelaia, C., Ciampo, L., Pelaia, G., & Vitale, C. (2022). Eosinophilic inflammation: An Appealing Target for Pharmacologic Treatments in Severe Asthma. *Biomedicines*, 10(9), Article 2181. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092181>
- Villicaña, S., & Bell, J. T. (2021). Genetic impacts on DNA methylation: research findings and future perspectives. *Genome Biology*, 22(1), Article 127. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02347-6>
- Von Mutius, E. (2021). The "Hygiene Hypothesis" and the Lessons Learnt From Farm Studies. *Frontiers in Immunology*, 12, Article 635522. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.635522>
- Vuckovic, D., Bao, E. L., Akbari, P., Lareau, C. A., Mousas, A., ... Soranzo, N. (2020). The Polygenic and Monogenic Basis of Blood Traits and Diseases. *Cell*, 182(5), 1214-1231. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.008>
- Wan, Y. I., Shrine, N. R., Soler Artigas, M., Wain, L. V., Blakey, J. D., ... Hall, I. P. (2012). Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma. *Thorax*, 67(9), 762-768. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-201262>
- Wang, A. L. M. D., Datta, S. M. S., Weiss, S. T. M. D., & Tantisira, K. G. M. D. (2019). Remission of persistent childhood asthma: Early predictors of adult outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(5), 1752-1759. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.038>
- Wills, T. A., Soneji, S. S., Choi, K., Jaspers, I., & Tam, E. K. (2021). E-cigarette use and respiratory disorders: an integrative review of converging evidence from epidemiological and laboratory studies. *The European Respiratory Journal*, 57(1), Article 1901815. <https://doi.org/10.1183/13993003.01815-2019>
- Wohlford, E. M., Borrell, L. N., Elhawary, J. R., Plotkin, B., Oh, S. S., ... Burchard, E. G. (2020). Differential asthma odds following respiratory infection in children from three minority populations. *PloS one*, 15(5), Article e0231782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231782>
- Wu, K., Gamazon, E. R., Im, H. K., Geeleher, P., White, S. R., ... Huang, R. S. (2014). Genome-wide interrogation of longitudinal FEV1 in children with asthma. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 190(6), 619-627. <https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0460OC>
- Wu, Y.-L., Lin, Z.-J., Li, C.-C., Lin, X., Shan, S.-K., ... Li, Z.-h. (2023). Epigenetic regulation in metabolic diseases: mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), Article 98. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01333-7>
- Xu, C., Wu, X., Lu, M., Tang, L., Yao, H., ... Wu, X. (2019). Protein tyrosine phosphatase 11 acts through RhoA/ROCK to regulate eosinophil accumulation in the allergic airway. *FASEB J*, 33(11), 11706-11720. <https://doi.org/10.1096/fj.201900698R>
- Xu, C. J., Gruzjeva, O., Qi, C., Esplugues, A., Gehring, U., ... Koppelman, G. H. (2021). Shared DNA methylation signatures in childhood allergy: The MeDALL study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(3), 1031-1040. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.11.044>

- Xu, C. J., Soderhall, C., Bustamante, M., Baiz, N., Gruziova, O., ... Koppelman, G. H. (2018). DNA methylation in childhood asthma: an epigenome-wide meta-analysis. *Lancet Respiratory Medicine*, 6(5), 379-388. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30052-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30052-3)
- Xu, W., Wang, F., Yu, Z., & Xin, F. (2016). Epigenetics and Cellular Metabolism. *Genetics & Epigenetics*, 8, 43-51. <https://doi.org/10.4137/geg.S32160>
- Yamauchi, K., & Ogasawara, M. (2019). The Role of Histamine in the Pathophysiology of Asthma and the Clinical Efficacy of Antihistamines in Asthma Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), Article 1733. <https://doi.org/10.3390/ijms20071733>
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D. D., Lay, F. D., Jones, P. A., & Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell*, 26(4), 577-590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>
- Ying, S., Robinson, D. S., Meng, Q., Rottman, J., Kennedy, R., ... Kay, A. B. (1997). Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *European Journal of Immunology*, 27(12), 3507-3516. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271252>
- Zhang, H., Kaushal, A., Merid, S. K., Melen, E., Pershagen, G., ... Holloway, J. W. (2019). DNA methylation and allergic sensitizations: A genome-scale longitudinal study during adolescence. *Allergy*, 74(6), 1166-1175. <https://doi.org/10.1111/all.13746>
- Zhang, Y., Saradna, A., Ratan, R., Ke, X., Tu, W., ... Gao, P. (2020). RhoA/Rho-kinases in asthma: from pathogenesis to therapeutic targets. *Clinical & Translational Immunology*, 9(5), Article e01134. <https://doi.org/10.1002/cti2.1134>
- Zheng, P., Zhang, B., Zhang, K., Lv, X., Wang, Q., & Bai, X. (2020). The Impact of Air Pollution on Intestinal Microbiome of Asthmatic Children: A Panel Study. *BioMed Research International*, Article 5753427. <https://doi.org/10.1155/2020/5753427>
- Zhou, Y., Liang, Z. S., Jin, Y., Ding, J., Huang, T., ... Huang, J. (2021). Shared Genetic Architecture and Causal Relationship Between Asthma and Cardiovascular Diseases: A Large-Scale Cross-Trait Analysis. *Frontiers in Genetics*, 12, Article 775591. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.775591>
- Zhu, W.-J., Ma, H.-X., Cui, H.-Y., Lu, X., Shao, M.-J., ... Chen, Y.-Z. (2015). Prevalence and Treatment of Children's Asthma in Rural Areas Compared with Urban Areas in Beijing. *Chinese Medical Journal*, 128(17), 2273-2277. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.163381>
- Zhu, X., Wei, Y., & Dong, J. (2020). Long Noncoding RNAs in the Regulation of Asthma: Current Research and Clinical Implications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 532849. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.532849>

- Zhu, Z., Guo, Y., Shi, H., Liu, C. L., Panganiban, R. A., ... Liang, L. (2020). Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(2), 537-549. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.09.035>
- Zhu, Z., Lee, P. H., Chaffin, M. D., Chung, W., Loh, P. R., ... Liang, L. (2018). A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases. *Nature Genetics*, 50(6), 857-864. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0121-0>
- Zhu, Z., Zhu, X., Liu, C. L., Shi, H., Shen, S., ... Liang, L. (2019). Shared genetics of asthma and mental health disorders: a large-scale genome-wide cross-trait analysis. *The European Respiratory Journal*, 54(6), Article 1901507. <https://doi.org/10.1183/13993003.01507-2019>

# **CERTIFICATION ÉTHIQUE**

Ce mémoire a fait l'objet d'une certification éthique. Les numéros du certificat sont : 0002-001 ainsi que le 2015-035.

# ANNEXE 1

## Supplementary Tables

**Table 9.** Summary of significant *trans*- methylation quantitative trait loci (*trans*-mQTL; FDR<0.05)

CpG <sup>a</sup>	Number of variants	Most significant variant association with CpG <sup>b</sup>						
		Variant ID	Variant's Chr	HGVS ID	Beta	FDR	Variant's nearest gene <sup>c</sup>	Functional category <sup>d</sup>
Chr1:37,499,363	1	rs77885290	13	g.97232105G>A	-1.35E-01	4.28E-02	<i>HS6ST3</i>	Other
Chr1:6,267,177	2	rs34208922	7	g.73483532del	-9.23E-02	4.28E-02	<i>ELN</i>	Respiratory function
	1	rs2855726	7	g.73517114G>A	-8.24E-02	4.55E-02	<i>LIMK1</i>	Nervous and behavior function
Chr2:103,279,574	1	rs186446426	5	g.172219600T>G	-1.09E-01	6.54E-03	21,397 pb from <i>DUSP1</i> 5' end	Immune response and respiratory function
	1	rs79837060	20	g.23144430G>A	-1.82E-01	1.62E-02	31,157 pb from <i>LINC00656</i> 5' end	Regulation post-transcription
	1	rs74913622	1	g.200322948T>C	-2.92E-01	1.78E-02	<i>LINC00862</i>	Regulation post-transcription
	1	rs10499796	7	g.68052769G>C	-6.93E-02	3.53E-02	1,011,136 pb from <i>AUTS2</i> 5' end	Other
	1	rs1870312	5	g.172254984G>C	-6.05E-02	4.42E-02	<i>ERGIC1</i>	Nervous and behavior function
	2	rs115140428	2	g.35736223A>G	-1.96E-01	1.27E-02	845,669 pb from <i>CRIM1-DT</i> 3' end	Other
Chr4:1,320,665	1	rs563695676	7	g.155969532G>A	3.93E-01	2.22E-02	260,951 pb from <i>LOC285889</i> 3' end	Other
	1	rs140502663	7	g.49490726G>T	4.77E-01	2.88E-02	322,531 pb from <i>VWC2</i> 5' end	Cell adhesion

	1	rs62381983	5	g.171583978C>A	2.15E-01	3.30E-02	<i>STK10</i>	Immune response
	1	rs117805873	3	g.39484638G>A	2.85E-01	4.28E-02	24,426 bp from <i>MOBP</i> 5' end	Nervous and behavior function
	2	rs139713110	13	g.30241088T>C	5.30E-01	4.42E-02	71,263 bp from <i>SLC7A1</i> 5' end	Individual aging and mortality
	1	rs117864927	13	g.30256917C>T	5.30E-01	4.42E-02	81,628 bp from <i>UBL3</i> 3' end	Protein binding
	2	rs111565254	3	g.102259723G>C	3.81E-01	4.37E-02	61,038 bp from <i>ZPLD1</i> 3' end	Nervous and behavior function
	1	rs141153206	9	g.106876389A>T	3.87E-01	4.40E-02	<i>SMC2</i>	Nervous and behavior function
	13	rs12187959	5	g.32905336C>A	1.13E-01	3.71E-02	42,213 bp from <i>LINC02120</i> 5' end	Regulation post-transcription
	35	rs74103865	13	g.88167786T>A	-5.28E-02	4.28E-02	<i>MIR4500HG</i>	Regulation post-transcription
	31	rs117276462	18	g.5437006G>A	-1.70E-01	4.41E-03	<i>EPB41L3</i>	Nervous and behavior function
	29	rs191187223	20	g.53552619C>T	-2.11E-01	4.42E-02	284,909 bp from <i>DOK5</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
	17	rs11448780	4	g.171395060insA	-2.46E-01	2.72E-03	383,687 bp from <i>AADAT</i> 5' end	Nervous and behavior function
	15	rs75914892	1	g.49040091G>A	-2.06E-01	4.17E-04	<i>AGBL4</i>	Immune response
Chr7:100,027,356	15	rs75719109	5	g.929675G>T	-2.60E-01	7.30E-08	11,511 bp from <i>TRIP13</i> 3' end	Immune response
	13	rs541388781	6	g.126672045del	-2.28E-01	2.51E-05	2,290 bp from <i>CENPW</i> 3' end	Protein binding
	11	rs72704358	14	g.94779725G>T	-9.59E-02	4.56E-02	<i>SERPINA6</i>	Non protein/Non DNA binding
	10	rs113814869	9	g.35020195C>T	-1.72E-01	4.58E-02	20,907 bp from <i>C9orf131</i> 5' end	Other
	9	rs760933548	9	g.28070305T>G	-1.61E-01	1.10E-02	<i>LINGO2</i>	Nervous and behavior function

8	rs59977043	16	g.57045805C>T	-1.73E-01	4.40E-02	<i>NLRC5</i>	Immune response
8	rs17669032	1	g.198653174A>G	-6.22E-02	1.27E-02	<i>PTPRC</i>	Immune response and respiratory function
8	rs7996973	13	g.24678102G>C	-1.15E-01	3.34E-03	<i>SPATA13</i>	Homeostasis and metabolism
8	rs7709665	5	g.797609G>A	-1.88E-01	1.43E-04	<i>ZDHHC11</i>	Immune response
7	rs117606004	20	g.44812456C>T	-1.90E-01	8.87E-05	<i>CDH22</i>	Cell adhesion
7	rs111468479	4	g.97724958_97724963insCACATG	-1.73E-01	4.42E-02	563,120 bp from <i>STPG2-AS1</i> 5' end	Other
7	rs112451219	9	g.35054498T>C	-1.72E-01	4.58E-02	<i>VCP</i>	Immune response
7	rs139494445	8	g.135641788G>C	-2.68E-01	1.17E-04	<i>ZFAT</i>	Immune response
6	rs117292410	9	g.34987183G>T	-1.72E-01	4.58E-02	<i>DNAJB5</i>	Nervous and behavior function
6	rs191842414	5	g.88478788G>A	-1.73E-01	2.51E-03	278,866 bp from <i>MEF2C</i> 5' end	Immune response and respiratory function
6	rs73432450	15	g.72055493A>G	-6.28E-02	2.68E-02	<i>THSD4</i>	Respiratory function
5	rs369531126	9	g.74320734_74320735insTA	-1.16E-01	4.17E-04	<i>CEMIP2</i>	Cell adhesion
5	rs544853117	2	g.79877311G>C	-1.56E-01	1.15E-04	<i>CTNNA2</i>	Nervous and behavior function
5	rs10253107	7	g.13444332G>A	-1.43E-01	1.23E-02	486,524 bp from <i>ETV1</i> 3' end	Nervous and behavior function
5	rs188708607	9	g.34964298C>T	-1.72E-01	4.58E-02	<i>PHF24</i>	Homeostasis and metabolism
5	rs7641913	3	g.176686504G>C	-7.34E-02	3.29E-02	52,038 bp from <i>TBL1XR1</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
4	rs117429509	16	g.87044447G>A	-2.68E-01	1.15E-04	291,957 bp from <i>C16orf95</i> 3' end	Other
4	rs2623151	8	g.95237426G>A	-1.80E-01	4.58E-02	7,895 bp from <i>CDH17</i> 5' end	Immune response
4	rs73374814	18	g.4482419T>C	-2.31E-01	2.20E-05	27,153 bp from <i>DLGAP1</i> 5' end	Nervous and behavior function



4	rs531186421	8	g.139522667A>G	-1.17E-01	2.68E-02	13,602 bp from <i>FAM135B</i> 5' end	Nervous and behavior function
4	rs76457209	14	g.90029017G>A	-1.81E-01	2.14E-02	<i>FOXN3</i>	Nervous and behavior function
4	rs560911239	2	g.59876277A>G	-2.69E-01	2.22E-04	585,376 bp from <i>LINC01122</i> 3' end	Regulation post-transcription
4	rs148044198	5	g.164548085C>G	-2.30E-01	5.54E-03	1,601,726 bp from <i>MAT2B</i> 3' end	Transferase activity
4	rs11751860	6	g.127463809T>C	-1.16E-01	3.29E-02	<i>RSPO3</i>	Respiratory function
4	rs140243993	14	g.94821038del	-1.21E-01	3.25E-03	22,047 bp from <i>SERPINA1</i> 3' end	Immune response and respiratory function
4	rs562374706	5	g.1084932G>A	-2.69E-01	2.22E-04	<i>SLC12A7</i>	Homeostasis and metabolism
4	rs76651972	14	g.65303217A>T	-2.44E-01	2.77E-03	<i>SPTB</i>	Immune response
4	rs1101223	5	g.35977638T>C	-1.60E-01	1.42E-02	<i>UGT3A1</i>	Transferase activity
4	rs147100083	16	g.87460882T>G	-2.69E-01	1.15E-04	<i>ZCCHC14</i>	Non protein/Non DNA binding
3	rs138571142	20	g.52683417G>A	-2.11E-01	4.42E-02	<i>BCAS1</i>	Immune response and respiratory function
3	rs201023555	16	g.74462320T>A	-9.09E-02	1.32E-03	6,671 bp from <i>CLEC18B</i> 5' end	Immune response
3	rs75333614	2	g.212515532C>T	-1.09E-01	8.56E-04	<i>ERBB4</i>	Immune response and respiratory function
3	rs78031379	5	g.963812G>A	-2.60E-01	7.30E-08	24,613 bp from <i>MIR9-2HG</i> 3' end	Regulation post-transcription
3	rs6606713	12	g.109851671C>A	-1.52E-01	4.32E-02	<i>MYO1H</i>	Homeostasis and metabolism
3	rs72936135	18	g.55158297G>A	-1.51E-01	3.94E-02	<i>ONECUT2</i>	Homeostasis and metabolism
3	rs6815304	4	g.32685263T>C	-1.11E-01	2.88E-03	1,536,840 bp from <i>PCDH7</i> 3' end	Immune response

3	rs118061949	13	g.52216724C>G	-1.12E-01	4.90E-02	<i>WDFY2</i>	Homeostasis and metabolism
3	rs182406382	5	g.82466490A>G	-1.73E-01	2.51E-03	<i>XRCC4</i>	Immune response
2	rs142945559	2	g.203374815C>T	-1.71E-01	4.71E-02	<i>BMPR2</i>	Immune response and respiratory function
2	rs371785533	5	g.888896_888899del	-2.69E-01	2.22E-04	<i>BRD9</i>	Immune response
2	rs114756355	7	g.3119071G>A	-2.44E-01	2.88E-03	35,562 bp from <i>CARD11</i> 5' end	Immune response and respiratory function
2	rs140312946	3	g.105532188A>G	-1.67E-01	6.50E-03	<i>CBLB</i>	Immune response
2	rs1581693	7	g.22034533C>T	-3.58E-02	1.22E-02	48,991 bp from <i>CDCA7L</i> 5' end	Immune response
2	rs111463341	16	g.83584198C>G	-1.43E-01	1.27E-02	<i>CDH13</i>	Homeostasis and metabolism
2	rs542195008	8	g.139584179G>A	-1.17E-01	2.68E-02	16,299 bp from <i>COL22A1</i> 3' end	Extracellular function
2	rs151307962	5	g.84541618T>G	-1.73E-01	2.62E-03	861,007 bp from <i>EDIL3</i> 5' end	Immune response and respiratory function
2	rs62266958	3	g.129137188C>T	-6.05E-02	3.97E-02	<i>EFCAB12</i>	Non protein/Non DNA binding
2	rs76368678	8	g.11322413G>C	-2.30E-01	4.63E-03	<i>FAM167A</i>	Immune response and respiratory function
2	rs117680136	16	g.87414093G>A	-2.69E-01	1.15E-04	<i>FBXO31</i>	Homeostasis and metabolism
2	rs75229564	7	g.19189413C>G	-1.74E-01	3.93E-02	4,369 bp from <i>FERD3L</i> 5' end	Nervous and behavior function
2	rs201852735	9	g.86030536_86030538insTTA	-6.18E-02	1.78E-02	<i>FRMD3</i>	Immune response
2	rs55932421	2	g.49569617C>T	-2.14E-01	4.14E-02	187,951 bp from <i>FSHR</i> 5' end	Immune response
2	rs555063867	4	g.93421539del	-1.65E-01	1.27E-02	<i>GRID2</i>	Nervous and behavior function
2	rs79741801	10	g.118492217A>T	-2.30E-01	5.54E-03	<i>HSPA12A</i>	Immune response

2	rs73731531	6	g.19672376T>C	-2.24E-01	7.14E-05	165,225 bp from <i>ID4</i> 5' end	Homeostasis and metabolism
2	rs78642401	11	g.62422928A>G	-6.27E-02	1.82E-02	<i>INTS5</i>	Protein binding
2	rs117366103	16	g.87619521G>A	-2.68E-01	1.15E-04	15,920 bp from <i>JPH3</i> 5' end	Nervous and behavior function
2	rs138852783	9	g.6726204G>T	-1.73E-01	4.56E-02	<i>KDM4C</i>	Immune response
2	rs34528759	11	g.126921779A>T	-2.44E-01	2.88E-03	45,826 bp from <i>KIRREL3-AS3</i> 3' end	Other
2	rs113451085	3	g.28867931T>C	-1.16E-01	5.85E-03	68,103 bp from <i>LINC00693</i> 3' end	Regulation post-transcription
2	rs146122680	18	g.74302123C>A	-2.16E-01	2.97E-02	30,339 bp from <i>LINC00908</i> 3' end	Regulation post-transcription
2	rs151203753	18	g.51594652A>G	-2.10E-01	4.58E-02	83,319 bp from <i>MBD2</i> 3' end	Immune response
2	rs143562202	10	g.121846447G>A	-2.30E-01	5.54E-03	128,343 bp from <i>MIR4682</i> 3' end	Regulation post-transcription
2	rs138952403	6	g.126486283G>A	-2.29E-01	2.20E-05	42,521 bp from <i>MIR5695</i> 5' end	Regulation post-transcription
2	rs13264097	8	g.98548264G>A	-1.57E-01	2.68E-02	108,143 bp from <i>MTDH</i> 5' end	Immune response
2	rs546902181	20	g.60766497C>G	-1.73E-01	4.58E-02	<i>MTG2</i>	Homeostasis and metabolism
2	rs148200910	2	g.15243757A>C	-1.36E-01	4.28E-02	63,275 bp from <i>NBAS</i> 3' end	Nervous and behavior function
2	rs72772222	5	g.84710054T>C	-1.73E-01	2.56E-03	868,208 bp from <i>NBPF22P</i> 5' end	Other
2	rs143495624	6	g.107676844G>A	-1.94E-01	8.22E-03	<i>PDSS2</i>	Immune response and respiratory function
2	rs149440345	4	g.23850756G>A	-2.21E-01	2.33E-02	<i>PPARGC1A</i>	Immune response and respiratory function
2	rs114339787	1	g.228003225C>T	-2.68E-01	2.54E-04	<i>PRSS38</i>	Other
2	rs560964054	3	g.16378972C>T	-1.73E-01	4.40E-02	<i>RFTN1</i>	Immune response

2	rs146660597	1	g.243561222C>T	-1.87E-01	5.02E-03	<i>SDCCAG8</i>	Homeostasis and metabolism
2	rs148955366	10	g.121658400C>T	-2.30E-01	5.54E-03	<i>SEC23IP</i>	Intracellular signaling
2	rs147212501	18	g.41762608C>A	-1.34E-01	1.22E-02	497,530 bp from <i>SETBP1</i> 5' end	Homeostasis and metabolism
2	rs55645918	5	g.148239611C>A	-1.40E-01	2.58E-02	<i>SH3TC2</i>	Homeostasis and metabolism
2	rs182437555	10	g.97336873A>T	-1.60E-01	1.23E-02	15,702 bp from <i>SORBS1</i> 5' end	Immune response
2	rs532738090	9	g.34798534A>G	-1.72E-01	4.58E-02	31,730 bp from <i>SPATA31F2P</i> 3' end	Other
2	rs564783128	12	g.119200313A>G	-2.68E-01	1.15E-04	218,987 bp from <i>SRRM4</i> 5' end	Respiratory function
2	rs73015950	3	g.8694819G>T	-2.25E-01	1.30E-02	<i>SSUH2</i>	Protein binding
2	rs17034848	3	g.36345965G>T	-1.24E-01	4.14E-02	76,132 bp from <i>STAC</i> 5' end	Nervous and behavior function
2	rs547174500	12	g.83751294_83751295insAG	-1.85E-01	3.44E-02	223,226 bp from <i>TMTC2</i> 3' end	Nervous and behavior function
2	rs187566673	1	g.68739391T>G	-1.28E-01	2.48E-02	41,107 bp from <i>WLS</i> 5' end	Immune response and respiratory function
2	rs72797416	16	g.79174768C>T	-2.33E-01	4.46E-03	<i>WWOX</i>	Immune response
1	rs537390395	9	g.74482889G>A	-1.15E-01	1.19E-02	<i>ABHD17B</i>	Nervous and behavior function
1	rs186376860	6	g.131675424C>T	-1.25E-01	4.12E-02	70,749 bp from <i>AKAP7</i> 3' end	Intracellular signaling
1	rs185887243	10	g.97346588G>A	-1.60E-01	1.23E-02	19,098 bp from <i>ALDH18A1</i> 3' end	Immune response
1	rs13188241	5	g.79893637C>T	-1.35E-01	4.87E-02	27,333 bp from <i>ANKRD34B</i> 5' end	Other
1	rs144529794	16	g.60395835A>G	-1.03E-01	1.68E-02	606,740 bp from <i>APOOP5</i> 5' end	Other

1	rs186460592	1	g.169010282C>A	-1.16E-01	2.62E-03	65,665 bp from <i>ATP1B1</i> 5' end	Respiratory function
1	rs183546794	5	g.81770817T>C	-1.38E-01	3.62E-02	156,670 bp from <i>ATP6AP1L</i> 3' end	Other
1	rs546954949	6	g.107410617G>A	-1.94E-01	7.92E-03	<i>Bend3</i>	Individual aging and mortality
1	rs148651605	16	g.1147858insA	-2.66E-01	1.35E-04	<i>C1QTNF8</i>	Extracellular function
1	rs76037969	2	g.159237518T>C	-2.44E-01	2.88E-03	<i>CCDC148</i>	Protein binding
1	rs140958337	4	g.78063942del	-1.25E-01	4.28E-02	14,416 bp from <i>CCNG2</i> 5' end	Other
1	rs148448921	20	g.44753814G>A	-1.71E-01	4.84E-02	<i>CD40</i>	Immune response
1	rs35094253	6	g.14625089del	-1.63E-01	7.98E-03	487,940 bp from <i>CD83</i> 3' end	Immune response
1	rs150017945	17	g.14888803G>A	-1.83E-01	1.68E-02	45,489 bp from <i>CDRT7</i> 5' end	Other
1	rs141368106	4	g.56970542_56970543del	-2.26E-01	1.27E-02	65,820 bp from <i>CRACD</i> 5' end	Nervous and behavior function
1	rs113605924	12	g.107430956G>A	-1.01E-01	4.76E-02	<i>CRY1</i>	Immune response
1	rs191858575	10	g.67474686G>A	-1.26E-01	3.35E-02	205,039 bp from <i>CTNNA3</i> 3' end	Muscle
1	rs77563786	2	g.16538820G>T	-1.40E-01	2.48E-02	191,910 bp from <i>CYRIA</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs200102947	14	g.73395208_73395210insACA	-1.75E-01	2.51E-03	<i>DCAF4</i>	Epigenetic mechanism
1	rs11842942	13	g.52340365C>T	-1.12E-01	4.90E-02	<i>DHRS12</i>	Other
1	rs145539470	20	g.34993940G>A	-1.76E-01	3.30E-02	<i>DLGAP4</i>	Nervous and behavior function
1	rs140809507	5	g.106863135A>C	-1.56E-01	3.47E-02	<i>EFNA5</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs72900935	6	g.80653154C>G	-1.25E-01	4.56E-02	<i>ELOVL4</i>	Nervous and behavior function

1	rs74668056	3	g.88737633C>T	-1.42E-01	1.90E-02	419,041 bp from <i>EPHA3</i> 5' end	Immune response and respiratory function
1	rs191145793	15	g.59852209C>A	-2.30E-01	2.20E-05	36,458 bp from <i>FAM81A</i> 3' end	Immune response
1	rs17885506	9	g.35078100G>A	-1.72E-01	4.58E-02	<i>FANCG</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs527510404	12	g.117612962C>T	-1.32E-01	4.71E-02	<i>FBXO21</i>	Immune response
1	rs149859171	12	g.117442782T>C	-1.33E-01	4.57E-02	<i>FBXW8</i>	Immune response and respiratory function
1	rs149142615	13	g.28980905G>A	-1.74E-01	4.08E-02	<i>FLT1</i>	Immune response
1	rs73051149	3	g.16225745G>A	-1.73E-01	4.40E-02	<i>GALNT15</i>	Protein binding
1	rs117510149	11	g.62394297G>C	-6.15E-02	4.90E-02	<i>GANAB</i>	Individual aging and mortality
1	rs78859065	20	g.61027540G>A	-1.72E-01	4.58E-02	11,013 bp from <i>GATA5</i> 3' end	Immune response
1	rs117807552	15	g.59883192C>G	-1.68E-01	3.94E-03	20,790 bp from <i>GCNT3</i> 5' end	Immune response
1	rs74213230	16	g.19512002T>C	-1.51E-01	3.89E-02	<i>GDE1</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs117528826	9	g.80628009G>A	-1.31E-01	2.05E-02	<i>GNAQ</i>	Immune response and respiratory function
1	rs189066606	4	g.84623907G>A	-2.30E-01	2.20E-05	96,880 bp from <i>GPAT3</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs71645480	1	g.217686366T>A	-2.25E-01	7.27E-03	<i>GPATCH2</i>	Immune response
1	rs118146772	11	g.120836733T>C	-1.74E-01	4.28E-02	<i>GRIK4</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs560268391	6	g.146774641G>A	-1.56E-01	1.59E-02	15,907 bp from <i>GRM1</i> 3' end	Nervous and behavior function
1	rs73341526	14	g.95280004G>T	-2.33E-01	4.41E-03	43,505 bp from <i>GSC</i> 5' end	Respiratory function
1	rs62267567	3	g.129265481T>C	-5.97E-02	4.42E-02	<i>H1-8</i>	DNA binding
1	rs530441033	5	g.83092174C>T	-1.35E-01	4.42E-02	75,278 bp from <i>HAPLN1</i> 5' end	Nervous and behavior function

1	rs187617341	8	g.80751897T>C	-1.14E-01	2.68E-02	71,799 bp from <i>HEY1</i> 5' end	Nervous and behavior function
1	rs113348350	10	g.94508076A>G	-2.44E-01	2.88E-03	52,668 bp from <i>HHEX</i> 3' end	Immune response and respiratory function
1	rs3771340	2	g.234748701T>C	-4.97E-02	4.58E-02	<i>HJURP</i>	DNA binding
1	rs62267562	3	g.129222549G>A	-6.00E-02	4.28E-02	<i>IFT122</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs75733493	4	g.58507264T>G	-1.73E-01	4.40E-02	435,799 bp from <i>IGFBP7-AS1</i> 3' end	Other
1	rs144086622	10	g.121557654G>A	-2.30E-01	5.54E-03	<i>INPP5F</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs191350267	5	g.51383576G>A	-1.50E-01	4.58E-02	693,013 bp from <i>ISL1</i> 3' end	Immune response and respiratory function
1	rs79186472	3	g.4579904A>G	-2.26E-01	1.27E-02	<i>ITPR1</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs860270	7	g.28269348A>G	-1.11E-01	2.68E-02	<i>JAZF1-AS1</i>	Other
1	rs137920764	18	g.39087471insT	-1.23E-01	4.99E-02	<i>KC6</i>	Other
1	rs6075035	20	g.16213028A>G	-1.61E-01	1.62E-02	39,721 bp from <i>KIF16B</i> 3' end	Immune response
1	rs557921692	2	g.136572107A>G	-2.30E-01	2.20E-05	<i>LCT</i>	Other
1	rs56356510	2	g.64580962G>A	-1.12E-01	2.91E-02	100,365 bp from <i>LGALS1</i> 5' end	Non protein/Non DNA binding
1	rs115793060	2	g.64525486G>A	-1.12E-01	2.91E-02	92,867 bp from <i>LINC00309</i> 5' end	Regulation post-transcription
1	rs573603287	5	g.87956733G>C	-2.31E-01	2.20E-05	<i>LINC00461</i>	Regulation post-transcription
1	rs147221194	6	g.132547478T>A	-2.14E-01	4.40E-02	56,964 bp from <i>LINC01013</i> 3' end	Regulation post-transcription
1	rs554333300	14	g.97783062T>G	-1.21E-01	2.77E-03	315,922 bp from <i>LINC02291</i> 3' end	Regulation post-transcription
1	rs79057149	12	g.25146005C>T	-2.30E-01	5.60E-03	<i>LINC02909</i>	Regulation post-transcription

1	rs115054082	6	g.8778583A>G	-1.04E-01	4.03E-02	<i>LOC100506207</i>	Other
1	rs556647928	9	g.138118510C>A	-1.61E-01	1.91E-02	39,358 bp from <i>LOC401557</i> 3' end	Other
1	rs574982634	1	g.69822672C>T	-1.56E-01	4.28E-02	210,196 bp from <i>LRR7</i> 5' end	Homeostasis and metabolism
1	rs113774286	18	g.74730193C>T	-2.15E-01	3.53E-02	<i>MBP</i>	Immune response
1	rs114402054	5	g.112485651T>C	-1.89E-01	4.52E-03	<i>MCC</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs142961385	9	g.134687933C>T	-1.74E-01	4.42E-02	47,564 bp from <i>MED27</i> 3' end	Protein binding
1	rs113283276	4	g.29547466G>A	-1.79E-01	5.96E-04	726,176 bp from <i>MIR4275</i> 3' end	Regulation post- transcription
1	rs543319774	13	g.56498572T>G	-2.31E-01	4.44E-03	749,889 bp from <i>MIR5007</i> 3' end	Regulation post- transcription
1	rs75834926	22	g.27993446T>C	-1.24E-01	4.58E-02	150,819 bp from <i>MN1</i> 3' end	Respiratory function
1	rs147010223	6	g.132554686G>A	-2.14E-01	4.40E-02	62,508 bp from <i>MOXD1</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs151010922	18	g.3245921C>T	-2.31E-01	2.20E-05	<i>MYL12A</i>	Muscle
1	rs144699222	18	g.3211000A>G	-2.31E-01	2.20E-05	<i>MYOM1</i>	Muscle
1	rs117790364	21	g.22443778G>A	-1.73E-01	4.28E-02	<i>NCAM2</i>	Immune response and respiratory function
1	rs117768167	6	g.126233786G>A	-1.28E-01	3.33E-02	<i>NCOA7</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs113369914	20	g.21420694C>T	-1.41E-01	2.33E-02	42,647 bp from <i>NKX2-4</i> 5' end	DNA binding
1	rs567810939	16	g.189188CA>C	-2.05E-01	1.61E-03	<i>NPRL3</i>	Immune response
1	rs146752133	10	g.83728571T>C	-1.82E-01	4.18E-02	<i>NRG3</i>	Nervous and behavior function
1	rs10654840	8	g.126274339_ 126274353ins[AAAAT [3]]	-2.08E-01	3.48E-04	<i>NSMCE2</i>	Immune response



1	rs144055099	5	g.76875898_76875901del	-1.02E-01	5.54E-03	48,640 bp from <i>OTP</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs142662672	14	g.94508982C>T	-2.32E-01	4.44E-03	<i>OTUB2</i>	Epigenetic mechanism
1	rs148195421	4	g.108502646del	-1.18E-01	1.85E-02	32,177 bp from <i>PAPSS1</i> 3' end	Individual aging and mortality
1	rs560556645	2	g.10944681T>A	-1.96E-01	3.94E-03	<i>PDIA6</i>	Immune response and respiratory function
1	rs72667616	4	g.95415191G>T	-1.30E-01	2.04E-02	<i>PDLIM5</i>	Nervous and behavior function
1	rs200334036	3	g.73633442del	-1.35E-01	1.10E-03	<i>PDZRN3</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs74839910	1	g.99780824T>C	-1.21E-01	2.50E-02	<i>PLPPR4</i>	Nervous and behavior function
1	rs113869187	1	g.14399115A>G	-2.10E-01	4.84E-02	247,541 bp from <i>PRDM2</i> 3' end	Individual aging and mortality
1	rs7955021	12	g.3447871T>C	-8.76E-02	2.77E-03	42,644 bp from <i>PRMT8</i> 5' end	Nervous and behavior function
1	rs76042679	2	g.232540627C>G	-2.13E-01	4.42E-02	32,608 bp from <i>PTMA</i> 5' end	Homeostasis and metabolism
1	rs183231155	9	g.10060835C>T	-1.36E-01	4.29E-02	<i>PTPRD</i>	Immune response and respiratory function
1	rs7644444	3	g.58387067G>A	-1.31E-01	1.47E-02	<i>PXK</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs138410736	2	g.136345605_136345606del	-2.66E-01	1.33E-04	<i>R3HDM1</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs62482768	7	g.155396080G>C	-1.34E-01	4.55E-02	41,123 bp from <i>RBM33</i> 5' end	Individual aging and mortality
1	rs78418070	5	g.97177216C>T	-1.53E-01	3.17E-02	658,211 bp from <i>RIOK2</i> 5' end	Immune response
1	rs149636840	20	g.60959906A>G	-1.74E-01	4.42E-02	<i>RPS21</i>	Individual aging and mortality
1	rs137965233	16	g.57270972C>T	-1.58E-01	1.71E-02	<i>RSPRY1</i>	Other

1	rs79295703	15	g.33993651A>C	-1.36E-01	4.56E-02	<i>RYR3</i>	Nervous and behavior function
1	rs140606100	16	g.51048004C>T	-1.57E-01	1.91E-02	121,882 bp from <i>SALL1</i> 3' end	Nervous and behavior function
1	rs115583621	1	g.31318159A>G	-1.88E-01	6.06E-03	24,154 bp from <i>SDC3</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs72971498	2	g.236045188T>A	-1.14E-01	4.50E-02	80,830 bp from <i>SH3BP4</i> 3' end	Homeostasis and metabolism
1	rs112298976	22	g.44742531G>A	-1.59E-01	1.41E-02	33,800 bp from <i>SHISAL1</i> 5' end	Immune response
1	rs149489473	18	g.42815763T>C	-2.44E-01	2.77E-03	<i>SLC14A2</i>	Homeostasis and metabolism
1	rs12213283	6	g.25920249C>T	-2.30E-01	4.78E-03	<i>SLC17A2</i>	Nervous and behavior function
1	rs144032116	3	g.66141798A>T	-1.34E-01	4.58E-02	<i>SLC25A26</i>	Individual aging and mortality
1	rs115144339	6	g.8383484C>T	-1.05E-01	3.78E-02	29,817 bp from <i>SLC35B3</i> 3' end	Other
1	rs141688740	13	g.30231405G>A	-1.70E-01	4.41E-03	61,580 bp from <i>SLC7A1</i> 5' end	Individual aging and mortality
1	rs75920673	4	g.19369641G>C	-1.66E-01	4.50E-03	885,594 bp from <i>SLIT2</i> 5' end	Immune response
1	rs11730135	4	g.95182419G>A	-1.23E-01	2.77E-03	<i>SMARCAD1</i>	Immune response
1	rs142962507	8	g.134638494insT	-2.67E-01	1.17E-04	54,310 bp from <i>ST3GAL1</i> 5' end	Immune response
1	rs553879101	12	g.119041363A>T	-2.68E-01	1.15E-04	185,523 bp from <i>SUDS3</i> 3' end	Epigenetic mechanism
1	rs528507201	6	g.149629635_149629638del	-1.53E-01	3.40E-02	<i>TAB2</i>	Immune response
1	rs118145902	6	g.134202264C>T	-1.77E-01	3.98E-02	<i>TCF21</i>	Immune response and respiratory function
1	rs62318544	4	g.154032676T>C	-1.76E-01	4.37E-02	41,594 bp from <i>TRIM2</i> 5' end	Nervous and behavior function

1	rs533210737	4	<b>g.189119489_189119503ins[A[7]; AAAG[2]]</b>	-1.58E-01	4.55E-02	50,839 bp from <i>TRIML1</i> 3' end	Epigenetic mechanism
1	rs117682943	6	<b>g.126369807G&gt;C</b>	-2.28E-01	2.52E-05	9,387 bp from <i>TRMT11</i> 3' end	Epigenetic mechanism
1	rs540860297	14	<b>g.20748150C&gt;T</b>	-2.34E-01	5.54E-03	9,151 bp from <i>TTC5</i> 3' end	DNA binding
1	rs112722217	2	<b>g.158935094G&gt;A</b>	-1.72E-01	4.58E-02	<i>UPP2</i>	Transferase activity
1	rs559195379	11	<b>g.124041648CG&gt;C</b>	-1.88E-01	7.35E-03	24,030 bp from <i>VWA5A</i> 3' end	Protein binding
1	rs117885301	12	<b>g.1758398C&gt;T</b>	-2.34E-01	4.41E-03	<i>WNT5B</i>	Nervous and behavior function
1	rs116932132	18	<b>g.74545065A&gt;G</b>	-2.15E-01	3.51E-02	<i>ZNF236</i>	DNA binding
1	rs201282862	19	<b>g.11939503_11939509del</b>	-1.15E-01	2.77E-03	<i>ZNF440</i>	DNA binding
1	rs147773939	10	<b>g.97553483T&gt;C</b>	-1.60E-01	1.20E-02	<i>ENTPD1</i>	Immune response and respiratory function
1	rs150707	2	<b>g.33160794C&gt;A</b>	-2.14E-01	4.40E-02	<i>LINC00486</i>	Regulation post-transcription
1	rs531812294	14	<b>g.70865212G&gt;A</b>	-1.80E-01	3.30E-02	<i>SYNJ2BP</i>	Protein binding
1	rs138033765	8	<b>g.134056438G&gt;A</b>	-1.75E-01	4.28E-02	<i>TG</i>	Immune response

<sup>a</sup>CpG sites shown are those with a significant p-value and suggestive p-value for the EWAS analyses in eosinophils. Positions and chromosome according to human genome reference 19 (hg19). Significant CpG sites are shown in bold.

<sup>b</sup>Genetic variant and association values for the mQTL result with most significant FDR.

<sup>c</sup>Gene in which the variant is located in or nearest to according to the UCSC Genomes browser (hg19). For variant which are intergenic the distance from the nearest gene is indicated with the gene direction.

<sup>d</sup>Functional category was classified into functions with the use of the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER 17.0) classification system, GeneCards and g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping classification system.

Abbreviations: Chr, chromosome

**Table 10.** Summary of significant *trans*- expression quantitative trait loci (*trans*-eQTL; FDR<0.05)

Gene <sup>a</sup>	Gene position <sup>a</sup>	Number of variants	Most significant variant association with gene <sup>b</sup>				
			Variant ID	Variant's Chr	HGVS ID	Beta	FDR
<i>ANKRD34B</i>	Chr5:79852574-79866304	2	rs138848470	2	g.80192571A>G	8,90E-01	1,57E-02
<i>BCAS1</i>	Chr20:52560079-52687304	1	rs555063867	4	g.93421539insA	-2,90E-01	3,85E-02
<i>BMPR2</i>	Chr2:203241050-203432474	36	rs151203753	18	g.51594652A>G	-1,22E+00	9,51E-03
<i>CCDC148</i>	Chr2:159027869-159313265	35	rs114339787	1	g.228003225C>T	-4,48E-01	7,36E-08
<i>CCNG2</i>	Chr4:78078357-78091213	4	rs556647928	9	g.138118510C>A	5,05E-01	1,63E-02
<i>CDH13</i>	Chr16:82660399-83830215	1	rs184847122	3	g.105343711T>C	-7,84E-02	1,86E-03
<i>CNTN5</i>	Chr11:98891706-100229616	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-3,89E-02	2,82E-03
<i>COL22A1</i>	Chr8:139600478-139926236	186	rs200954932	8	g.135427904del	-4,62E-01	1,14E-11
<i>DLGAP4</i>	Chr20:34894303-35157040	36	rs151203753	18	g.51594652A>G	6,34E-01	2,24E-02
<i>EDIL3</i>	Chr5:83238126-83680611	1	rs55932421	2	g.49569617C>T	-4,33E-02	3,75E-03
<i>EFNA5</i>	Chr5:106712590-107006596	56	rs3056081	1	g.104122316_104122317insAC	-2,57E-01	1,07E-02
<i>ELN</i>	Chr7:73442427-73484236	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-7,26E-02	2,92E-03
<i>EPHA3</i>	Chr3:89156674-89531284	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-6,10E-02	2,04E-02
<i>ERGIC1</i>	Chr5:172261223-172379688	35	rs369016912	2	g.49542105C>T	7,23E-01	3,98E-02
<i>FAM167A</i>	Chr8:11278973-11324276	1	rs7644444	3	g.58387067G>A	-3,94E-01	6,57E-04
<i>FBXO31</i>	Chr16:87362942-87425708	2	rs547174500	1	g.83751294_83751295insAG	5,33E-01	1,82E-02
<i>FLT1</i>	Chr13:28874483-29069265	2	rs146752133	10	g.83728571T>C	-8,35E-01	2,74E-02
<i>GCNT3</i>	Chr15:59903982-59912210	5	rs143267777	18	g.74345636G>A	-6,66E-02	1,45E-02
<i>GNAQ</i>	Chr9:80335191-80646219	3	rs2855726	7	g.73517114G>A	1,12E-01	1,07E-02

<i>GRIK4</i>	Chr11:120382468-120856969	1	rs7644444	3	g.58387067G>A	-4,01E-01	3,25E-02
<i>GRM1</i>	Chr6:146348782-146758734	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-5,40E-02	5,20E-03
<i>HEY1</i>	Chr8:80676245-80680098	2	rs560268391	6	g.146774641G>A	-8,66E-01	3,93E-02
<i>HSPA12A</i>	Chr10:118430703-118609716	3	rs184847122	3	g.105343711T>C	-9,14E-02	1,58E-04
<i>ID4</i>	Chr6:19837601-19842431	5	rs117198856	11	g.41612870G>A	-4,70E-02	1,59E-05
<i>INPP5F</i>	Chr10:121485559-121588662	1	rs201852735	9	g.86030536_86030538insTTA	-1,79E-01	3,83E-02
<i>INTS5</i>	Chr11:62414320-62420774	35	rs151203753	18	g.51594652A>G	5,79E-01	2,56E-02
<i>JPH3</i>	Chr16:87635441-87731761	4	rs148195421	4	g.108502646insA	-2,69E-02	3,21E-03
<i>KC6</i>	Chr18:39060236-39100561	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-1,12E-02	2,66E-02
<i>LCT</i>	Chr2:136545415-136594750	3	rs79186472	1	g.4579904A>G	-2,98E-01	3,73E-03
<i>LINC00486</i>	Chr2:33050510-33162270	35	rs12213283	1	g.25920249C>T	-2,87E-01	2,73E-09
<i>LINC01122</i>	Chr2:58747888-59290901	5	rs117198856	18	g.41612870G>A	-9,91E-02	5,93E-05
<i>LINGO2</i>	Chr9:27948084-29212998	38	rs560911239	2	g.59876277A>G	-3,94E-01	1,15E-03
<i>MIR4500HG</i>	Chr13:88096242-88323218	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-2,92E-02	1,15E-03
<i>MOBP</i>	Chr3:39509064-39570988	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-1,59E-01	3,73E-03
<i>MOXD1</i>	Chr6:132617194-132722664	9	rs118146772	1	g.120836733T>C	-1,95E-01	1,75E-03
<i>NBAS</i>	Chr2:15307032-15701472	37	rs143712936	20	g.53674376A>G	-7,20E-01	1,96E-03
<i>NBPF22P</i>	Chr5:85578262-85593365	5	rs117198856	18	g.41612870G>A	-4,33E-02	3,28E-04
<i>ONECUT2</i>	Chr18:55102917-55158530	1	rs541388781	6	g.126672045del	5,33E-01	4,65E-02
<i>OTUB2</i>	Chr14:94492724-94515276	3	rs74913622	1	g.200322948T>C	-2,05E-01	1,77E-03
<i>PAPSS1</i>	Chr4:108534822-108641419	4	rs79186472	3	g.4579904A>G	9,74E-01	1,96E-03
<i>PCDH7</i>	Chr4:30722030-31148423	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-9,14E-02	3,79E-02
<i>PDIA6</i>	Chr2:10923517-10978103	36	rs113869187	1	g.14399115A>G	5,11E-01	1,88E-03

<i>PLPPR4</i>	Chr1:99729848-99775138	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-8,39E-03	7,49E-04
<i>PRMT8</i>	Chr12:3490515-3703138	2	rs117198856	18	g.41612870G>A	-1,16E-02	1,15E-02
<i>RPS21</i>	Chr20:60962121-60963576	35	rs151203753	18	g.51594652A>G	1,17E+00	2,01E-02
<i>RYR3</i>	Chr15:33603177-34158303	1	rs556647928	9	g.138118510C>A	-6,29E-01	1,42E-02
<i>SLIT2</i>	Chr4:20255235-20620788	3	rs117198856	18	g.41612870G>A	-4,57E-02	6,20E-03
<i>SMC2</i>	Chr9:106856541-106903700	4	rs62267567	1	g.129265481T>C	1,93E-01	3,05E-02
<i>THSD4</i>	Chr15:71433788-72075722	3	rs117198856	2	g.41612870G>A	-8,12E-02	5,32E-03
<i>UBL3</i>	Chr13:30338545-30424820	1	rs7644444	3	g.58387067G>A	3,46E-01	2,81E-02
<i>UGT3A1</i>	Chr5:35953191-36001130	5	rs117198856	18	g.41612870G>A	-3,04E-02	1,34E-07
<i>XRCC4</i>	Chr5:82373317-82649579	1	rs7644444	3	g.58387067G>A	4,50E-01	4,61E-02
<i>ZC3H12A</i>	Chr1:37940181-37949978	1	rs7644444	3	g.58387067G>A	-9,76E-01	2,07E-02
<i>ZNF141</i>	Chr4:331596-377760	2	rs76368678	8	g.11322413G>C	9,37E-01	1,14E-03
<i>ZPLD1</i>	Chr3:101818088-102198685	5	rs117198856	18	g.41612870G>A	-2,32E-02	8,47E-07

<sup>a</sup>Genes shown are the nearest genes identified during EWAS and mQTL analyses in eosinophils. Gene symbols, positions and chromosome according to human genome reference 19 (hg19).

<sup>b</sup>Genetic variant and association values for the eQTL result with most significant FDR.

Abbreviations: Chr, chromosome

**Table 11.** Summary of correlation analysis between methylation levels and expression counts (FDR<0.05)

CpG <sup>a</sup>	Gene <sup>b</sup>	Gene position <sup>b</sup>	Coeff	SE	FDR	r <sup>c</sup>
Chr1:37,499,363	<i>BMPR2</i>	Chr2:203241050-203432474	-4,87E-01	1,59E-01	4,67E-02	-1,55E-01
	<i>LINC00486</i>	Chr2:33050510-33162270	1,17E+01	3,48E+00	3,02E-02	1,04E-01
	<i>NBAS</i>	Chr2:15307032-15701472	-3,56E-01	9,28E-02	9,98E-03	-6,66E-02
	<i>RPS21</i>	Chr20:60962121-60963576	5,62E-01	1,86E-01	4,91E-02	1,85E-01
	<i>SMC2</i>	Chr9:106856541-106903700	-5,59E-01	1,37E-01	9,12E-03	-7,14E-02
Chr1:6,267,177	<i>LINGO2</i>	Chr9:27948084-29212998	5,83E+00	1,52E+00	9,98E-03	1,39E-01
<b>Chr2:103,279,574</b>	<i>INPP5F</i>	Chr10:121485559-121588662	5,88E-01	1,78E-01	3,15E-02	1,29E-01
	<i>MOXD1</i>	Chr6:132617194-132722664	-5,17E+00	1,65E+00	4,37E-02	-1,62E-01
<b>Chr4:1,320,665</b>	<i>INPP5F</i>	Chr10:121485559-121588662	-2,59E-01	8,30E-02	4,37E-02	-1,50E-01
Chr7:100,027,356	<i>FAM167A</i>	Chr8:11278973-11324276	-6,04E+00	1,66E+00	1,72E-02	-4,43E-02
	<i>FBXO31</i>	Chr16:87362942-87425708	9,92E-01	3,01E-01	3,15E-02	4,30E-02
	<i>FLT1</i>	Chr13:28874483-29069265	3,04E+00	9,37E-01	3,48E-02	2,34E-01
	<b><i>HEY1</i></b>	<b>Chr8:80676245-80680098</b>	<b>2,87E+00</b>	<b>7,48E-01</b>	<b>9,98E-03</b>	<b>3,13E-01</b>
	<i>INPP5F</i>	Chr10:121485559-121588662	8,79E-01	2,87E-01	4,67E-02	6,50E-02
	<i>PAPSS1</i>	Chr4:108534822-108641419	-9,14E-01	2,62E-01	2,24E-02	-2,66E-01
Chr11:97,073,789	<i>LINGO2</i>	Chr9:27948084-29212998	1,93E+00	5,53E-01	2,24E-02	1,31E-01
Chr14:22,393,510	<i>CCNG2</i>	Chr4:78078357-78091213	-1,68E-01	5,23E-02	3,67E-02	-8,83E-02
	<i>EFNA5</i>	Chr5:106712590-107006596	9,38E-01	2,71E-01	2,24E-02	1,17E-01
	<i>GRIK4</i>	Chr11:120382468-120856969	6,26E+00	8,68E-01	2,17E-10	1,93E-01

<sup>a</sup>CpG sites shown are those with a significant p-value (in bold) and suggestive p-value for the EWAS analyses in eosinophils. Positions and chromosome according to human genome reference 19 (hg19).

<sup>b</sup>Genes shown are the genes identified during EWAS and mQTL analyses in eosinophils. Gene symbols, positions and chromosome according to human genome reference 19 (hg19). Significant correlation is shown in bold ( $r > 0.3$ ;  $FDR \leq 0.05$ ).

<sup>c</sup>Pearson correlation test

**Table 12.** Genes previously identified in the literature, and their reference

Phenotype	Genes	References
Allergy	<i>CARD11</i>	1,2
	<i>FERD3L, LINC00486</i>	3
	<i>NBAS</i>	4
	<i>SH3BP4</i>	5
	<i>CDH13, CTNNA2</i>	6
	<i>MBD2</i>	7
	<i>DUSP1</i>	8
	Asthma	<i>CTNNA3</i>
<i>COL22A1</i>		10
<i>CDH13</i>		11
<i>ERBB4</i>		12,13
<i>CDH17, EFCAB12, ETV1, FERD3L, IFT122, JAZF1-AS1, KDM4C, LINC02909, PCDH7, PTPRD, ZFAT</i>		14
<i>KC6</i>		15
<i>KIF16B, TMTC2</i>		16
<i>STAC</i>		17
<i>SH3BP4</i>		5
<i>PTPRC, TBL1XR1</i>		18-20
<i>LINC01122</i>		21
<i>PPARGC1A</i>		22
<i>CARD11, HHEX, ID4, PTPRC, TBL1XR1</i>		23
<i>THSD4</i>		24,25
<i>CARD11, PTPRC, TBL1XR1</i>		26,27
<i>SSUH2</i>		28
<i>PTPRD</i>		29
<i>PTPRC</i>	30	
<i>FAM167A, NRG3</i>	31	
<i>ZFAT</i>	32	
<i>TBL1XR1</i>	33	
Eczema	<i>CARD11</i>	1,2
	<i>NBAS</i>	4
	<i>CARD11, DLGAP1, PTPRC</i>	34
	<i>CDH13, CTNNA2</i>	6
	<i>DUSP1</i>	8,35
Eosinophils count	<i>BEND3, CARD11, HHEX, JAZF1-AS1, PTPRC, SLC12A7</i>	36
	<i>BEND3, CARD11, CBLB, DCAF4, KDM4C, NLRC5, NSMCE2, PTPRC, SALL1, SDC3, TG, WWOX, ZFAT</i>	34
	<i>CARD11, DCAF4, NLRC5, WWOX, ZFAT</i>	37
	<i>BEND3, CARD11, DCAF4, JAZF1-AS1, LINC00862, NLRC5, NSMCE2, PTPRC, SALL1, SH3TC2, TG, WWOX, ZFAT</i>	38
	<i>BEND3, PTPRC</i>	39
	<i>BEND3, CARD11, DCAF4, HHEX, NLRC5, SALL1</i>	30
	<i>BEND3, CARD11, PTPRC</i>	40



	<i>BEND3, CARD11, ETV1, HHEX, JAZF1-AS1, NLRC5, PTMA, PTPRC, SLC12A7</i>	36
	<i>KC6</i>	41
	<i>AUTS2, CBLB, DHRS12, JAZF1-AS1, MBD2, MYO1H, NLRC5, NSMCE2, PTMA, PTPRC, SDC3, SDCCAG8, SLC12A7, ZNF440</i>	34
	<i>R3HDM1</i>	42,43
	<i>LCT</i>	44,45
	<i>AUTS2, BEND3, C9orf131, CARD11, CDCA7L, CYRIA, DHRS12, ETV1, ITPR1, LCT, LIMK1, LINC00862, MBD2, MBP, MEF2C, MN1, NLRC5, NSMCE2, PTMA, PTPRC, RSPO3, SH3TC2, VCP, WWOX</i>	37
Leukocytes count	<i>AUTS2, BEND3, C9orf131, CARD11, CD40, CYRIA, DCAF4, DHRS12, ETV1, JAZF1-AS1, LCT, LINC00862, MBD2, MEF2C, NLRC5, NSMCE2, PTMA, PTPRC, RSPO3, SH3TC2, SLC12A7, SPTB, TG, WWOX, ZNF440</i>	38
	<i>ALDH18A1, APOOP5, CD40, ENTPD1, LCT, MCC, PTPRC, ZFAT</i>	46
	<i>ITPR1, MBP, NBAS</i>	47
	<i>R3HDM1, SLC25A26, ZFAT</i>	48
	<i>BEND3, FLT1, JAZF1-AS1, PTPRC</i>	39
	<i>AUTS2, BEND3, CARD11, CENPW, DHRS12, ELN, ETV1, LIMK1, LINC00461, LINC00862, LINC01122, MBD2, MBP, MEF2C, NLRC5, NSMCE2, PTMA, PTPRC, SALL1, WDFY2</i>	30
	<i>ATP1B1</i>	49
	<i>CDH13</i>	50
	<i>PTPRC, SALL1</i>	51
Methylation process	<i>ATP6AP1L, CDH13, ENTPD1, EPHA3, KC6, PCDH7, ZFAT, ZPLD1</i>	52

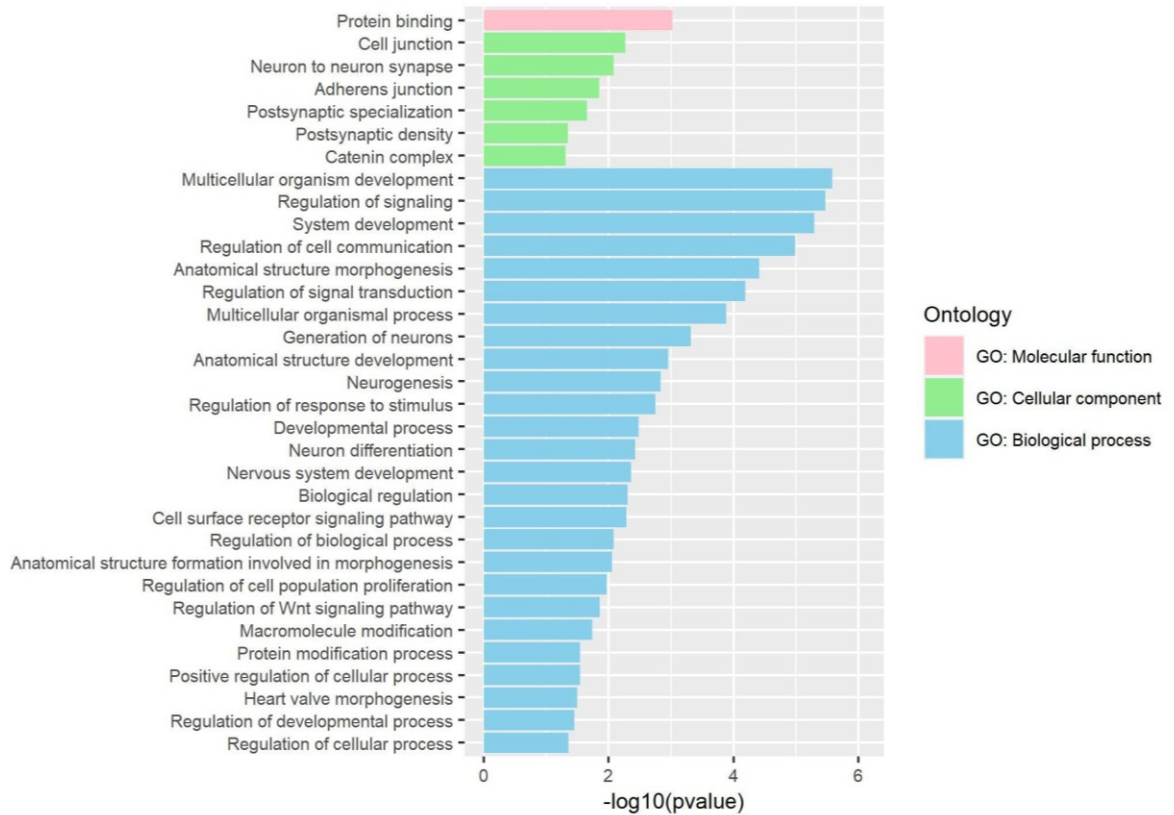
## References

- Hirota, T. et al. Genome-wide association study identifies eight new susceptibility loci for atopic dermatitis in the Japanese population. *Nat Genet* 44, 1222-6 (2012).
- Johansson, A., Rask-Andersen, M., Karlsson, T. & Ek, W.E. Genome-wide association analysis of 350 000 Caucasians from the UK Biobank identifies novel loci for asthma, hay fever and eczema. *Hum Mol Genet* 28, 4022-4041 (2019).
- Bunyanich, S. et al. Integrated genome-wide association, coexpression network, and expression single nucleotide polymorphism analysis identifies novel pathway in allergic rhinitis. *BMC Med Genomics* 7, 48 (2014).
- Kim, K.W. et al. Genome-wide association study of recalcitrant atopic dermatitis in Korean children. *J Allergy Clin Immunol* 136, 678-684 e4 (2015).
- Zhu, Z. et al. A genome-wide cross-trait analysis from UK Biobank highlights the shared genetic architecture of asthma and allergic diseases. *Nat Genet* 50, 857-864 (2018).
- Simard, M. et al. Polygenic risk score for atopic dermatitis in the Canadian population. *J Allergy Clin Immunol* 147, 406-409 (2021).
- Ferreira, M.A.R. et al. Age-of-onset information helps identify 76 genetic variants associated with allergic disease. *PLoS Genet* 16, e1008725 (2020).
- Budu-Aggrey, A. et al. European and multi-ancestry genome-wide association meta-analysis of atopic dermatitis highlights importance of systemic immune regulation. *Nat Commun* 14, 6172 (2023).
- Kim, S.H. et al. Alpha-T-catenin (CTNNA3) gene was identified as a risk variant for toluene diisocyanate-induced asthma by genome-wide association analysis. *Clin Exp Allergy* 39, 203-12 (2009).
- Duan, Q.L. et al. A genome-wide association study of bronchodilator response in asthmatics. *Pharmacogenomics J* 14, 41-7 (2014).
- Kim, J.H. et al. A genome-wide association study of total serum and mite-specific IgEs in asthma patients. *PLoS One* 8, e71958 (2013).
- Myers, R.A. et al. Genome-wide interaction studies reveal sex-specific asthma risk alleles. *Hum Mol Genet* 23, 5251-9 (2014).
- Moss, L.C., Gauderman, W.J., Lewinger, J.P. & Conti, D.V. Using Bayes model averaging to leverage both gene main effects and G x E interactions to identify genomic regions in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* 43, 150-165 (2019).

14. Yucesoy, B. et al. Genome-Wide Association Study Identifies Novel Loci Associated With Diisocyanate-Induced Occupational Asthma. *Toxicol Sci* 146, 192-201 (2015).
15. Park, H.W. et al. Genetic risk factors for decreased bone mineral accretion in children with asthma receiving multiple oral corticosteroid bursts. *J Allergy Clin Immunol* 136, 1240-6 e1-8 (2015).
16. Almoguera, B. et al. Identification of Four Novel Loci in Asthma in European American and African American Populations. *Am J Respir Crit Care Med* 195, 456-463 (2017).
17. Demenais, F. et al. Multiancestry association study identifies new asthma risk loci that colocalize with immune-cell enhancer marks. *Nat Genet* 50, 42-53 (2018).
18. Ferreira, M.A.R. et al. Genetic Architectures of Childhood- and Adult-Onset Asthma Are Partly Distinct. *Am J Hum Genet* 104, 665-684 (2019).
19. Zhu, Z. et al. Shared genetics of asthma and mental health disorders: a large-scale genome-wide cross-trait analysis. *Eur Respir J* 54(2019).
20. Olafsdottir, T.A. et al. Eighty-eight variants highlight the role of T cell regulation and airway remodeling in asthma pathogenesis. *Nat Commun* 11, 393 (2020).
21. Ierodiakonou, D. et al. Pathway analysis of a genome-wide gene by air pollution interaction study in asthmatic children. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 29, 539-547 (2019).
22. Wang, R.S. et al. Pharmacogenomics and Placebo Response in a Randomized Clinical Trial in Asthma. *Clin Pharmacol Ther* 106, 1261-1267 (2019).
23. Zhu, Z. et al. Shared genetic and experimental links between obesity-related traits and asthma subtypes in UK Biobank. *J Allergy Clin Immunol* 145, 537-549 (2020).
24. Dahlin, A. et al. Genome-wide interaction study reveals age-dependent determinants of responsiveness to inhaled corticosteroids in individuals with asthma. *PLoS One* 15, e0229241 (2020).
25. Chang, D. et al. A whole genome sequencing study of moderate to severe asthma identifies a lung function locus associated with asthma risk. *Sci Rep* 12, 5574 (2022).
26. Han, Y. et al. Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun* 11, 1776 (2020).
27. Valette, K. et al. Prioritization of candidate causal genes for asthma in susceptibility loci derived from UK Biobank. *Commun Biol* 4, 700 (2021).
28. Yan, Q. et al. A genome-wide association study of asthma hospitalizations in adults. *J Allergy Clin Immunol* 147, 933-940 (2021).
29. Akenroye, A.T. et al. Genome-wide association study of asthma, total IgE, and lung function in a cohort of Peruvian children. *J Allergy Clin Immunol* 148, 1493-1504 (2021).
30. Sakae, S. et al. A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes. *Nat Genet* 53, 1415-1424 (2021).
31. Adewuyi, E.O., Mehta, D., International Endogene, C., andMe Research, T. & Nyholt, D.R. Genetic overlap analysis of endometriosis and asthma identifies shared loci implicating sex hormones and thyroid signalling pathways. *Hum Reprod* 37, 366-383 (2022).
32. Wang, A.L. et al. Novel genetic variants associated with inhaled corticosteroid treatment response in older adults with asthma. *Thorax* 78, 432-441 (2023).
33. Jia, G. et al. Discerning asthma endotypes through comorbidity mapping. *Nat Commun* 13, 6712 (2022).
34. Kichaev, G. et al. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *Am J Hum Genet* 104, 65-75 (2019).
35. Grosche, S. et al. Rare variant analysis in eczema identifies exonic variants in DUSP1, NOTCH4 and SLC9A4. *Nat Commun* 12, 6618 (2021).
36. Astle, W.J. et al. The Allelic Landscape of Human Blood Cell Trait Variation and Links to Common Complex Disease. *Cell* 167, 1415-1429 e19 (2016).
37. Chen, M.H. et al. Trans-ethnic and Ancestry-Specific Blood-Cell Genetics in 746,667 Individuals from 5 Global Populations. *Cell* 182, 1198-1213 e14 (2020).
38. Vuckovic, D. et al. The Polygenic and Monogenic Basis of Blood Traits and Diseases. *Cell* 182, 1214-1231 e11 (2020).
39. Kachuri, L. et al. Genetic determinants of blood-cell traits influence susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hum Genet* 108, 1823-1835 (2021).
40. Høglund, J., Hadizadeh, F., Ek, W.E., Karlsson, T. & Johansson, A. Gene-Based Variant Analysis of Whole-Exome Sequencing in Relation to Eosinophil Count. *Front Immunol* 13, 862255 (2022).
41. Charles, B.A. et al. Analyses of genome wide association data, cytokines, and gene expression in African-Americans with benign ethnic neutropenia. *PLoS One* 13, e0194400 (2018).
42. Fatumo, S. et al. Complimentary Methods for Multivariate Genome-Wide Association Study Identify New Susceptibility Genes for Blood Cell Traits. *Front Genet* 10, 334 (2019).
43. Gurdasani, D. et al. Uganda Genome Resource Enables Insights into Population History and Genomic Discovery in Africa. *Cell* 179, 984-1002 e36 (2019).
44. Wojcik, G.L. et al. Genetic analyses of diverse populations improves discovery for complex traits. *Nature* 570, 514-518 (2019).

- 
- 
45. Kowalski, M.H. et al. Use of >100,000 NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Consortium whole genome sequences improves imputation quality and detection of rare variant associations in admixed African and Hispanic/Latino populations. *PLoS Genet* 15, e1008500 (2019).
  46. Orru, V. et al. Complex genetic signatures in immune cells underlie autoimmunity and inform therapy. *Nat Genet* 52, 1036-1045 (2020).
  47. Okada, D. et al. Genome-wide association study of individual differences of human lymphocyte profiles using large-scale cytometry data. *J Hum Genet* 66, 557-567 (2021).
  48. Hu, Y. et al. Multi-ethnic genome-wide association analyses of white blood cell and platelet traits in the Population Architecture using Genomics and Epidemiology (PAGE) study. *BMC Genomics* 22, 432 (2021).
  49. Soremekun, O. et al. Genome-Wide Association and Mendelian Randomization Analysis Reveal the Causal Relationship Between White Blood Cell Subtypes and Asthma in Africans. *Front Genet* 12, 749415 (2021).
  50. Helenius, M. et al. Characteristics of white blood cell count in acute lymphoblastic leukemia: A COST LEGEND phenotype-genotype study. *Pediatr Blood Cancer* 69, e29582 (2022).
  51. Lee, C.J. et al. Phenome-wide analysis of Taiwan Biobank reveals novel glycemia-related loci and genetic risks for diabetes. *Commun Biol* 5, 1175 (2022).
  52. Zhang, Q. et al. Genotype effects contribute to variation in longitudinal methylome patterns in older people. *Genome Med* 10, 75 (2018).

## Supplementary Figures



**Figure 11.** Gene ontology (GO) term enrichment analysis for *trans*-mQTL proximal gene.

Significantly enriched GO terms were selected based on a FDR threshold ( $\text{FDR} \leq 0.05$ ). GO terms are categorized into Molecular function (pink), Cellular components (green), and Biological process (blue).