



**HAL**  
open science

# **Polypose naso-sinusienne : rôle des facteurs inflammatoires dans les dysfonctions épithéliales et perspectives thérapeutiques**

Emilie Bequignon

## **► To cite this version:**

Emilie Bequignon. Polypose naso-sinusienne : rôle des facteurs inflammatoires dans les dysfonctions épithéliales et perspectives thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2019. Français. <NNT : 2019PESC0064>. <tel-03450183>

**HAL Id: tel-03450183**

**<https://theses.hal.science/tel-03450183v1>**

Submitted on 25 Nov 2021

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

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



HAL Authorization

**THÈSE**

**Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris Est Créteil**

---

**Polypose naso-sinusienne : rôle des facteurs  
inflammatoires dans les dysfonctions épithéliales et  
perspectives thérapeutiques**

---

Présentée publiquement par

**Emilie BEQUIGNON**

le vendredi 13 décembre 2019

devant le jury composé de :

|                          |  |                       |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Bernard Maître           | Professeur – Université Paris Est Créteil  | Président du Jury     |
| Camille Taillé           | Professeur - Université Paris Diderot      | Rapporteur            |
| Justin Michel            | Professeur – Aix Marseille Université      | Rapporteur            |
| Christian Debry          | Professeur- Strasbourg Université          | Examineur             |
| Valérie Gouilleux-Gruart | Maitre de Conférence – Université de Tours | Examineur             |
| André Coste              | Professeur – Université Paris Est Créteil  | Directeur de thèse    |
| Jean-François Papon      | Professeur – Université Paris-Sud          | Co-Directeur de thèse |

**Institut Mondor de Recherche Biomédicale**

Inserm UPEC UMR955 Equipe 13 - CNRS ERL 7000

Faculté de Médecine, Créteil, France



## Résumé en Français

---

**Contexte :** Dans la physiopathologie encore mal expliquée à ce jour de la polypose naso-sinusienne (PNS), l'implication de la cellule épithéliale dans la genèse, la croissance et l'inflammation des polypes semble un mécanisme important. La cellule épithéliale présenterait une altération de ses fonctions de maintien de la barrière épithéliale et d'épuration muco-ciliaire. Une dysrégulation des mécanismes de réparation épithéliale serait aussi observée. Les mécanismes conduisant au dysfonctionnement de la cellule épithéliale restent mal connus. Une meilleure compréhension permettrait de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques pour la PNS. Notre hypothèse serait que, parmi les cytokines inflammatoires impliquées dans la PNS, les interleukines (IL) telles que l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-10 pourraient modifier les mécanismes de réparation épithéliale et l'épuration muco-ciliaire. Par ailleurs, les thérapies monoclonales émergentes dans la PNS étant très prometteuses, nous souhaitons avoir une réflexion sur les nouveaux enjeux thérapeutiques et les moyens d'améliorer l'efficacité, la biodisponibilité des traitements déjà utilisés et ceux à développer.

**Objectif :** L'objectif de cette thèse était i/ de préciser les mécanismes d'épuration muco-ciliaire, de réparation épithéliale, différenciation épithéliale en partie *ex vivo* et *in vitro*, dans un modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) issues de polypes, ii/ d'évaluer l'impact sur ces éléments des principales interleukines ayant un rôle reconnu dans l'inflammation chronique de la PNS, en particulier l'IL-6 et iii/ d'évaluer l'expression et la fonction *in vitro* du Récepteur Néonatal pour le Fragment Constant des immunoglobulines (FcRn) dans les CENH comme support de la diffusion locale des biothérapies.

**Méthodes:** Pour évaluer la fonction ciliaire dans la PNS, les bordures ciliées des brossages de polypes ont été analysées *ex vivo* par vidéo-microscopie numérique à haute vitesse pour mesurer: la fréquence de battement ciliaire (FBC), la longueur ciliaire, la densité ciliaire relative, la longueur de l'onde métachrone et enfin l'index d'efficacité du battement ciliaire. L'index d'efficacité du battement ciliaire a été mesuré à l'aide d'un nouvel outil, utilisant le déplacement de microbilles induites par le battement des cils pour calculer la contrainte de cisaillement exercée par le cil sur le fluide. Dans un modèle de cultures primaires de CENH en interface Air-Liquide (ALI), les effets de l'IL-5, IL-6, IL-9 et IL-10 sur la cinétique de fermeture d'une blessure ont été comparés à des conditions contrôles. Après la fermeture de la blessure, le processus de différenciation a été caractérisé dans des conditions basales et après une supplémentation en ILs, en utilisant des immunomarqueurs des cellules basales, caliciformes et ciliées (cytokératine 14, MUC5AC et la tubuline  $\beta$ IV respectivement). La fonction ciliaire au sein des cultures de CENH-ALI a été également analysée. Enfin, l'expression du FcRn dans les CENH a été caractérisée par RT-PCR, Western Blot et immunohistochimie. Des tests de transectose d'un anticorps monoclonal thérapeutique (Infliximab) ont été réalisés dans le sens apico-basal pour tester la fonctionnalité du récepteur FcRn comme support d'une diffusion locale de cet agent thérapeutique.

**Résultats :** Les bordures ciliées de polypes présentaient en microscopie optique, de manière constante, des multiples amas ciliés battants. La FBC moyenne était similaire au sein des polypes (8,4 Hz) versus les bordures ciliées contrôles (8,2 Hz) et significativement plus lente au niveau des cornets inférieurs (6,7 Hz) par rapport aux polypes provenant du même patient. L'index d'efficacité du battement ciliaire était significativement plus bas au niveau des polypes (0,38 mPa) et des cornets inférieurs (0,2 mPa) chez les patients atteints de PNS par rapport aux cornets des patients contrôles (0,87 mPa). Concernant l'influence des ILs sur les dysfonctions épithéliales i) l'IL-6 accélérerait la réparation épithéliale *in vitro* avec un effet dose-réponse, alors qu'aucun effet n'a été observé après stimulation par les autres ILs testées. 24 heures après la blessure, 79% des puits blessés avec IL6-100 (n = 15/19) étaient complètement refermés, contre 46% dans le groupe IL6-10 (n = 10/22), contre 28% dans le groupe IL6-1 (n = 8/29) versus 15% dans le groupe témoin (n = 7/48), ii) au niveau de la zone de blessure la cellularité (nombre de noyaux) en présence d'IL-6 augmentait avec le temps entre le stade précoce de la réparation et le stade tardif de la réparation iii) la stimulation par l'IL-6 entraînait une diminution de la différenciation mucipaire à un stade intermédiaire de la réparation. L'IL-6 a entraîné une augmentation de la FBC et de la longueur de l'onde métachrone, sans modification significative de la densité ciliaire, de la longueur des cils et de l'index d'efficacité. L'expression de l'ARNm et de la protéine FcRn a été mise en évidence dans les CENH à un stade précoce et tardif de culture. Cette expression intense du FcRn était retrouvée dans le cytoplasme des cellules ciliées, des cellules à mucus et des cellules basales. Enfin, la transectose transépithéliale d'un anticorps monoclonal thérapeutique IgG1 avec un effet dose-réponse a été clairement démontrée.

**Conclusion :** Le battement ciliaire, chez les patients atteints de PNS, a une efficacité altérée et une mauvaise coordination. Nos résultats corroborent l'hypothèse d'une dyskinésie ciliaire acquise dans la PNS pouvant participer au processus inflammatoire chronique. Nos résultats suggèrent aussi que l'IL-6 semble impliquée dans la migration, prolifération et dans une moindre mesure la différenciation cellulaire après une blessure épithéliale et jouerait donc un rôle important dans les dysfonctions de la réparation épithéliale. Nous avons enfin décrit, pour la première fois, l'expression du FcRn et la transectose d'un anticorps monoclonal dans un modèle d'épithélium respiratoire nasal humain *in vitro*. Cette dernière partie du travail, qui fait « la preuve du concept », ouvre une voie vers l'administration nasale d'anticorps monoclonaux dépendante du FcRn, dont certains pourraient cibler de façon spécifique la cellule épithéliale dont le rôle dans la physiopathologie de la PNS nous semble capital.

**Mots clés :** rhinosinusite chronique ; polypose naso-sinusienne ; cellule épithéliale ; Interleukine ; IL-6 ; réparation cellulaire ; battement ciliaire ; FcRn ; thérapie monoclonale ; culture en interface air-liquide ; cellules épithéliales nasales humaines

# Résumé en anglais

---

## Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of inflammatory factors on epithelial cell dysfunctions and therapeutic perspectives

**Background:** In chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) alterations in airway epithelial cell functions (including barrier function, wound repair mechanisms, mucociliary clearance) are observed. The mechanisms leading to epithelial cell dysfunction in nasal polyps (NP) remain poorly understood. A better understanding could help to identify new therapeutic targets in CRSwNP. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in CRSwNP, interleukins (IL) such as IL-5, IL-6, IL-9 and IL-10 could alter epithelial repair mechanisms and cilia beating. Since monoclonal antibodies (mAbs) are promising therapies for airway chronic inflammatory diseases (asthma or CRSwNP), it would be interesting to develop new routes for mAbs administration and to improve their efficiency and bioavailability.

**Objective:** The aim of this thesis is to evaluate the effects of ILs, particularly IL-6, on epithelial repair mechanisms in a wound repair model *in vitro*, and on ciliary beating, both *ex vivo* and in primary cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC). The second aim was to study the expression of neonatal Fc receptor (FcRn) in HNEC *in vitro* and the potential function of FcRn in IgG transcytosis through the human nasal airway epithelium as a potential support for local nasal mAbs therapy.

**Methods:** In order to characterize ciliary function in CRSwNP, nasal brushings of NP and of the middle part of the inferior turbinate (IT) are prospectively sampled from patients during surgical procedures for CRSwNP and compared to nasal brushings of IT from control patients (CP). The ciliated edges are analyzed *ex vivo* by digital high-speed video-microscopy to measure: ciliary beating frequency (CBF), ciliary length, relative ciliary density, metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index (obtained with a new tool based on microbead velocity as a marker of the flow generated by cilia beating). Primary ALI (air-liquid interface) cultures of HNEC are used as a model of epithelium healing after mechanical wound. Effects of increasing concentrations of IL-6 (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) and other ILs (IL-5, IL-9, IL-10) on wound closure kinetics are compared to cultures without IL-modulation. After wound closure, the differentiation process is characterized under basal conditions and after IL supplementation using cytokeratin-14, MUC5AC, and  $\beta_{IV}$  tubulin as immunomarkers of basal, mucus, and ciliated cells, respectively. The ciliated edges of primary cultures are analyzed on IL-6 modulation by digital high-speed video-microscopy to evaluate ciliary function. FcRn expression is characterized in HNEC by quantitative RT-PCR, Western blot and immunolabeling. The ability of HNECs to support mAb transcytosis via FcRn is assessed by transcytosis assay.

**Results:** In patients with CRSwNP, beating ciliated cell clusters were found in all brushings from NPs but only in 75% of brushings from IT. Overall, relative ciliary density was not significantly different from CPs while metachronal wavelength and cilia length were significantly lower. Mean CBF (6.7Hz) was also significantly lower in the IT compared to NP (8.4Hz) of the same patients and to CPs (8.2Hz). Ciliary beating efficiency index was significantly lower in CRSwNP both in NP (0.38mPa) and IT (0.2mPa) when compared to CP (0.87mPa).

Concerning the ILs-effects on epithelial cell function, our results showed that: i) IL-6 accelerated airway wound repair *in vitro*, with a dose-response effect, whereas no effect was observed with other ILs. Indeed with IL-6 after 24 hours, 79% of wounded wells were fully repaired at 100 ng/ml, vs. 46% at 10 ng/ml, 28% at 1 ng/ml and 15% in the control wells; ii) Contrary to other ILs, IL-6 increased cellularity (number of nuclei) between the early and late stage of repair in wounded areas and decreased mucus cell differentiation at an intermediate stage of repair iii) IL-6 effect increased CBF and metachronal wave but did not modify ciliary density, length of cilia, and cilia beating efficiency index.

Finally, we demonstrated the expression of FcRn mRNA and protein in HNEC. We reported a high expression of FcRn in the cytosol of ciliated, mucus and basal cells with a higher level of FcRn proteins in differentiated HNEC. We also proved the dose-dependent transepithelial delivery of an IgG1 therapeutic mAb (rituximab) in HNEC.

**Conclusion:** Ciliary beating efficiency seems to be poorly coordinated in patients with CRSwNP. Our results support the hypothesis of acquired ciliary dyskinesia in CRSwNP patients that could participate in the chronic inflammatory process. Our results also suggest that IL-6 could be involved in migration, proliferation, and cell differentiation after epithelial healing, thus playing an important role in epithelial repair dysfunctions in CRSwNP pathophysiology. Finally, this is the first time that FcRn expression and mAb transcytosis were shown in human nasal respiratory epithelial cells *in vitro*. These results are the first step for FcRn-dependent nasal administration of mAbs, targeting not only inflammatory but also epithelial cells. Altogether, our results underline the major role of epithelial cells in CRSwNP pathophysiology and treatment.

**Keywords:** Nasal polyps; chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP); Interleukin; IL-6; epithelial cell; cytokine; ciliary beating; FcRn; monoclonal antibodies; ALI culture; Human Nasal epithelial cells (HNEC)

## Affiliations et unité de recherche

---

### Affiliations

- 1.AP-HP, Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, Créteil, 94010, France;
- 2.INSERM, U955, Créteil, 94010, France;
- 3.Université Paris-Est, Faculté de Médecine, Créteil, F-94010, France;
- 4.CNRS, ERL 7000, Créteil, 94010, France ;

### Lieu de réalisation de la thèse:

**Equipe 13 INSERM U955 CNRS ERL7000**

**Biomécanique & appareil respiratoire**

**(B. Louis & M. Filoche)**

Institut Mondor de Recherche Biomédicale `

Faculté de Médecine

8 rue du General Sarrail  
94010 Créteil Cedex, France

### Correspondence and requests for reprints should be addressed to:

Dr Emilie Béquignon:      INSERM U955 Equipe 13  
                                    Faculté de Médecine  
                                    8 rue du General Sarrail  
                                    94010 Créteil Cedex, France  
                                    Phone : + 33 1 49 81 24 91  
                                    Fax : + 33 1 49 81 24 23  
                                    E-mail: [emilie.bequignon@inserm.fr](mailto:emilie.bequignon@inserm.fr)

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Professeur Camille Taillé et Monsieur le Professeur Justin Michel dont j'admire les parcours, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Je tiens également à remercier Messieurs les Professeurs Bernard Maître, Christian Debry, Jean-François Papon, André Coste et Madame le Docteur Valérie Gouilleux-Gruart d'avoir accepté de participer au jury.

Je tiens à remercier trois chercheurs qui ont accepté de se pencher sur mon berceau et qui m'ont guidée avec bienveillance et rigueur durant toute cette thèse :

- Bruno Louis, responsable de notre unité de recherche l'équipe 13 de l'unité INSERM CNRS U955, qui m'a accueillie chaleureusement dans son unité en novembre 2013, alors que j'étais enceinte ne connaissant rien à la biomécanique cellulaire et respiratoire ! Tu as veillé sur moi comme une mère sur ses cannetons en veillant tard au labo pour m'aider à finir mes manips ou mes présentations de CNU. Tu es un chef d'équipe formidable toujours disponible et à l'écoute !

- André Coste, qui a cru en moi dès le premier jour (peut-être de manière idéaliste au départ ou visionnaire au choix) en me proposant d'embrasser une carrière hospitalo-universitaire alors que je débutais mon second clinicat avec seulement trois papiers publiés en poche à 33 ans et fait trois « power point » dans ma vie. Je crois que toi seul pensait que j'arriverais à atteindre 6 ans plus tard après 2 grossesses, mes 450 points sigaps au moment de soutenir ma thèse de Sciences. Ta carrière est exemplaire et je ne crois pas connaître beaucoup de médecins professeurs chirurgiens ORLs aussi impliqués dans la recherche fondamentale avec une thématique forte qui m'a transportée pendant ces travaux de thèse. Si j'ai déjà fait à ce jour beaucoup de pas, tant sur le plan clinique que sur celui de la recherche, c'est grâce à toi ! Je sais que tu souhaites me transmettre bien plus et j'espère être digne de ta confiance. Un immense merci pour permettre de me réaliser !

- Jean-François Papon, si je suis ORL aujourd'hui c'est tout simplement grâce à notre rencontre dans les couloirs de chirurgie viscérale du 4<sup>ème</sup> étage de l'Hôpital Henri Mondor. J'étais alors en 2<sup>ème</sup> semestre d'internat de chirurgie viscérale et je me destinais à une carrière « nocturne » de greffes hépatiques et d'appendicites. Ton enthousiasme, ton expertise, ton envie de faire partager ton savoir m'ont définitivement conquise ! C'est tellement extraordinaire, des années plus tard, d'avoir la chance de travailler avec toi ! Je pense que nous avons encore de longues pages « pubmed » à écrire ensemble, je l'espère !

Je souhaite remercier particulièrement deux femmes, chercheuses, modèles de réussite au féminin, exigeantes et passionnées :

Estelle Escudier, tu m'as prise sous ton aile et tu m'as fait progresser dans la démarche scientifique ! Tu m'as appris à savoir se remettre en question et toujours s'interroger sur le pourquoi des choses les échecs comme les réussites. Tu es un exemple pour moi !

Valérie Gouilleux-Gruart, notre collaboration a été très riche. Tu as été d'une grande disponibilité et toujours de bons conseils. Je te remercie pour la bienveillance avec laquelle tu m'as accueilli à Tours. J'espère que nous allons continuer à travailler ensemble !

Pendant toutes ces années j'ai eu la chance de travailler dans une équipe de recherche formidable conviviale, gourmande et studieuse représentée par des personnes que je tiens à remercier ici :

- Daniel Isabey ton regard malicieux et bienveillant, ton savoir m'ont entouré pendant ces 4 années de thèse !

- Marcel Filoche, co-responsable de notre équipe de recherche, entre eux avions pour les quatre coins du monde où tu pars faire des conférences pour partager ton expertise, tu n'as jamais manqué de venir

me soutenir et me guider pendant ces années de thèse. Je suis sûre que nous allons concrétiser de beaux projets de recherche dans les années à venir !

- Gabriel Pelle, pour tes conseils toujours judicieux ;
- mes co-thésards Christelle Angely, Mathieu Bottier, Sofia André Dias pour tous ces bons moments partagés au labo et tout ce que vous m'avez appris ! Je vous souhaite de brillantes carrières de chercheurs !
- Patricia Zadigue pour m'avoir appris patiemment les cultures ;
- Virginie Fournier, tu viens juste d'arriver mais je sais que je vais pouvoir compter sur toi au labo !
- David Mangin, Justine Bécaud, Marion Renaud, étudiants de Master 2 (qui ne sont plus étudiants maintenant !) que j'ai co-encadrés avec André Coste. Un grand bravo pour tout votre travail accompli et votre aide dans ces travaux de recherche.

Je tiens également à remercier :

- Le service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles de l'Hôpital Henri Mondor, dirigé par Geneviève Derumeaux, en particulier Françoise Zerach-Lancner (la cadore des stats !), Ala Covali et Laurent Boyer, j'adore travailler avec vous!

- L'unité UMR 7292, CNRS de Tours qui m'a accueillie chaleureusement en particulier Christine Dhommée qui m'a appris patiemment les RT-PCR, les Western Blot. Merci de ta gentillesse et de ta disponibilité et de ton aide apportée dans ces travaux.

- L'unité U933, dirigée par Serge Amselem en particulier Ludovic Janson, l'As des Western Blot ! merci de ton aide ! Lucie Thomas, merci de tout ce que tu m'as transmis et de ton aide dans les travaux de cette thèse, merci à Marie Legendre, nos collaborations sont toujours fructueuses !

-L'unité fonctionnelle d'ORL de l'Hôpital Henri Mondor, dont j'assume la gestion sous la responsabilité d'André Coste, en particulier Elisabeth Dromard, Virginie Bacon, Christelle Pereira qui ont toujours compris l'importance pour moi de mes travaux de recherche. Vous êtes consciencieuses, humaines et efficaces. Je sais que je peux compter sur vous ! A ma secrétaire parfaite Laurence Vimeux, je t'adore !

- La consultation du service d'ORL de l'Hôpital Intercommunal de Créteil dirigé par André Coste, en particulier Sylvie Rocca, Virginie Broquet qui me sont d'une aide précieuse au quotidien; vous êtes des infirmières exceptionnelles! A mes chers collègues Héloïse de Kermadec, Lydia Brugel-Ribère, Anne Gauthier, Virginie Prulière-Escabasse, Sophie Bartier, Christelle Cailleaux, Laurence Dupuy, Claire Parra, David Mangin, Véronique Chatelin, Samia Borgi et les internes qui me soutiennent et m'aident dans mes recherches ! Je remercie Le professeur Bernard Maître et le Docteur Benoît Douvry du service de pneumologie pour leur confiance et leur disponibilité.

- Toutes les IBODEs et les aides-soignantes du bloc ORL de l'Hôpital Intercommunal de Créteil qui participent à l'organisation des cultures primaires de cellules épithéliales nasales.

-Je tiens à rendre hommage à la mémoire d'Issam Abd el Samad, ancien chef de service d'anatomopathologie de l'Hôpital Intercommunal de Créteil qui avait accueilli, avec enthousiasme tous mes projets de recherche et qui m'avait offert son amitié. Tu me manques !

- Ma famille et belle-famille, vous êtes mon équilibre et mon essentiel. Vous me soutenez beaucoup et je vous remercie infiniment de faire que ma vie soit possible, que je puisse être chercheuse, enseignante,

chirurgienne, prendre soin de mes patients tout en assurant ma vie de famille et en particulier Cyril, Stella et Daphné : vous me comblez de bonheur au quotidien et vous serez toujours ce qui est le plus important pour moi ! Je sais Stella que tu es impatiente (autant que mes directeurs de thèse) que je finisse d'écrire « ce livre » pour le lire !

- Mes amis, en particulier Emilie Jullien, Isabelle Fantini, Séverine Fantini, Blanche Chevassu, Clémence Jullien, Camille Stora, Aurore Malric, Régis Sultan, mes amis de toujours !

Mes collègues ORLs, devenus mes amis, Isabelle Wagner, Lia Guilleré, Wissame El Bakkouri, Marie Devars Du Mayne, Yann Nguyen, Benjamin Vérillaud, Aida Ait Mansour, Vincent Latournerie, Celeste Rebours, Katell Ruellan, Tam Cloutier, Jean-Baptiste Maldent avec lesquels j'apprécie de travailler autant que de faire la fête ensemble.

Je remercie enfin Brigitte David pour son aide, sa gentillesse et sa disponibilité au cours des démarches administratives durant cette thèse !

## Liste des abréviations

---

AC : anticorps  
AERD : Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease  
ALI : Interface air liquide  
AMM : Autorisation de mise sur le marché  
ARNm : ARN messenger  
ATA : Alpha tubuline acétylée  
AUC : aire sous la courbe (courbe ROC)  
bFGF : basic fibroblast growth factor  
CENH : Cellules épithéliales nasales humaines  
CK14 : Cytokératine14  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
FBC : Fréquence du battement ciliaire  
FcRn : Recepteur neonatal pour le Fragment Constant des Immunoglobulines  
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulation factor  
Ig: Immunoglobuline  
IL: Interleukin  
ILC2 : type 2 innate lymphoid cells  
LOOM : longueur d'onde de l'onde métachrone  
MMP : matrix-métalloprotéinases  
MUC: Mucines  
PNE : Polynucléaire éosinophiles  
PNN : Polynucléaires neutrophiles  
PNS : Polyposse naso-sinusienne  
RAST : Radioallergosorbant Test  
RSC : Rhinosinusite Chronique  
SA : Staphylococcus aureus  
SAE : Staphylococcus aureus enterotoxin  
TER : résistance transépithéliale  
TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta  
TDM : Tomodensitométrie  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
VMHV : Vidéomicroscopie à haute vitesse  
VPP : Valeur prédictive positive  
VPN : Valeur prédictive négative  
ZO-1 : Zonula occludens 1

## Liste des figures empruntées à la littérature

---

**Figure 1 :** Schéma illustrant le potentiel rôle du superantigène staphylococcique dans la PNS

**Figure 2 :** Graphique présentant la corrélation entre profils inflammatoires et association entre la présence de PNS, d'asthme et d'un risque élevé de récurrence d'après une analyse en clusters basée sur le profil d'expression des cytokines dans la PNS, le niveau d'IgE et l'expression de certains médiateurs inflammatoires

**Figure 3 :** Schéma présentant les mécanismes de recrutement, migration, activation des éosinophiles dans les exacerbations de l'asthme induits par certaines facteurs inflammatoires

**Figure 4 :** Boucle autocrine d'activation des éosinophiles par les IL-5, cellules capables d'induire elles-mêmes la synthèse d'IL-5

**Figure 5 :** Voies de signalisation activées par IL-5 dans les polynucléaires à éosinophiles

**Figure 6 :** Sources cellulaires et facteurs de transcription capables de produire de l'IL-9

**Figure 7 :** Expression de la protéine IL-6 (quantité dosée par ELISA) sur les polypes, les tissus épithéliaux respiratoires des patients contrôles et les tissus épithéliaux respiratoires de patients porteurs d'une sinusite chronique sans polype

**Figure 8 :** Voies de signalisation intracellulaire activées par la fixation de l'IL-6 à son récepteur membranaire (IL-6 signaling) ou à son récepteur soluble (IL-6 trans-signaling)

**Figure 9 :** Représentation schématique des voies et des types de cellules induits par l'IL-6 impliqués dans la pathogenèse de l'asthme allergique

**Figure 10 :** Modèle hypothétique d'implication de l'IL-6 à partir de différents sources cellulaires dans les 2 profils inflammatoires Th1 et Th2 dans la physiopathologie de l'asthme allergique induit

**Figure 11 :** Voies de signalisation intracellulaire activées par la Liaison de l'IL-10 à son récepteur

**Figure 12 :** Illustration schématique de la séquence de formation de polypes

**Figure 13 :** Coupe histologique longitudinale d'un épithélium cilié

**Figure 14 :** Schéma du système de défense de l'épithélium respiratoire des voies aériennes

**Figure 15 :** Etapes de la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes dans le modèle de xéno greffe humanisée dans la souris nude

**Figure 16 :** Illustration résumant le rôle des cellules accessoires de la réponse immunitaire Th2 dans la réparation des blessures épithéliales et la fibrose de type 2

**Figure 17 :** Pourcentage de fermeture des blessures *in vitro* en fonction du temps et en fonction de l'exposition ou non aux facteurs inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 dans un modèle de culture primaire en ALI de cellules épithéliales nasales humaines issues de biopsies de tissu épithélial sain

**Figure 18 :** Effet connu de l'IL-9 sur les différentes cellules de l'inflammation et sur les cellules épithéliales

**Figure 19** : Graphique présentant le rôle de l'IL-9 capable à l'état transfecté d'induire la prolifération cellulaire des cellules épithéliales Caco2 (A) et RKO (B)

**Figure 20** : Effet de la réparation cellulaire sur la sécrétion d'IL-10

**Figure 21** : Comparaison du pourcentage de fermeture des blessures et du pourcentage d'incorporation du BrDu comme marqueur de la prolifération cellulaire en présence d'IL-10 ou dans des cultures cellulaires d'épithélium intestinal sans IL-10

**Figure 22** : Images en microscopie électronique montrant le remodelage tissulaire dans l'asthme

**Figure 23** : Implication de l'épithélium dans la physiopathologie de l'asthme

**Figure 24** : Illustration des biothérapies ciblant l'IL-5 ou son récepteur

**Figure 25** : Différenciation épithéliale obtenue *in vitro* après 3 semaines de cultures (J21) de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) dans le modèle de culture utilisé pour cette thèse

**Figure 26** : Validation de notre modèle de culture par analyse de la reproductibilité de la taille des blessures

**Figure 27** : Exemple d'appareil d'automatisation des tests de blessure

**Figure 28** : Exemple de logiciel permettant le calcul automatique de la surface cicatrisée par traitement d'image et analyse d'images (Adcis)

**Figure 29** : Suivi de microbilles et index d'efficacité par le suivi de billes

**Figure 30** : Comparaison des différents paramètres d'analyse quantitative du battement ciliaire entre les groupes « rhinosinusites chroniques » et « contrôle »

**Figure 31** : Effet de l'ajout de microbilles sur la fréquence de battement ciliaire

**Figure 32** : Structure cristalline d'un FcRn de rat

# Sommaire

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Résumé en Français</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>Résumé en anglais</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>Affiliations et unité de recherche</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Remerciements</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>Liste des abréviations</b> .....  | <b>8</b>  |
| <b>Liste des figures empruntées à la littérature</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>Sommaire</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>1. Introduction</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>2. Physiopathologie de la polypose naso-sinusienne et implications pour les biothérapies</b><br>.....                 | <b>17</b> |
| <b>2.1. Etiopathogénie de la PNS : facteurs d’agression exogènes et facteurs prédisposants</b> ....                      | <b>17</b> |
| <b>2.2. La Polypose Naso-Sinusienne: modèle de maladie inflammatoire à éosinophiles</b> .....                            | <b>21</b> |
| 2.2.1 Recrutement, prolifération et activation des éosinophiles .....  | 21        |
| 2.2.2 Rôle des interleukines dans les processus inflammatoires à éosinophiles et dans la PNS .....                       | 23        |
| 2.2.3 Rôle de la sensibilisation IgE-dépendante dans le processus inflammatoire à éosinophiles dans la<br>PNS .....      | 30        |
| 2.2.4 Contribution des polynucléaires à éosinophiles à la formation des polypes.....                                     | 31        |
| <b>2.3. La Polypose naso-sinusienne: modèle de dysrégulation épithéliale</b> .....                                       | <b>33</b> |
| 2.3.1 La Polypose Naso-sinusienne, modèle de dysfonction de la barrière épithéliale? .....                               | 34        |
| 2.3.2 La Polypose Naso-sinusienne, modèle de dysrégulation de la réparation épithéliale ? .....                          | 37        |
| 2.3.3 La Polypose Naso-sinusienne : modèle de dysrégulation de l’épuration muco-ciliaire ?.....                          | 46        |
| <b>2.4. PNS et Asthme, des caractéristiques physiopathologiques communes</b> .....                                       | <b>49</b> |
| <b>2.5. Le traitement de la PNS et enjeux d’avenir pour les biothérapies</b> .....                                       | <b>52</b> |
| 2.5.1 Stratégies thérapeutiques médicales recommandées.....  | 52        |
| 2.5.2 Place du traitement chirurgical endoscopique .....   | 53        |
| 2.5.3 Nouveaux enjeux thérapeutiques.....  | 53        |
| <b>3. Objectifs de la thèse</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>4. Méthodes spécifiques à l’étude des cellules épithéliales: choix, justifications, limites</b> <b>61</b>             |           |
| <b>4.1. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines en interface air-<br/>    liquide</b> ..... | <b>61</b> |
| <b>4.2. Modèle <i>in vitro</i> de blessure mécanique de l’épithélium</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>4.3. Outils d’analyse du battement ciliaire</b> .....   | <b>68</b> |
| <b>5. Travaux</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>5.1. Caractérisation de l’efficacité du battement ciliaire dans la PNS</b> .....                                      | <b>73</b> |
| 5.1.1 Contexte et objectif du travail .....  | 73        |
| 5.1.2 Méthodes .....   | 73        |
| 5.1.3 Principaux résultats.....  | 73        |
| 5.1.4 Discussion.....  | 75        |
| 5.1.5 Article soumis .....   | 78        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.2. Influence des cytokines sur la réparation épithéliale et sur le battement ciliaire .....</b>   | <b>96</b>  |
| 5.2.1 Contexte et objectif du travail .....  | 96         |
| 5.2.2 Méthodes .....   | 98         |
| 5.2.3 Principaux résultats.....  | 98         |
| 5.2.4 Discussion.....  | 104        |
| 5.2.5 Article soumis .....   | 106        |
| <b>5.3. Expression du FcRn et transcytose d'anticorps monoclonal via le FcRn dans la cellule épithéliale : prérequis pour une nouvelle voie d'administration des biothérapies par voie nasale dans la PNS.....</b> | <b>130</b> |
| 5.3.1 Contexte et objectif du travail .....  | 130        |
| 5.3.2 Méthodes .....   | 131        |
| 5.3.3 Résultats.....   | 132        |
| 5.3.4 Discussion.....  | 132        |
| 5.3.5 Article publié .....   | 135        |
| <b>6. Synthèse et discussion générale.....</b>   | <b>150</b> |
| <b>7. Conclusion et perspectives .....</b>   | <b>153</b> |
| <b>8. Annexes .....</b>  | <b>155</b> |
| Annexe 1 : Protocole de mise en culture de cellules épithéliales nasales humaines .....  | 155        |
| Annexe 2 : Techniques de mesure des paramètres d'analyse du battement ciliaire .....   | 157        |
| Annexe 3 : comité de protection des personnes Ile de France X.....   | 163        |
| Annexe 4 : Protocole de transcytose d'un anticorps monoclonal au travers d'une culture de cellules épithéliales épithéliales nasales humaines exprimant le FcRn .....  | 165        |
| <b>9. Bibliographie.....</b>   | <b>168</b> |
| <b>Résumé .....</b>  | <b>183</b> |

# Introduction

---

### 1. Introduction

---

La polypose naso-sinusienne (PNS), encore appelée dans la littérature anglo-saxonne « rhinosinusite chronique avec polypes » est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires supérieures caractérisée par le développement de tumeurs oedémato-fibro-épithéliales bénignes, les polypes, dans les cavités nasales et sinusiennes de la face. Sa prévalence est de 4% aux Etats-Unis et varie de 2 à 4% en Europe (Settipane and Chafee 1977, Hedman, Kaprio et al. 1999, Klossek, Neukirch et al. 2005). Outre l'infiltration granulocytaire et lymphocytaire du stroma inhérente à la réaction inflammatoire (Gevaert, Holtappels et al. 2005), le polype se caractérise par des modifications de l'épithélium (hyperplasie, érosion, métaplasie), de la membrane basale (épaississement) et de la matrice extracellulaire (oedème, fibrose) (Berger, Kattan et al. 2002, Couto, Fernades et al. 2008, Soler, Sauer et al. 2009). Au plan clinique, ces polypes sont responsables d'une rhinorrhée chronique, d'une obstruction nasale ainsi que de troubles de l'odorat entraînant une altération majeure de la qualité de la vie. D'après la définition édictée dans l'EPOS (European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps) en 2012, la PNS appartient à la superfamille des rhinosinusites chroniques (RSC), c'est à dire un syndrome clinique caractérisé par des symptômes persistants depuis plus de 12 semaines et une inflammation de la muqueuse sino-nasale (Fokkens, Lund et al. 2012). En résumé, Hopkins a proposé dans the New England Journal of Medicine (Hopkins 2019) les critères diagnostics suivants pour la rhinosinusite chronique avec polypes:

**Critères diagnostics de la rhinosinusite chronique avec Polypes d'après « The New England Journal of Medicine » (Juillet 2019) (Hopkins 2019)**

Inflammation du nez et des sinus qui se caractérise par deux symptômes ou plus parmi :

(au moins l'un d'entre eux doit être l'obstruction nasale ou l'écoulement nasal):

- Obstruction nasale et congestion nasale
- Rhinorrhée (antérieure ou postérieure)
- Douleur ou pression faciale
- Diminution ou perte de l'odorat

Ces symptômes doivent être associés à :

- Des signes endoscopiques de polypes nasaux
- Des opacités diffuses naso-sinusiennes en tomодensitométrie (TDM)

La RSC a généralement été divisée, dans la littérature anglo-saxonne, en CRSsNP « rhinosinusite sans polypes » et CRSwNP « rhinosinusite avec polypes » selon le seul aspect de l'endoscopie nasale. La

définition anglo-saxonne ne coïncide pas totalement avec l'entité nosologique des RSC telle qu'elle est appréhendée en France. En effet, au sein de cette famille des RSC, on retrouve des sinusites de mécanisme local (obstruction localisée du drainage/aération d'une cavité sinusienne, infection dentaire, corps étranger ...) et d'autres, comme la PNS, liées à des dysfonctions de la muqueuse elle-même. Dans certains cas, cette « maladie de la muqueuse » a une cause indentifiable. La maladie allergique en est un bon exemple. Beaucoup plus rarement, la « maladie de la muqueuse » s'intègre dans une maladie systémique (*e.g.* granulomatose avec polyangéite, granulomatose éosinophilique avec polyangéite ou la sarcoïdose), ou peut être la conséquence de maladies génétiques affectant les cellules épithéliales respiratoires (mucoviscidose ou dyskinésie ciliaire primitive) ou enfin d'une immunodéficience systémique congénitale ou acquise. Dans la majorité des autres cas, l'étiopathogénie de la « maladie de la muqueuse » et donc de la RSC reste largement méconnue. La PNS s'intègre dans ce cadre particulier des RSC, et elle peut ainsi être qualifiée de « primitive » par opposition aux PNS qui peuvent être observées dans les conditions citées ci-dessus (*e.g.* mucoviscidose). L'objet de cette mise au point et des travaux présentés est la PNS primitive de l'adulte, que nous nommerons plus simplement PNS.

L'identification des facteurs de l'environnement, qui conduiraient aux mécanismes inflammatoires secondaires dans la PNS, a été un axe de recherche majeur depuis de nombreuses années. Dans une nouvelle approche conceptuelle, quel que soit le facteur initial d'agression capable de léser la barrière épithéliale de défense des voies respiratoires, ce serait le processus inflammatoire chronique développé en réponse à cette agression qui pourrait être déterminant dans le développement des polypes (Kariyawasam 2019). Les cytokines et la réponse immunitaire inadaptée de l'hôte seraient un élément important de la physiopathologie de la PNS conduisant au remodelage épithélial anormal (Danielsen, Tynning et al. 2006).

Dans une revue récente de la littérature (Wynne, Atkinson et al. 2019) un rôle primordial est aussi attribué à la cellule épithéliale dans la pathogénie de la PNS du fait d'altérations de ses nombreuses fonctions incluant une augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale, une altération de la fonction muco-ciliaire, une altération de la réparation épithéliale, et une hyper-sensibilisation à la stimulation antigénique. Les auteurs soulignent l'intérêt d'appréhender les mécanismes spécifiques conduisant aux dysfonctionnements de la cellule épithéliale afin d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques (Kariyawasam 2019). Les traitements actuels médico-chirurgicaux de la PNS sont symptomatiques et le risque de récurrence est élevé. Les biothérapies constituent un nouvel enjeu dans la prise en charge de la PNS. La compréhension de l'influence des facteurs inflammatoires en particulier des cytokines sur la cellule épithéliale est un pré-requis pour identifier les molécules clés capables de constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

*Etat de de l'art sur la polypose naso-sinusienne et les biothérapies, fil conducteur :*

Nous aborderons, dans une première section, une revue des facteurs de l'environnement déclencheurs du processus inflammatoire qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie de la PNS, suivie d'une revue de la littérature concernant la réponse endogène dans la PNS :

- la réponse immunitaire d'une part où la PNS apparaît comme un modèle de maladie inflammatoire à éosinophiles,
- la réponse épithéliale d'autre part où la PNS apparaît comme un modèle de dysrégulation de la fonction épithéliale. Nous chercherons à appréhender tout particulièrement l'interaction entre la cellule épithéliale et les facteurs inflammatoires.

Enfin, dans une dernière section, nous envisagerons les enjeux actuels des biothérapies dans la PNS à la lumière des nouvelles connaissances physiopathologiques.

## 2. Physiopathologie de la polypose naso-sinusienne et implications pour les biothérapies

---

### 2.1. Etiopathogénie de la PNS : facteurs d'agression exogènes et facteurs prédisposants

La PNS est une maladie multifactorielle (Watelet, Dogne et al. 2015) qui résulte d'une inflammation chronique, dont la physiopathologie est encore mal connue. Il existe de nombreuses hypothèses impliquant des facteurs héréditaires, anatomiques et phylogénétiques, des facteurs allergiques systémiques voire locaux et des facteurs infectieux bactériens (en premier lieu le superantigène du *Staphylococcus aureus*) et fongiques (Sharma, Lakhani et al. 2014):

#### *Facteurs héréditaires*

Une histoire familiale de PNS est trouvée chez 14% des patients atteints de PNS (Greisner and Settignano 1996). Des jumeaux identiques, pourtant exposés à des facteurs environnementaux différents ont développé une PNS, suggérant également un lien génétique. Des antigènes leucocytaires humains (HLA) ont été associés à une susceptibilité accrue au développement de polypes nasaux (Molnar-Gabor, 2000) (Molnar-Gabor, Endreffy et al. 2000).

#### *Facteurs anatomiques*

Anatomiquement, le contact étroit des muqueuses en regard dans la cavité nasale pourrait provoquer une réaction inflammatoire et/ou une stase du mucus, avec libération de cytokines conduisant à la formation de polypes (Stammberger and Posawetz 1990). Toutefois, l'étude anatomique osseuse scannographique n'a pas montré de différences entre les patients atteints de rhinosinusite et des sujets contrôles (Jones, Strobl et al. 1997). L'occlusion de l'ostium méatal secondaire à une anomalie anatomique ou un œdème muqueux a également été suggérée comme facteur potentiellement à l'origine du processus inflammatoire (Norlander, Westrin et al. 1996).

#### *Facteurs allergiques*

Le facteur allergique a été proposé dans la physiopathologie de PNS au début des années 70. L'éosinophilie, la dégranulation des mastocytes et le taux élevé d'immunoglobuline (Ig) E fréquemment rapportés dans des cas de PNS suggéraient que l'allergie pouvait être à l'origine de la PNS. Toutefois, une simple rhinoscopie antérieure systématiquement réalisée dans une cohorte de 3000 patients au terrain atopique ne montrait des polypes que dans 0,5% d'entre eux (Caplin, Haynes et al. 1971).

L'incidence de l'allergie dans la PNS serait d'environ 30% mais les tests cutanés positifs ne sont pas plus fréquents chez les patients avec PNS que chez les témoins (Crampette, Serrano et al. 2001, Alobid, Anton et al. 2011, Philpott, Erskine et al. 2018). Une réaction allergique purement locale dans la fosse nasale pourrait être responsable de l'apparition des polypes, car il a été montré que les IgE totales et spécifiques dans le tissu polypoïde étaient en corrélation avec le degré d'éosinophilie sanguine, mais sans rapport avec des prick-tests cutanés positifs (Bachert, Gevaert et al. 2001). Des allergènes d'origine bactérienne pourraient être impliqués : des IgE anti-bactériennes spécifiques ont été identifiées (à l'aide d'un Radioallergosorbant (RAST) test incluant les bactéries les plus souvent présentes au niveau nasal) chez des patients atteints de PNS, mais pas chez ceux atteints d'une rhinite allergique (Calenoff, McMahan et al. 1993). Des allergènes d'origine alimentaire pourraient être également un facteur étiologique : des tests intradermiques positifs pour différents allergènes alimentaires ont été rapportés chez 70% des patients porteurs d'une rhinosinusite chronique avec polypes (Collins, 2006). Cependant la PNS n'est à l'heure actuelle plus considérée comme une maladie allergique IgE-dépendante comme la rhinite allergique ou l'asthme allergique.

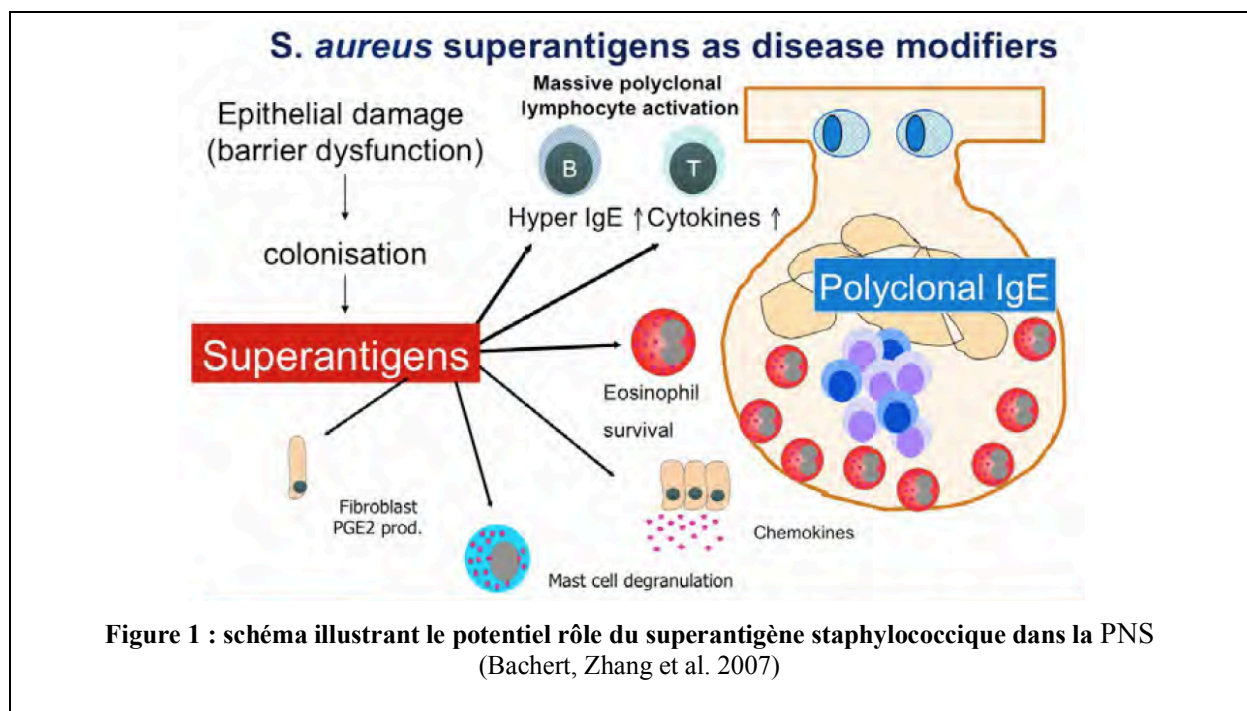
### ***Facteur infectieux bactérien et rôle du superantigène du *Staphylococcus aureus****

L'infection peut déclencher des événements immunologiques menant au développement d'une rhinosinusite chronique. Une étude a rapporté une colonisation à *Staphylococcus aureus* chez les deux tiers des patients avec polypes nasaux, contre moins d'un tiers chez les patients atteints de rhinosinusite chronique sans polypes nasaux et 20% chez des sujets sains contrôles (Van Zele, Gevaert et al. 2004). La prévalence de la colonisation par *Staphylococcus aureus* n'est pas entièrement comprise mais dans une revue de la littérature récente, Vickery et al. montrent comment le rôle du *Staphylococcus aureus* dans la physiopathologie est à présent mieux défini (Vickery, Ramakrishnan et al. 2019) : des IgE qui sont spécifiques d'entérotoxines (ou superantigènes) de *Staphylococcus aureus* (SEA et B) ont été observées dans des tissus issus de PNS (Bachert, Gevaert et al. 2001), indiquant leur rôle pathogénique potentiel. Les superantigènes sont des toxines microbiennes (ou virales) qui ciblent le système immunitaire, déclenchant une prolifération polyclonale des lymphocytes T et leur activation, avec libération massive de cytokines par les lymphocytes T (cf. Figure 1). L'activation massive des lymphocytes B par les superantigènes est, elle aussi, connue pour réguler positivement la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 conduisant à la production d'IgE polyclonale et à la libération d'histamine (Vickery, Ramakrishnan et al. 2019). En conséquence, les superantigènes pourraient induire la synthèse des IgE conduisant à une inflammation à prédominance éosinophilique. Les IgE contre les superantigènes staphylococciques sont en quantité importante chez les patients atteints de PNS et plus encore chez ceux avec un asthme associé. Cependant une simple colonisation à *staphylococcus aureus* (fréquente dans la population générale), ne conduit pas toujours à la production de superantigènes et d'autres facteurs doivent être impliqués (Zhang, Gevaert et al. 2005). Plus récemment, Altunbulaki et al. (Altunbulakli, Costa et al. 2018) ont rapporté que l'infection *Staphylococcus aureus* au niveau de l'épithélium sain de

cornets inférieurs de patients contrôles augmenterait l'expression de l'ARNm de plusieurs protéines constituant les jonction serrées (la claudine, l'occludine, la tricelluline, la ZO-3 et la E-cadhérine); par opposition à l'absence de modifications ou dans certains cas, la diminution du taux des mêmes ARNm dans les polypes exposés au *Staphylococcus aureus* (Altunbulakli, Costa et al. 2018). Ainsi, la présence du *Staphylococcus aureus* pourrait renforcer la fonction de barrière épithéliale lorsque l'épithélium est sain et au contraire aggraver son dysfonctionnement dans la PNS. Cette observation illustre l'importance potentielle des interactions hôte-micro-organisme dans notre compréhension de la physiopathologie de la PNS. Une étude récente de Valera et al. (Valera, Ruffin et al. 2019) a montré in vitro que le *Staphylococcus aureus* inhibait la réparation épithéliale dans des cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) issues de patients atteints de PNS (Valera, Ruffin et al. 2019). Feazel et al. a démontré de son côté, que la présence accrue de *Staphylococcus aureus* est corrélée à une diminution de la biodiversité bactérienne globale (Feazel, Robertson et al. 2012).

La formation des polypes a pu être étudiée dans plusieurs modèles animaux, le plus récent permet la reproduction de lésions polypoïdes dans les fosses nasales dans les suites d'une exposition répétée durant 3 semaines à l'ovalbumine et pendant 8 semaines à l'entérotoxine B du *staphylocoque aureus*, sur un modèle murin (Kim, Lee et al. 2016).

En conclusion, le *Staphylococcus aureus* pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie de la PNS en déclenchant une réponse immunitaire spécifique, en favorisant le dysfonctionnement de la barrière épithéliale et en modifiant le microbiome (Vickery, Ramakrishnan et al. 2019).



### ***Facteur infectieux fongique***

Les cas de sinusite fongique allergique avérée se caractérisent par une polypose nasale diffuse atypique. La présence de champignons dans les cavités naso-sinusiennes chez les patients atteints de rhinosinusite chronique a conduit à suggérer que la colonisation fongique pourrait jouer un rôle étiologique dans la PNS (Ponikau, Sherris et al. 1999), grâce au recrutement des éosinophiles conduisant à la libération de médiateurs inflammatoires. Toutefois, les agents fongiques peuvent être observés chez les sujets normaux et la majorité des patients atteints de PNS ont des prick-tests cutanés négatifs aux allergènes fongiques (Drake-Lee, Lowe et al. 1984). Plusieurs études réalisées *in vivo* montrent cependant que l'exposition à des spores mycéliens peut induire une réponse locale inflammatoire avec une augmentation de la production d'interleukine (IL) IL-6 et du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) (Ruotsalainen, Hirvonen et al. 1998, Jussila, Ruotsalainen et al. 1999) (Huttunen, Ruotsalainen et al. 2000). Le rôle des facteurs fongiques sur l'épithélium respiratoire n'a pas été étudié et que l'hypothèse fongique n'a pas été démontrée.

### ***Pathologies associées***

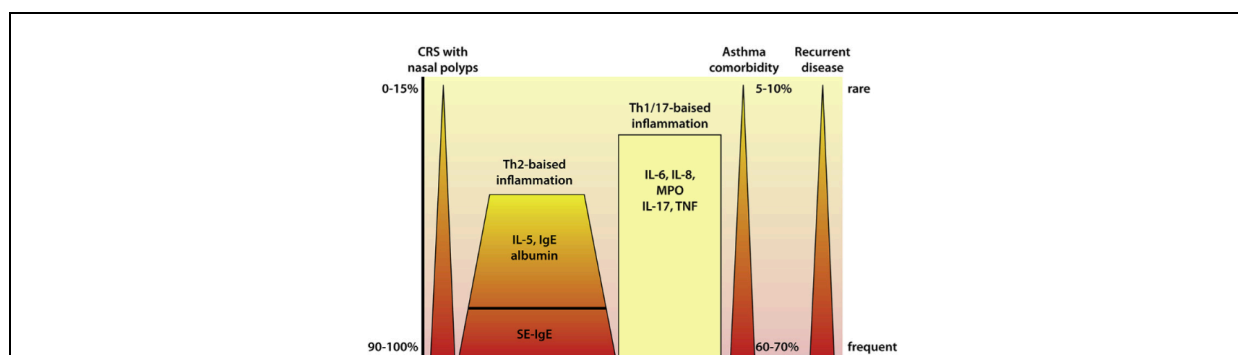
Il existe des associations épidémiologiques claires entre la PNS et d'autres maladies. La prévalence de la PNS chez les patients asthmatiques serait d'environ 7%, 13% chez les patients porteur d'un asthme non allergique et 5% chez les patients porteurs d'un asthme allergique (Settipane 1996, Fokkens, Lund et al. 2012). Toutefois, chez les patients avec PNS, la prévalence de l'asthme est plus élevée à 45% (Rugina, Serrano et al. 2002). D'autres études dans littérature montrent une prévalence de 20 à 40 % de l'asthme chez les patients porteurs d'une PNS (Fokkens, Lund et al. 2012). De plus, les patients atteints de PNS sont plus susceptibles de présenter un asthme que les patients atteints de RSC sans polype, avec un risque multiplié par 7,5 (Batra, Tong et al. 2013). Il existe une association encore plus forte chez les patients présentant une hypersensibilité à l'aspirine et un asthme avec plus de 90% de ces patients ayant une PNS. Cette association est maintenant désigné comme une maladie respiratoire exacerbée par l'aspirine (AERD), ayant été préalablement appelée «triade de Samter» (Samter and Beers 1968) ou en France syndrome de Widal décrit pour la première fois par le Docteur Fernand Widal en 1929.

**En résumé, plusieurs agents exogènes semblent en cause dans la PNS en tant que facteur d'agression initiale ou facteur aggravant la réponse inflammatoire chronique. En particulier, le rôle du *Staphylococcus aureus* a été récemment beaucoup étudié; il serait considéré comme un facteur aggravant de la maladie en déclenchant une réponse immunitaire spécifique, en favorisant le dysfonctionnement de la barrière épithéliale et en modifiant le microbiome.**

## 2.2. La Polypose Naso-Sinusienne: modèle de maladie inflammatoire à éosinophiles

### 2.2.1 Recrutement, prolifération et activation des éosinophiles

Dans une des principales hypothèses physiopathologiques, la formation des polypes résulterait d'une réponse immunitaire inappropriée à des antigènes, responsable d'une inflammation chronique (Chin and Harvey 2013). En particulier, des auteurs majeurs dans la littérature de la PNS, Bachert et Gevaert ont montré, il y a maintenant plus de 20 ans, qu'une des clés de la compréhension de la physiopathologie des polypes était la **régulation du recrutement, de la prolifération et de l'activation des polynucléaires éosinophiles** ainsi que leurs effets sur la formation et la croissance des polypes (Bachert, Wagenmann et al. 1998) (Bachert and Geveart 1999). Par analogie, il a été montré également que les éosinophiles seraient impliqués de façon majeure dans les formes d'asthme sévère et les exacerbations des patients asthmatiques (Nakagome and Nagata 2018). Les polypes sont caractérisés par une infiltration de cellules inflammatoires dont principalement les éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes T. Il existe deux profils immunitaires au sein de la PNS, basés sur la prédominance de l'infiltrat inflammatoire: soit une prédominance de polynucléaires éosinophiles (PNE) notamment en Europe au sein d'un environnement cytokinique proTh2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-9), soit une prédominance de polynucléaires neutrophiles au sein d'un environnement cytokinique proTh1/Th17 (IL-8, IL-6, IL-17, IL-10, TNF), notamment en Asie (Cao, Li et al. 2009, Hamilos 2015, Stevens, Lee et al. 2015) (cf. Figure 2). Dans la PNS, il existe des médiateurs inflammatoires qui sont sécrétés par les lymphocytes T mais également par d'autres types cellulaires comme nous allons le voir et qui sont considérés comme des facteurs clés de l'accumulation des éosinophiles dans les polypes (Bachert, Gevaert et al. 2000).



**Figure 2 : Graphique présentant la corrélation entre profils inflammatoires et association entre la présence de PNS, d'asthme et d'un risque élevé de récurrence d'après une analyse en clusters basée sur le profil d'expression des cytokines dans la PNS, le niveau d'IgE et l'expression de certains médiateurs inflammatoires**

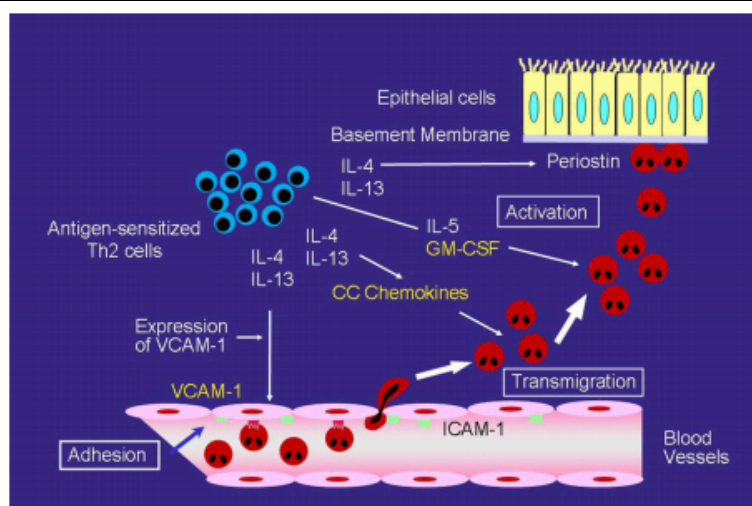
La réponse inflammatoire de type Th2 est associée à la présence de polypes, d'association à l'asthme en comorbidité et la tendance à la récurrence de la maladie

Abréviations : MPO : myeloperoxydase ; SE-IgE : sécrétion d'IgE spécifique de l'entérotoxine du *staphylococcus aureus* (Bachert, Zhang et al. 2015) d'après les travaux de (Tomassen, Vandeplass et al. 2016)

La première étape pour le recrutement sélectif des éosinophiles est l'adhésion des éosinophiles aux cellules endothéliales grâce à une molécule d'adhésion VCAM-1 (Nakagome and Nagata 2018). Parmi les cytokines Th2, le facteur de nécrose tumorale alpha, le TNF- $\alpha$ , et les interleukines IL-4/IL-13 peuvent augmenter l'expression des molécules d'adhésion cellulaires vasculaires et faciliter ainsi la migration des éosinophiles dans le tissu (Schleimer, Sterbinsky et al. 1992, Bochner 1997) (Nakagome and Nagata 2018).

L'étape suivante est la transmigration des éosinophiles à partir du secteur vasculaire dans la muqueuse nasosinusienne. Les mêmes lymphocytes Th2 vont produire des chimiokines telles que RANTES ou l'Eotaxine qui sont des puissants chimiotactiques pour les éosinophiles, et dont l'expression est augmentée dans les polypes (Bachert, Wagenmann et al. 1998, Bachert, Gevaert et al. 2000) et chez les patients asthmatiques (Nakagome and Nagata 2018).

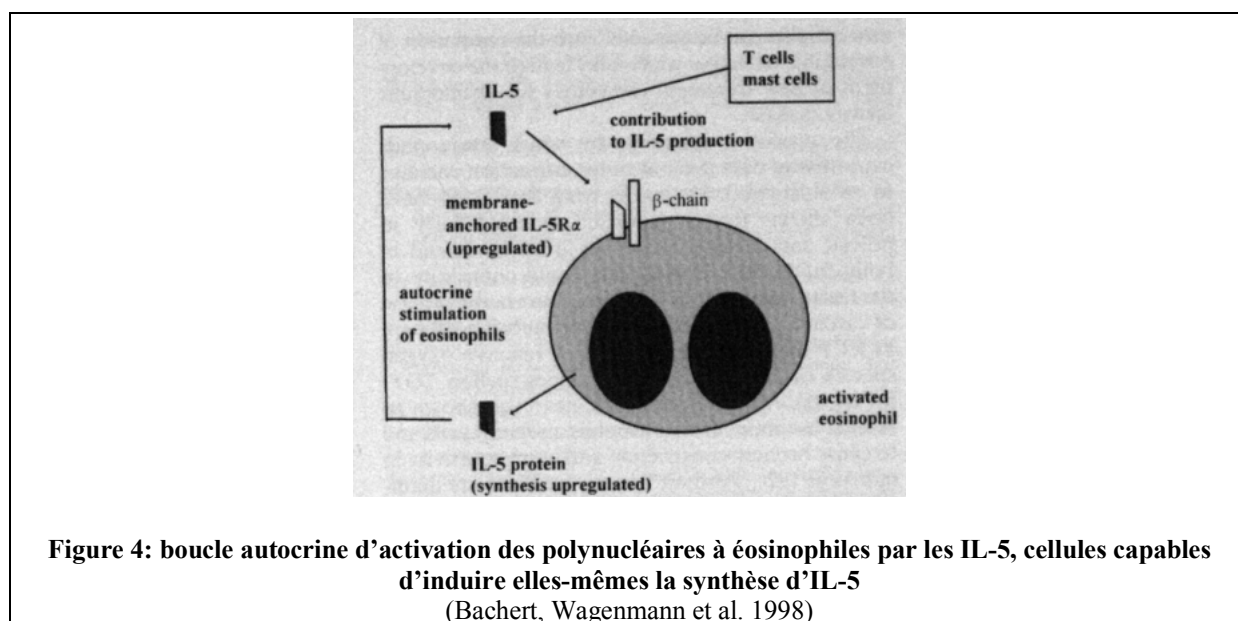
Une fois que les éosinophiles ont infiltré la muqueuse, les facteurs de stimulation GM-CSF produits par des colonies de granulocytes/macrophages et l'IL-5 vont induire leur activation et prolonger leur survie par inhibition de l'apoptose) (Nakagome and Nagata 2018). La periostine, également induite par IL-4/IL-13, permet l'adhésion des éosinophiles à l'épithélium respiratoire et provoque leur dégranulation (Noguchi, Nakagome et al. 2016). L'ensemble de ces étapes est déjà bien décrit dans les mécanismes inflammatoires présents au niveau des bronches dans l'asthme (cf. Figure 3) et semble s'appliquer à la muqueuse nasosinusienne dans la PNS.



**Figure 3 : Schéma présentant les mécanismes de recrutement, migration, activation des éosinophiles dans les exacerbations de l'asthme induits par certains facteurs inflammatoires (IL-4/IL-13, VCAM-1, Chemokines, GM-CSF et IL-5 produits par les cellules lymphocytaires de type Th2)**

(Nakagome and Nagata 2018)

Ce phénomène de recrutement, migration activation des éosinophiles est amplifié par le fait qu'une variété importante d'autres types cellulaires telles que les fibroblastes et les mastocytes, sont capables de produire les cytokines et les chemokines déjà citées mais aussi l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-8 (Nakagome and Nagata 2018). Enfin, élément majeur dans la physiopathologie, les éosinophiles sont eux-mêmes une source importante d'une variété de cytokines/chemokines (IL-5, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , et le TGF- $\beta$ ) et sont donc capables d'autoentretenir la réaction immuno-inflammatoire. En particulier la plus grande source d'IL-5 proviendrait des éosinophiles eux-mêmes avec la véritable possibilité de réaliser une boucle autocrine nécessaire à leur activation et leur survie au sein des polypes (cf. Figure 4) (Bachert, Wagenmann et al. 1998). L'IL-5 a donc été mise en avant comme une des cytokines clés dans la physiopathologie de la PNS capable d'induire une accumulation majoritaire de cellules éosinophiliques au sein des polypes (Bachert, Wagenmann et al. 1997, Rudack, Stoll et al. 1998).

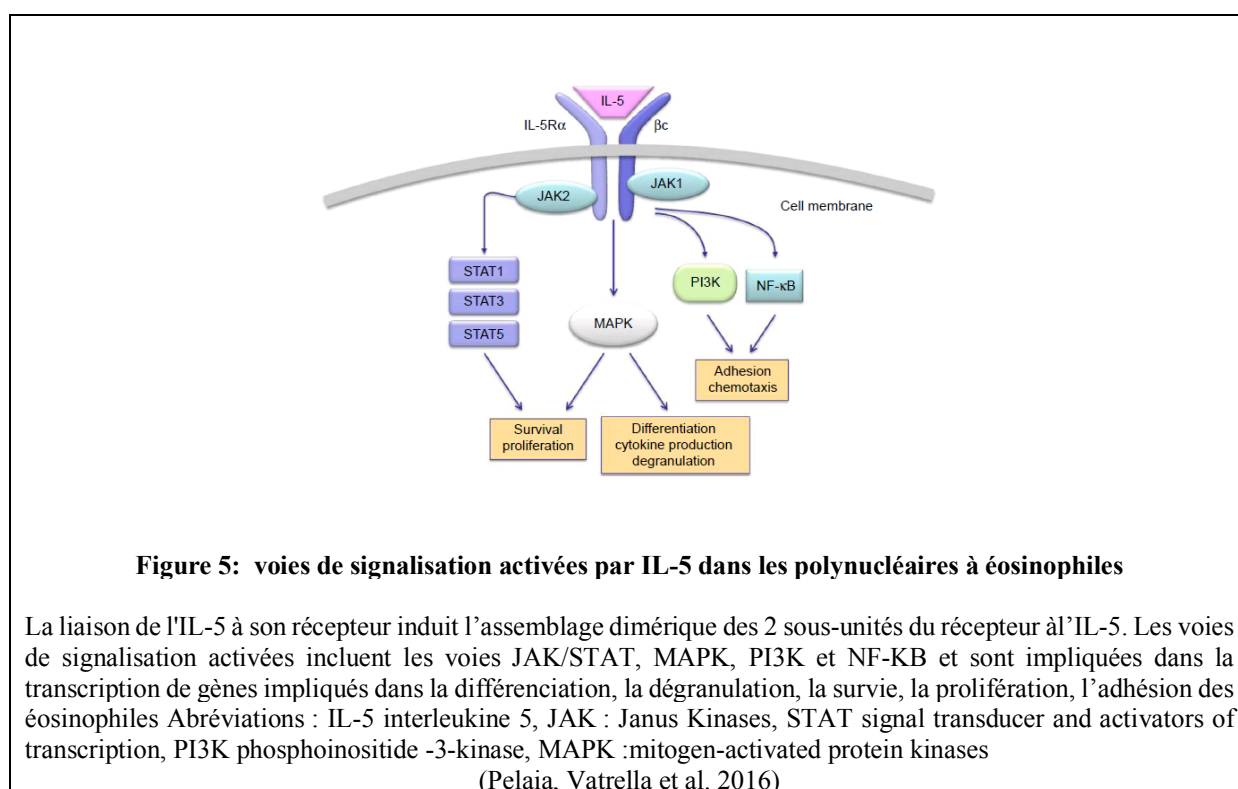


### 2.2.2 Rôle des interleukines dans les processus inflammatoires à éosinophiles et dans la PNS

#### Rôle de l'IL-5 dans les processus inflammatoires à éosinophiles et dans la PNS

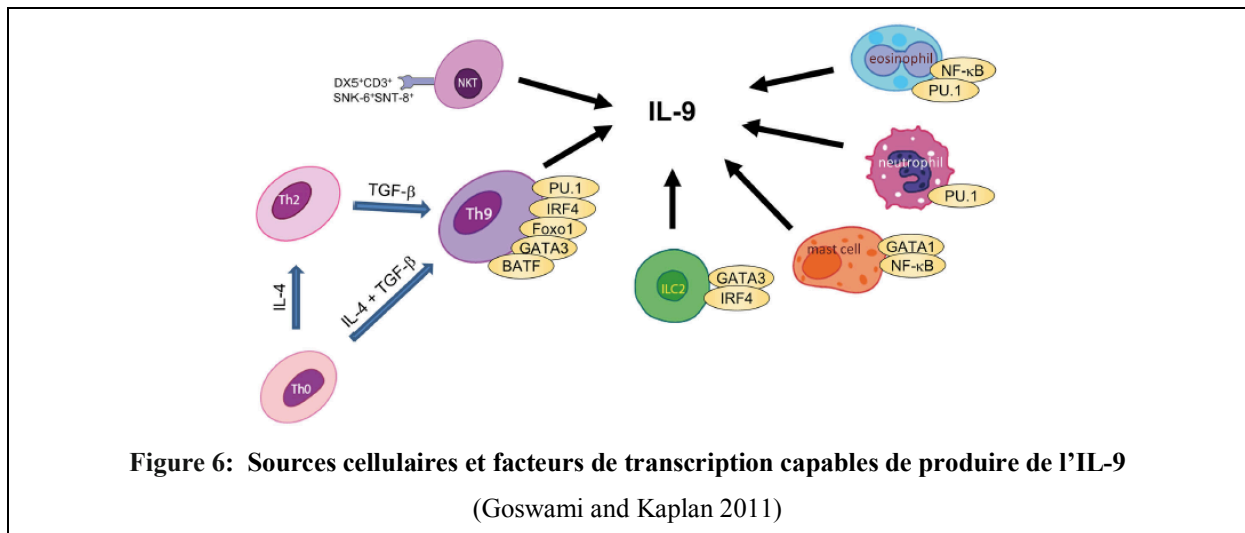
L'IL5 est une glycoprotéine produite par des lymphocytes T activés de type Th2, les mastocytes, les lymphocytes innés du groupe 2 (ILC2s) et les polynucléaires éosinophiles (PNE) eux-mêmes. L'IL5 a deux principales cellules cibles: les lymphocytes B et les PNE ; d'une part l'IL-5 joue un rôle clé dans la différenciation, la survie, la migration et l'activation des éosinophiles; d'autre part, l'IL5 induit l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Ces lymphocytes B ainsi activés synthétisent des IgE et induisent la prolifération de PNE (Pelaia, Vatrella et al. 2016). Le récepteur à l'IL-5 se compose d'une sous-unité spécifique de l'IL5 $\alpha$  (IL-5R $\alpha$ ) et d'une sous-unité non spécifique  $\beta$ c. L'interaction de l'IL-5 à son récepteur active une voie de transduction intracellulaire incluant les Janus

Kinases (JAK 1 et JAK 2) (cf. Figure 5). Par exemple JAK 2 va induire l'activation de facteurs de transcription STAT 1, 3 et 5 qui sont des gènes impliqués dans la prolifération des éosinophiles. Le détail des voies de signalisation induites par l'IL-5 est présenté dans la Figure 5. La présence de taux élevés d'IL-5 dans les biopsies de patients atteints de PNS est associée à une forme plus sévère de PNS et à un asthme associé, alors que les patients avec des taux bas d'IL-5 présentaient une PNS sans asthme associé (Bachert, Zhang et al. 2015, Tomassen, Vandeplass et al. 2016). Le taux d'IL-5 serait également plus élevé au niveau de la muqueuse de patients présentant des formes de PNS récidivante versus des formes non récidivantes (Huriyati, Darwin et al. 2019).



### Rôle de l'IL-9 dans les processus inflammatoires à éosinophiles et dans la PNS

L'IL-9 est aussi une glycoprotéine produite par les lymphocytes Th2, les mastocytes et les PNE (Goswami and Kaplan 2011). En particuliers, la combinaison de l'IL-4 et du TGF- $\beta$  sont capables d'activer la production d'IL-9 par les lymphocytes T (cf. Figure 6). Son récepteur est un hétéro dimère composé d'une chaîne  $\alpha$  (IL-9R $\alpha$ ) et une chaîne  $\gamma$ , commune aux récepteurs de l'IL-2,-4,-7 et -15 (van Leeuwen, Martinson et al. 1989, Renauld, Druetz et al. 1992, Noelle and Nowak 2010).

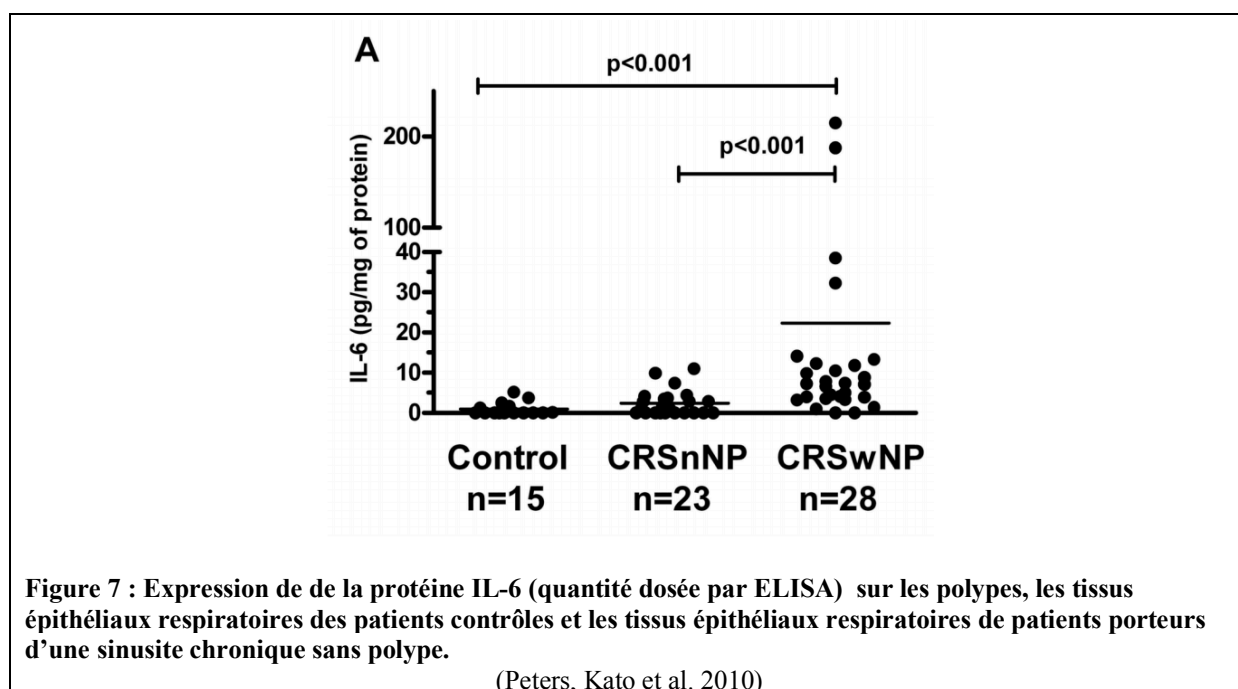


Ce récepteur est exprimé sur différents types cellulaires : mastocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, éosinophiles et même les cellules épithéliales (Renauld, Druetz et al. 1992, Steenwinckel, Louahed et al. 2007). L'activation du récepteur à l'IL-9 utilise aussi la voie JAK/STAT qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la survie cellulaires des PNE (Louahed, Zhou et al. 2001, Adamson, Collins et al. 2009). Un lien a pu être établi dans l'asthme entre l'action de cette cytokine et les phénomènes inflammatoires observés au niveau de la muqueuse bronchique dans un modèle murin avec un afflux de PNE et de lymphocytes (McLane, Haczku et al. 1998). Dans une autre étude utilisant un modèle murin, l'expression transgénique de l'IL-9 au niveau des voies aériennes inférieures entraîne des modifications de l'épithélium nasal avec hyperplasie des cellules épithéliales et métaplasie des cellules à mucus (McLane, Haczku et al. 1998). L'IL-9 serait impliquée dans la production de mucus dans les voies respiratoires. L'évaluation physiologique de souris transgéniques exprimant l'IL-9 a démontré une résistance trans-épithéliale normale des voies aériennes et une hypersensibilité accrue des voies respiratoires à la métacholine inhalée. Ces découvertes confirment fortement le rôle important de l'IL-9 dans la pathogenèse de l'asthme. En physiopathologie humaine, l'expression de l'IL-9 est augmentée dans les poumons des patients asthmatiques et l'expression du récepteur à l'IL-9 (IL-9R) a été rapportée chez les individus asthmatiques mais pas chez les contrôles sains (Bhathena, Comhair et al. 2000, Shimbara, Christodoulou et al. 2000). L'IL-9 participe à l'expression du récepteur à l'IL-5 (Bhathena, Comhair et al. 2000) et agit de manière synergique avec l'IL-5 pour réduire l'apoptose des éosinophiles dans l'asthme (Gounni, Gregory et al. 2000). Beaucoup d'études montrent que les principaux effets de l'IL-9 au niveau pulmonaire seraient également dû aux effets indirects de IL-13 dont l'IL-9 induit l'hyperexpression (Temann, Ray et al. 2002, Steenwinckel, Louahed et al. 2007, Temann, Laouar et al. 2007, Steenwinckel, Louahed et al. 2009). Mortuaire et al. ont montré comment l'IL-9 pourrait être impliquée dans l'homéostasie des éosinophiles dans la PNS : elle serait capable, en présence d'IL-5, d'induire l'expression de l'IL-5R $\alpha$  et de potentialiser l'action anti-apoptotique de l'IL-5 chez les asthmatiques (Mortuaire, Gengler et al. 2015). L'action conjointe de l'IL-5 et de l'IL-9

viendrait contrebalancer la diminution relative d'expression de l'IL-5R $\alpha$  chez ces patients au sein du polype (Mortuaire, Gengler et al. 2015).

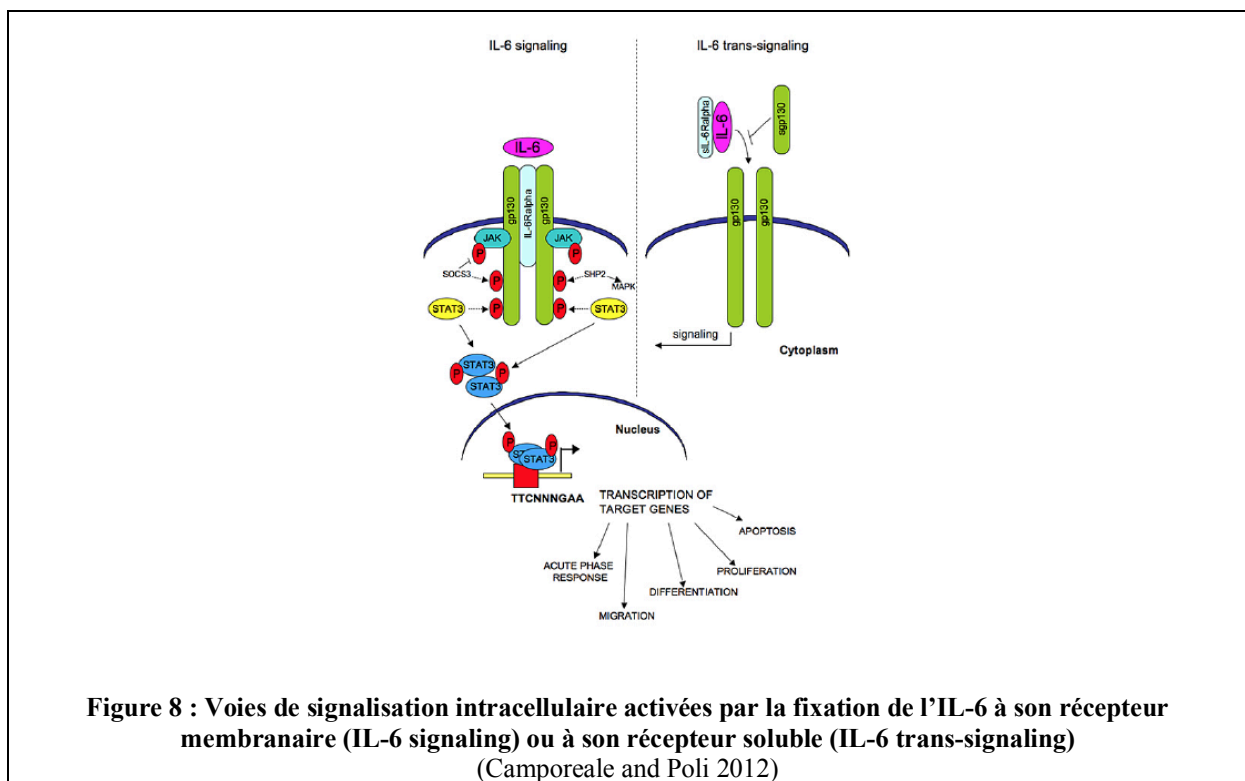
### Rôle de l'IL-6 dans les processus inflammatoires à éosinophiles et dans la PNS

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire pleïotrope. L'IL-6 participerait à la réponse inflammatoire dans la PNS avec activation des lymphocytes T, induction de la sécrétion d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Une augmentation de l'expression de l'IL-6 au niveau des polypes par rapport aux tissus sains a déjà été rapportée dans la littérature pour la première fois en 1996 puis 10 ans plus tard (Davidsson, Danielsen et al. 1996, Danielsen, Tynning et al. 2006, Peters, Kato et al. 2010) (cf. Figure 7).



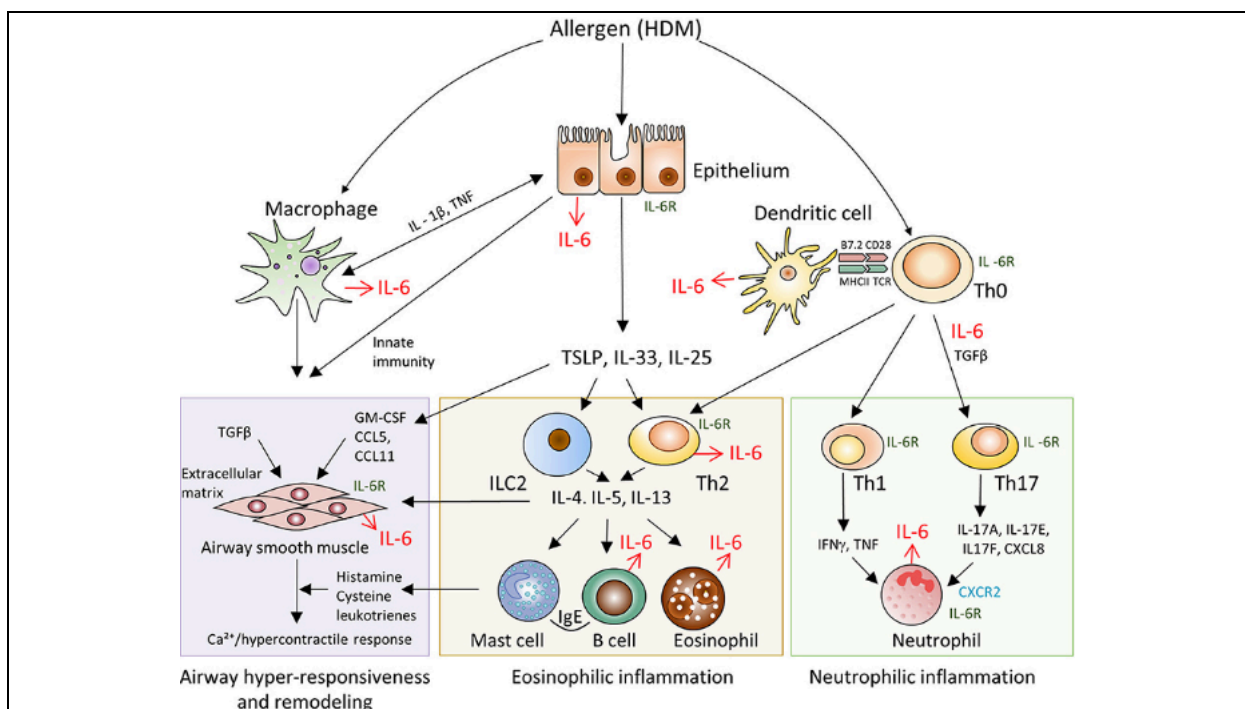
L'IL-6 est une cytokine qui a plusieurs fonctions connues : la régulation hématopoïétique, la régénération tissulaire, l'induction d'une inflammation chronique, le maintien d'une auto-immunité et la tumorigénèse (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018) mais dont le rôle dans la PNS a été très peu étudié. C'est une interleukine produite par différents types cellulaires : lymphocytes T et B, monocytes, macrophages, fibroblastes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules mésenchymateuses et adipocytes (Danielsen, Tynning et al. 2006) en réponse à des micro-organismes et à d'autres cytokines, notamment IL-1 et TNF $\alpha$ . Les cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et IL-8 ont déjà été décrites comme jouant un rôle dominant dans la sinusite aiguë (Bachert and Van Cauwenberge 1997). Dans la physiopathologie de la PNS, ce seraient plutôt les fibroblastes qui synthétiseraient l'IL-6 pour moduler l'activation des réponses immunitaires (formation de

plasmocytes) et la synthèse du stroma. Elle exercerait son action grâce à une liaison à deux molécules: IL6-R (aussi connu sous le nom de IL-6R $\alpha$ ) et gp130 (aussi connu sous le nom de IL-6R $\beta$ ) (Mihara, Hashizume et al. 2012). L' IL6-R a un domaine intra-cytoplasmique court impliqué dans le phénomène de trafficking à la membrane du gp130 (Mihara, Hashizume et al. 2012), le domaine intra cytoplasmique du gp130 contient quant à lui des motifs pouvant activer les voies JAK et STAT induisant par exemple la production de métalloprotéases de la matrice ou l'activation de NF $\kappa$ B (qui peut bloquer l'apoptose cellulaire). Une deuxième partie peut également activer la voie de signalisation ERK1/2 (kinase régulée par un signal extracellulaire) pouvant induire la production de métalloprotéases et la prolifération de cellules tumorales (Mihara, Hashizume et al. 2012) (cf. Figure 8).



De manière très intéressante, l'IL-6 peut également s'associer à son récepteur soluble (sIL-6R) (Cf. Figure 8). Le complexe d'IL-6 et de sIL-6R peut ainsi activer des cellules cibles qui n'expriment pas l'IL-6R liée à la membrane. De telles cellules en l'absence d'IL-6R ne seraient pas en mesure de répondre à l'IL-6. Ce processus a été nommé “ trans-signaling ” (Rose-John and Heinrich 1994). Puisque toutes les cellules humaines expriment la gp130 à la surface des cellules, le complexe IL-6/sIL-6R peut activer toutes les cellules de l'organisme. Dans d'autres maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie intestinale inflammatoire, la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme ainsi que dans le cancer du côlon, ce trans-signaling de l'IL-6 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'état pathologique. Une étude publiée très récemment (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018) a utilisé le ciblage génique conditionnel pour démontrer que les macrophages et les cellules dendritiques sont les sources critiques d'IL-6

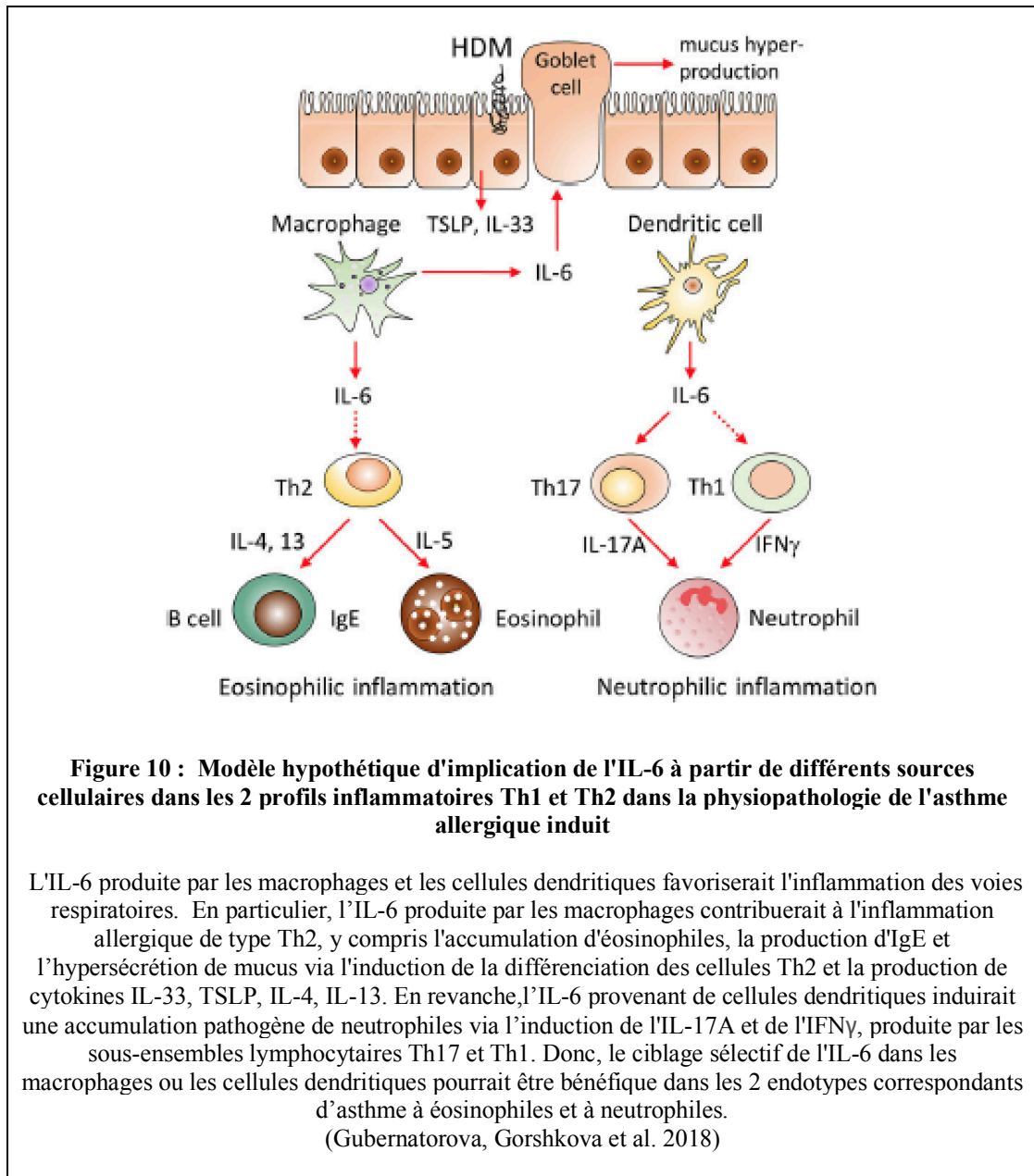
pathogènes dans l'asthme aigu dans un modèle murin d'asthme allergique (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018). L'inactivation génique complète de l'IL-6 a amélioré la maladie avec une diminution significative de l'hyperéosinophilie dans les poumons. L'inactivation ciblée d'IL-6 dans les macrophages a réduit les indicateurs clés de l'inflammation allergique de type 2, notamment l'accumulation de cellules éosinophiles et cellules Th2 dans les poumons, la production d'IgE et l'expression de médiateurs inflammatoires associés à l'asthme. En revanche, les souris présentant un déficit localisé en IL-6 dans les cellules dendritiques ont présenté une réponse neutrophilique atténuée mais une réponse éosinophilique inchangée (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018). Cette étude suggère le rôle distinct de l'IL-6 en fonction de sa production par les macrophages ou les cellules dendritiques. L'IL-6 produite par les macrophages participerait à la réponse inflammatoire allergique de type Th2 éosinophilique tandis que l'IL-6 produit par les cellules dendritiques aurait un rôle important dans l'induction de la réponse inflammatoire de type neutrophilique (cf. Figure 9 et 10). Ces résultats sont en faveur d'un rôle actif de l'IL-6 dans le processus inflammatoire et surtout son implication dans les 2 voies de signalisation inflammatoires à prédominance éosinophilique et neutrophilique et également sa participation au remodelage tissulaire et à l'hyperactivité bronchique (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018) (cf. Figure 9 et 10).



**Figure 9 : Représentation schématique des voies et des types de cellules induits par l'IL-6 impliqués dans la pathogenèse de l'asthme allergique**

La physiopathologie de l'asthme est fondée sur plusieurs processus et cascades moléculaires interdépendantes. Une inflammation des voies respiratoires à éosinophiles (réponse avec un profil inflammatoire Th2) (panneau central) est présente chez plus de 50% des adultes avec de l'asthme après sensibilisation à un allergène. L'asthme à éosinophiles est caractérisé par l'activation des cellules Th2, la production d'IL-4, IL-5, IL-13, des taux élevés d'IgE et une éosinophilie forte. L'asthme à faible potentiel éosinophilique, à prédominance de neutrophiles (panneau de droite), est moins fréquent, mais présente souvent une maladie plus grave.

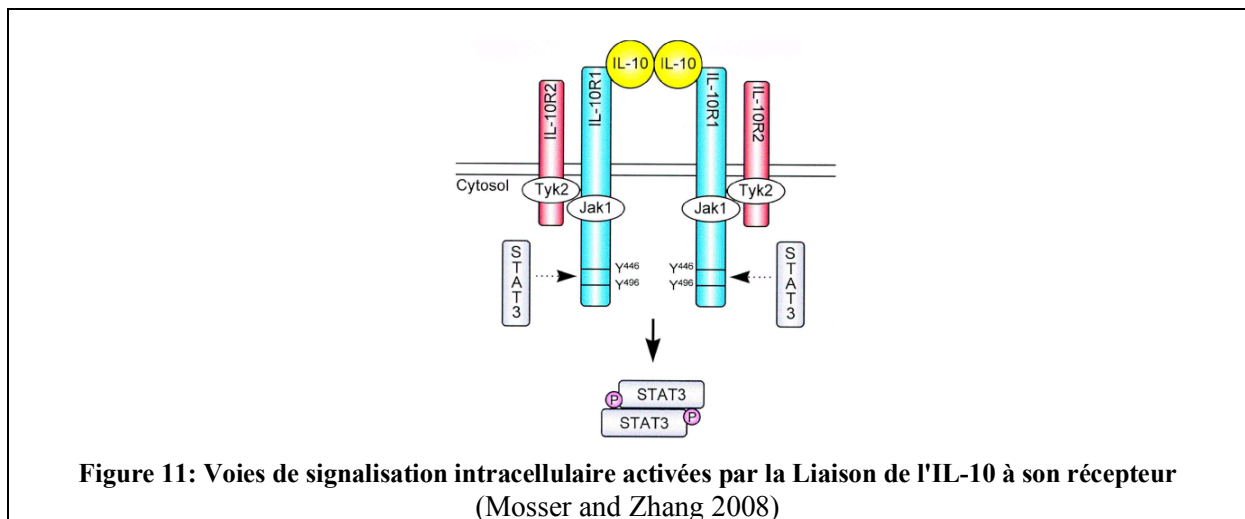
(Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018)



### Rôle de l'IL-10 dans les processus inflammatoires et dans la PNS

**L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire** qui a été caractérisée pour la première fois à la fin des années 80 mais dont l'expression augmentée dans la PNS a été mise en évidence en 2016. L'IL-10 peut être produite par plusieurs types cellulaires: les lymphocytes Th1 mais aussi Th2, les lymphocytes T régulateurs (Nizar, Copier et al. 2009) mais aussi les monocytes, macrophages, les cellules dendritiques, certains lymphocytes B et les cellules épithéliales notamment (Mosser and Zhang 2008). Sa principale fonction biologique s'applique sur les cellules dendritiques et les macrophages en inhibant la présentation d'antigènes. L'autre principal effet est d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes Th1, tels que les IL-1, -6 et -12 le TNF- $\alpha$ . Enfin, l'IL-10 diminue

la synthèse et la sécrétion macrophagique de métalloprotéinases et inhibe l'effet de l'IL-1 par relargage d'antagonistes de son récepteur (Akdis and Blaser 2001, Mosser and Zhang 2008). Le récepteur à l'IL-10 se compose de deux sous unités: l'IL-10R1 et l'IL-10R2. L'IL-10R1 reconnaît l'IL-10 avec une forte affinité contrairement à l'IL-10R2. Mais c'est seulement en s'hétérodimérisant que le récepteur active les voies de signalisation intra cellulaire principale qui est la voie JAK/STAT3 (cf. Figure 11) (Schottelius, Mayo et al. 1999). Néanmoins la réponse à l'IL-10 est dose dépendante et il peut exister une surproduction de cytokines pro-inflammatoire au-delà d'un certain seuil d'IL-10 (Lauw, Pajkrt et al. 2000). Certains pathogènes comme le *staphylococcus aureus* peuvent également, par l'intermédiaire de toxines, induire une surproduction d'IL-10 et donc créer un environnement anti-inflammatoire permettant sa propre survie (Xu, Han et al. 2016). L'IL-10 aurait donc un rôle ambivalent à la fois protecteur ou pro-inflammatoire.



### 2.2.3 Rôle de la sensibilisation IgE-dépendante dans le processus inflammatoire à éosinophiles dans la PNS

Dans la rhinite et l'asthme de type allergique, la sensibilisation IgE-dépendante à des allergènes environnementaux induit une inflammation de type éosinophilique au sein de l'épithélium et la muqueuse respiratoire. La réponse immunitaire IgE dépendante est également impliquée dans la physiopathologie de la PNS mais cependant les mécanismes induisant la synthèse d'IgEs diffèrent de la rhinite ou de l'asthme allergiques. La synthèse d'IgEs pourrait être favorisée par l'entérotoxine du *Staphylococcus aureus* (SAE) qui colonise, comme nous l'avons évoqué précédemment, souvent les cavités nasales des patients atteints de PNS (Bachert, Gevaert et al. 2001). Cette entérotoxine se comporte comme un superantigène entraînant l'activation polyclonale des lymphocytes T et B qui vont induire une synthèse de cytokines de type 2 et d'IgEs (Van Zele, Gevaert et al. 2007, Bachert, Zhang et al. 2010). Bien que l'on ne connaît pas le mécanisme étiopathogénique de la synthèse des IgE, il a été démontré que les IgEs induites par les pollens de graminées ou par les SAE peuvent efficacement

servir de médiateur à l'activation des éosinophiles. Les IgEs semblent donc fonctionner comme un amplificateur de la réaction inflammatoire éosinophilique dans la PNS (Bachert, Gevaert et al. 2001).

### **2.2.4 Contribution des polynucléaires à éosinophiles à la formation des polypes**

Une fois prouvée l'importance de l'accumulation éosinophilique et l'identification des facteurs inflammatoires responsables, il a fallu attendre le début des années 2000 pour voir apparaître les premières hypothèses concernant la contribution des éosinophiles à la formation et la croissance des polypes (Bachert, Gevaert et al. 2000). Sur le site inflammatoire local au sein des polypes, les éosinophiles vont également adhérer à l'épithélium via ICAM-1 (Nakagome and Nagata 2018). Papon et al. ont montré l'expression cellulaire d'ICAM-1 in situ dans les polypes et in vitro dans les cultures de CENH (Papon, Coste et al. 2002). Les polynucléaires éosinophiles joueraient un rôle dans le phénomène de fibrose observé dans la PNS via la sécrétion importante du TGF- $\beta$ 1 par les éosinophiles. Coste et al. ont montré la surexpression du TGF- $\beta$ 1 au sein des polypes nasaux (Coste, Lefaucheur et al. 1998). Or le TGF- $\beta$  est une autre cytokine importante qui peut induire la prolifération des fibroblastes (Watelet, Claeys et al. 2004). L'augmentation de son expression serait responsable du phénomène accru de fibrose (Boxall, Holgate et al. 2006). Les éosinophiles, producteur de TGF- $\beta$ 1, pourraient ainsi favoriser leur propre migration dans le tissu en régulant la fonction des fibroblastes (Redington 2000, Balzar, Chu et al. 2005). Le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui joue un rôle important dans l'angiogenèse et l'œdème, est également augmenté dans les polypes nasaux et son expression est augmentée par le TGF- $\beta$ 1 (Coste, Brugel et al. 2000). Ainsi les éosinophiles participeraient via le TGF- $\beta$ 1 et le VEGF à la formation de l'œdème et de la fibrose observés dans la PNS (Nakagome and Nagata 2018).

Une fois recrutés et activés, les éosinophiles participent au développement et à l'entretien de la réaction inflammatoire au cours de la PNS en libérant par dégranulation des médiateurs toxiques : MBP (Major Basic Protein), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), l'EDN (Eosinophil-Derived neurotoxin) et l'EPO (Eosinophil PerOxydase). Celles-ci entraînent des lésions de l'épithélium nasal et de la matrice extracellulaire à l'origine du remodelage tissulaire (Nakagome and Nagata 2018).

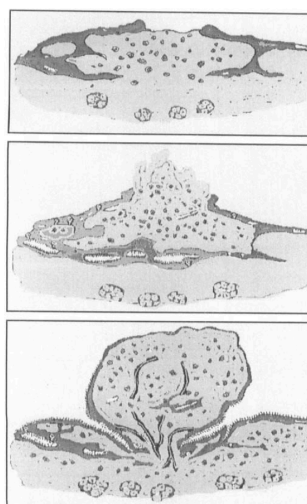
Les éosinophiles libèrent également dans les polypes le CCL23 (CC chemokine ligand 23) qui permet le recrutement des macrophages (Matsumoto, Fukuda et al. 2011).

Par ailleurs, l'analyse protéomique différentielle entre épithélium de polypes et épithélium sain permet de faire émerger le rôle probablement important d'autres protéines. La cystatin SN (CST1) est ainsi surexprimée par les cellules épithéliales de polypes et permettrait le recrutement et l'activation des éosinophiles par le biais de l'IL-5 (Magister and Kos 2013, Yan, Lou et al. 2019). Ainsi la cellule épithéliale elle-même participerait à l'activation des éosinophiles. Cet exemple illustre l'interaction existante entre les cellules épithéliales et les cellules immunitaires.

**Leur présence en grande quantité au cours de la polypose naso-sinusienne, leur capacité à auto-entretenir leur migration et activité par l'intermédiaire notamment du TGF- $\beta$  et de l'IL-5 font des polynucléaires éosinophiles, un pivot dans la réponse inflammatoire tissulaire chronique auto-entretenu observée dans la PNS. La cellule épithéliale elle-même participerait à leur recrutement et à leur activation. Les éosinophiles participeraient au dommage de l'épithélium nasal et au remodelage tissulaire.**

## 2.3. La Polypose naso-sinusienne: modèle de dysrégulation épithéliale

Dans les modèles expérimentaux animaux cherchant à reproduire la genèse des polypes, l'un développé au niveau de l'oreille moyenne de rat (Larsen, Tos et al. 1992, Caye-Thomasen, Hermansson et al. 1995), l'autre dans le sinus maxillaire de lapin (Norlander, Westrin et al. 1996), la rupture de l'épithélium de surface semble être une première étape primordiale (Caye-Thomasen, Hermansson et al. 1995) (Norlander, Westrin et al. 1996). Les auteurs réalisaient une effraction épithéliale mécanique de l'épithélium, puis créaient une réaction inflammatoire par inoculation bactérienne (modèle de rat et lapin). D'après la description historique de Norlander et al (Norlander, Westrin et al. 1996), une fois la rupture initiale de la barrière épithéliale et de la membrane basale réalisée, le tissu conjonctif contenant des fibroblastes, cellules inflammatoires et néovaisseaux s'infiltrerait à travers cette rupture. L'épithélium se reconstituerait ensuite en progressant à partir des berges du défaut : en tapissant d'une part la hernie conjonctivale, d'autre part en s'enfonçant dans la lamina propria et en creusant des microcavités. Ces microcavités s'agrandiraient parallèlement à la différenciation ciliée et sécrétoire des cellules épithéliales (Norlander, Westrin et al. 1996). La fusion des vacuoles aboutirait à un clivage épithélial et à une autonomisation d'un polype (cf. Figure 12). Des polypes de structure proche de celle rencontrée en pathologie humaine, avec oedème et infiltration massive par des cellules de l'inflammation, ont été obtenus dans ces modèles.



**Figure 12 : Illustration schématique de la séquence de formation de polypes d'après (Norlander, Westrin et al. 1996)**

**Image du haut :** Sur le site d'une rupture épithéliale microscopique, l'épithélium en régénération se ramifie et envahit la lamina propria. Les microcavités commencent à se développer.

**Image du centre :** La hernie conjonctivale fait saillie à travers le défaut épithélial. Les microcavités augmentent de taille et développent un épithélium cilié à partir des berges.

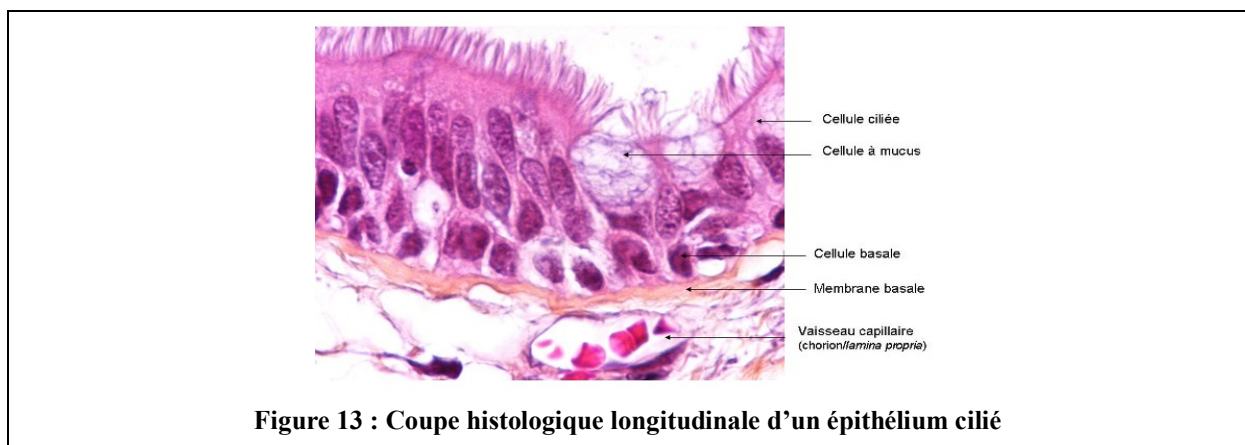
**Image du bas :** Réépithélialisation de la hernie. Les microcavités se rompent, créant une communication avec la lumière des sinus. On obtient un plan de clivage permettant de séparer le polype en développement, de la muqueuse environnante.

Les cellules épithéliales vont donc jouer un rôle primordial dans la formation des polypes à partir des mécanismes de réparation cellulaire : migration, prolifération et différenciation. Par ailleurs constamment associés à l'inflammation chronique, de fréquents changements morphologiques épithéliaux (métaplasie squameuse, hyperplasie sécrétoire) suggèrent une dérégulation de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales dans la PNS. Nous allons voir dans cette partie, quels sont les processus physiologiques qui permettent de maintenir la cohésion à la barrière épithéliale et de la réparer en cas de blessure et nous verrons comment ces mécanismes sont dysrégulés dans la PNS.

### 2.3.1 La Polypose Naso-sinusienne, modèle de dysfonction de la barrière épithéliale?

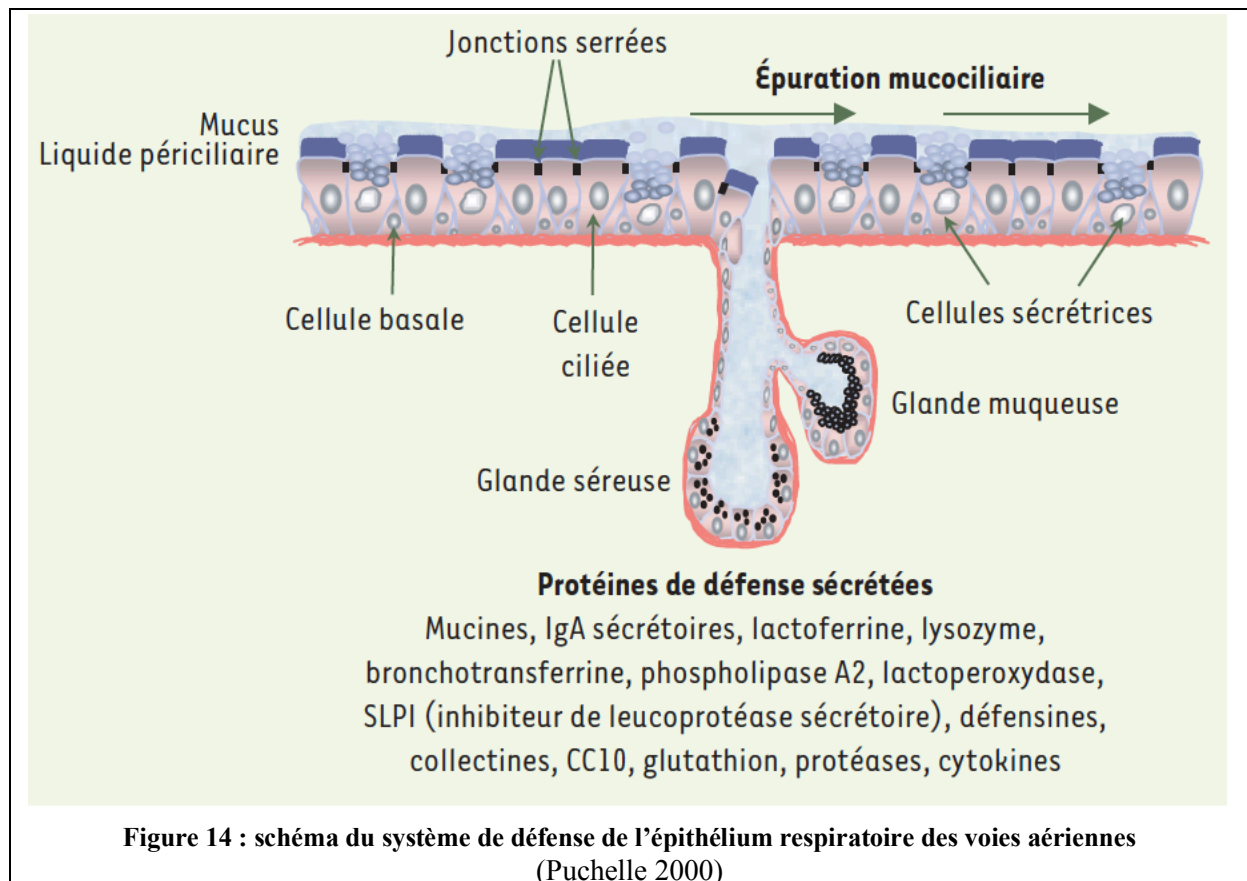
#### Système de défense de l'épithélium respiratoire des voies aériennes

L'épithélium respiratoire des voies aériennes de conduction est un épithélium de type respiratoire pseudo-stratifié prismatique et cilié, séparé du chorion sous-jacent par une membrane basale (cf. Figure 4). L'épithélium constitue la première ligne de défense des voies aériennes (Nadel 2000). Les cellules de cet épithélium sont polarisées avec une face apicale en contact avec l'air et une face basolatérale mettant les cellules en contact entre elles et avec la membrane basale. L'épithélium est constitué de 4 types cellulaires, dont la composition va varier en fonction de la localisation le long des voies aériennes : les cellules ciliées, cylindriques hautement différenciées qui comportent à leur surface 200 cils, les cellules caliciformes ou cellules à mucus qui vont sécréter le mucus, les cellules basales qui assurent le renouvellement de l'épithélium et l'ancrage à la membrane basale et les cellules intermédiaires peu différenciées qui sont les moins nombreuses. A la surface de l'épithélium, les cellules ciliées battent dans le liquide de surface dit « périciliaire » et le mucus produits par les cellules sécrétrices de surface et les glandes sous-muqueuses (Herard, Zahm et al. 1996) (Puchelle 2000) (cf. Figure 13).



## Introduction

Ce mucus et tous les aérocontaminants et pathogènes qui y sont piégés sont évacués des voies aériennes grâce au battement actif des cils (épuration mucociliaire). Le mucus contient en outre de nombreuses molécules de défense produites et sécrétées par les cellules de l'épithélium de surface et par les cellules glandulaires séreuses. Ces molécules protectrices possèdent des activités antimicrobiennes : IgA sécrétoires, lactoferrine, lysozyme, bronchotransferrine, phospholipase A2, lactoperoxydase, inhibiteur de leucoprotéase sécrétoire (SLPI) et défensines (Bals, Weiner et al. 1999) (Puchelle 2000) (cf. Figure 14).



La seconde ligne de défense des voies aériennes est assurée par les complexes jonctionnels, notamment les jonctions serrées qui assurent l'imperméabilité de l'épithélium vis-à-vis des agents extérieurs (Coraux, Hajj et al. 2005). Les jonctions serrées forment un réseau autour du pôle apico-latéral des cellules épithéliales, rendant ainsi l'épithélium imperméable aux agents extérieurs. Ces complexes sont principalement constitués de protéines telles que les ZO (zonula occludens 1 et 2), les claudines et l'occludine, qui interagissent avec le cytosquelette d'actine des cellules. Les jonctions serrées permettent également la polarisation de l'épithélium et régulent la perméabilité transépithéliale en sélectionnant le passage de molécules par la voie paracellulaire (Marzesco, Dunia et al. 2002).

### Altération de la barrière épithéliale dans la PNS

Dans la PNS, il a été récemment montré que la barrière épithéliale serait altérée, entraînant une augmentation de la perméabilité, une diminution de la résistance épithéliale, une acanthose et une acantholyse (Stevens, Schleimer et al. 2016), c'est à dire d'une part, un épaissement de la couche basale et d'autre part, des zones de dislocation des cellules, due à une perte d'adhérence entre elles. Une étude récente (Soyka, Wawrzyniak et al. 2012), mettait en évidence une **diminution de l'expression des ARN messagers (ARNm) et des protéines des jonctions serrées** dans l'épithélium de polypes en comparaison à des biopsies de muqueuse saine chez des sujets contrôles. Les analyses immunohistochimiques montraient une répartition irrégulière et discontinue des principales molécules (occludine et zonula occludens-1) impliquées dans les jonctions serrées. Il en résulterait une modification des propriétés électrophysiologiques avec une diminution des résistances transépithéliales au sein des polypes correspondant à une augmentation de la perméabilité épithéliale (Soyka, Wawrzyniak et al. 2012). La raison pour laquelle la barrière épithéliale serait altérée reste à ce jour mal connue. Une première hypothèse serait que les cellules épithéliales sont intrinsèquement anormales dans la PNS. Dans l'étude de Soyka, les anomalies des jonctions serrées étaient observées dans les biopsies de polypes mais également dans des cultures de CENH obtenues à partir de polypes et ce après plusieurs semaines donc en l'absence de persistance des stimuli inflammatoires. Cette observation conforte l'hypothèse d'un facteur intrinsèque à la dégradation des jonctions serrées ou un effet « mémoire » de l'environnement inflammatoire initial (Soyka, Wawrzyniak et al. 2012). Cette hypothèse reste cependant non démontrée puisque dans ces cultures de CENH de polypes, et contrairement à l'observation faite dans les tissus de polypes, seules les protéines des jonctions serrées étaient diminuées sans altération de la quantité des ARNm.

Une autre explication pourrait être que la dégradation des jonctions serrées observée serait induite par les facteurs de virulence bactériens ce qui pourrait rendre le pôle baso-latéral des cellules accessible aux agents pathogènes (Coraux, Kileztky et al. 2004). Récemment, Altunbulaki et al. (Altunbulakli, Costa et al. 2018) ont rapporté que le *Staphylococcus aureus* pourrait renforcer la fonction de barrière épithéliale lorsque l'épithélium était sain et au contraire favoriser son dysfonctionnement chez les patients porteurs de PNS. Une autre hypothèse serait que les facteurs inflammatoires propres à la PNS pourraient altérer la barrière épithéliale. Pothoven et al. ont ainsi rapporté que l'expression de l'oncostatine M, (un membre de la famille de IL-6 car partage le même récepteur transmembranaire gp130) associée aux maladies inflammatoires à éosinophiles, était élevée dans les polypes et pouvait induire une perméabilité épithéliale, détruire les jonctions serrées et diminuer la résistance électrique dans des cellules épithéliales respiratoires humaines en culture (Pothoven, Norton et al. 2015). Soyka et al. ont montré, de manière similaire, que l'interféron gamma (IFN-  $\gamma$ ) et l'IL-4 diminuaient *in vitro* la résistance épithéliale au sein de cultures de CENH issues de polypes ou de muqueuse saine (Soyka, Wawrzyniak et al. 2012). De même, Jio et al. ont rapporté le même effet *in vitro* du TGF- $\beta$  qui attaquerait

l'intégrité des jonctions serrées avec une cartographie discontinue intercellulaire en particulier du ZO-1 (Jiao, Wang et al. 2018). Les **desmosomes** (en particulier DSG2 et DSG3) (qui correspondent aux régions où la membrane plasmique d'une cellule adhère à une cellule adjacente ou à la lame basale sous-jacente) auraient une expression protéique également diminuée dans les polypes versus les biopsies de muqueuse saine (Zuckerman, Lee et al. 2008). Le TNF- $\alpha$  et l'IL-13 induiraient *in vitro* une diminution d'expression protéique de DSG2 (Zuckerman, Lee et al. 2008).

L'altération de la barrière épithéliale par les cytokines pro-inflammatoires Th1/Th2 pourrait donc jouer un rôle dans la pathogénie des polypes. L'interruption de la barrière épithéliale permettrait à la fois une diffusion plus importante et profonde des irritants inhalés qui activeraient plus facilement les cellules immunitaires dans l'espace sous-épithélial. Ainsi, cette altération de la barrière épithéliale pourrait jouer un rôle majeur dans la physiopathologie de la PNS (Jiao, Wang et al. 2018).

**La rupture de l'épithélium de surface serait une étape primordiale dans la genèse des polypes. De plus, la barrière épithéliale serait altérée chez les patients atteints de PNS. Ces altérations pourraient faciliter les interactions entre agents extérieurs et cellules immunitaires et inflammatoires de la muqueuse nasale, notamment avec les entérotoxines du *Staphylococcus aureus*.**

### **2.3.2 La Polypose Naso-sinusienne, modèle de dysrégulation de la réparation épithéliale ?**

Comme nous venons de le voir, le phénomène initial dans la formation des polypes pourrait être une rupture de la continuité de l'épithélium et de la membrane basale. Cependant, la restauration de l'intégrité de la barrière épithéliale après une blessure est également un élément clé dans les capacités de défense de l'épithélium respiratoire. Ce mécanisme de réparation pourrait être altéré dans la polypose.

#### **Mécanismes physiologiques de réponse et de réparation de l'épithélium à une agression extérieure**

Afin d'étudier la réponse physiologique à une blessure épithéliale respiratoire, une étude (Herard, Zahm et al. 1996) a reproduit *in vitro* l'effet d'une agression extérieure chimique (à l'hydroxyde de sodium) sur des cultures de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) issues de polypes. Dans ce modèle expérimental, l'intégrité épithéliale était atteinte immédiatement après la blessure (diminution d'environ 40% de la résistance transépithéliale (TER) et une augmentation de 75% de la perméabilité au mannitol). De plus, le nitrate de lanthane pénétrait dans les espaces intercellulaires des zones en réparation, ce qui se caractérisait également par l'absence d'immunolocalisation de Zonula occludens 1 (ZO-1) par opposition aux cellules non blessées. Dans les conditions physiologiques l'intégrité épithéliale était

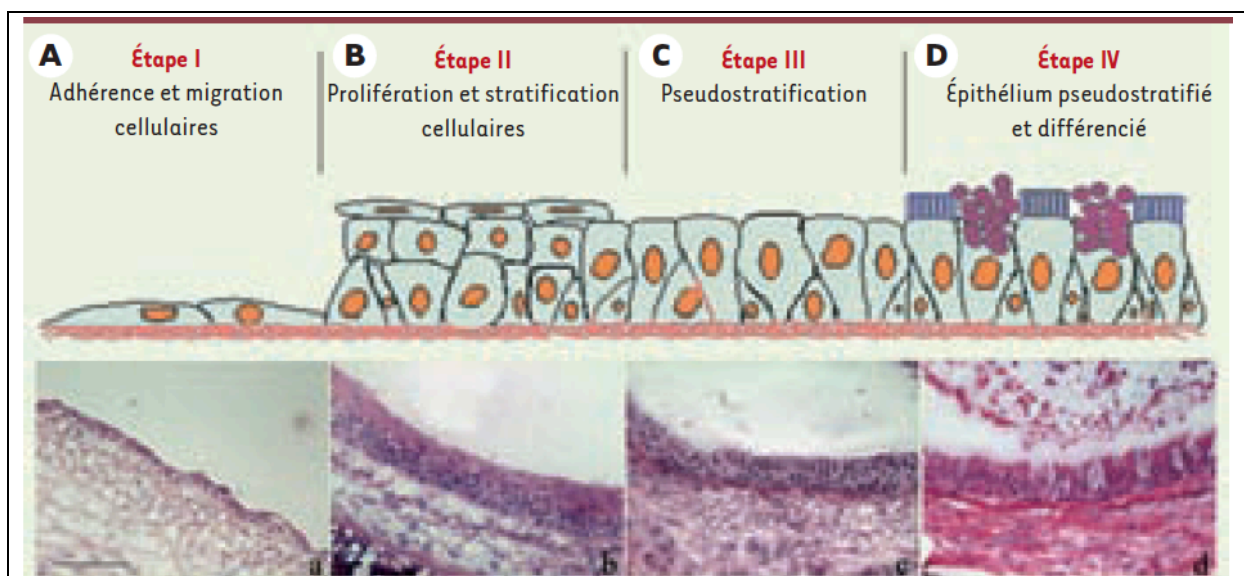
complètement rétablie dans les un à deux jours suivant la fermeture de la blessure (Herard, Zahm et al. 1996). La perte d'intégrité épithéliale rend l'épithélium plus sensible aux agressions environnementales qui pourraient empêcher la restauration de la barrière épithéliale (Herard, Zahm et al. 1996). Quelle que soit la source lésionnelle, la réponse de l'épithélium comprend une succession d'événements allant de la perte de l'imperméabilité de la surface épithéliale et la desquamation partielle des cellules de l'épithélium, avec quelques îlots de cellules basales encore présents, à la dénudation totale de la lame basale. Des phénomènes de remodelage sont également observés : les cellules ciliées peuvent se transformer en cellules sécrétrices et les cellules sécrétrices en cellules malpighiennes, ce phénomène étant parfaitement représentatif de la plasticité de l'épithélium de surface des voies aériennes (Coraux, Hajj et al. 2005).

De manière synthétique, les étapes clés du mécanisme physiologique de réparation épithéliale sont les suivantes : **après une lésion chimique ou mécanique du tapis cellulaire, les cellules entament la réparation de la lésion par une série d'événements incluant, dans un premier temps, l'étalement et la migration sur la matrice extracellulaire dénudée des cellules bordant la zone lésée. Une prolifération cellulaire est ensuite observée, avec un pic d'activité mitotique qui culmine généralement 48 heures après la lésion et concerne les cellules dans la zone de réparation. Bien que la zone lésée soit réépithélialisée, l'établissement de la jonctionnalité et de l'étanchéité épithéliale n'est restaurée qu'après plusieurs jours** (Puchelle 2000) (Cf. Figure 15).

Au cours de la phase initiale d'étalement et de migration cellulaire, interviennent de façon majeure les composants de la matrice extracellulaire et les récepteurs de type intégrines, les protéines vésiculaires telles que la cellubrèvine, ainsi que les métalloprotéinases matricielles (MMP). Les composants de la MEC jouent un rôle clé dans la réépithélialisation de l'épithélium respiratoire. Au cours de la migration, les cellules épithéliales adhèrent de façon transitoire à une matrice provisoire qui va subir des modifications dynamiques. La fibronectine et les principaux composants de la membrane basale, comme la laminine et le collagène de type IV, vont alors être utilisés comme support matriciel par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires tels que les intégrines, situées au pôle basal des cellules épithéliales. La polymérisation active de la fibronectine, déposée à l'interface matrice/cellule au cours de la réparation, favorise la migration cellulaire. Au cours de la réépithélialisation de l'épithélium respiratoire lésé, il a été montré que la MMP-9 (gélatinase B) est surexprimée et s'accumule dans les cellules migratoires. Les MMPs pourraient également faciliter le relargage de facteurs de croissance comme le VEGF, le TGF- $\beta$  ou le bFGF (basic fibroblast growth factor), accumulés au niveau des protéoglycanes, ou intervenir en clivant des récepteurs de facteurs de croissance (Coraux, Hajj et al. 2005). L'incubation des cellules épithéliales avec des inhibiteurs de ces MMP au cours de la régénération entraîne des remaniements de l'épithélium qui se traduisent par un défaut de différenciation mucociliaire dans un épithélium présentant une métaplasie malpighienne avec des zones de métaplasie des cellules basales. L'activation du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) par différents ligands joue également un rôle majeur : en effet, l'EGF (epidermal growth factor) accélère la réparation

des lésions épithéliales en modulant la migration cellulaire. Il a été montré qu'un inhibiteur de la voie EGFR tyrosine kinase entraînant un blocage de la réépithélialisation (Coraux, Hajj et al. 2005). De plus, dans un modèle *in vivo* d'agression épithéliale par un irritant inhalé de la trachée de moutons, Barrow et al. (Barrow, Wang et al. 1993) ont suggéré que l'EGF et le PDGF (platelet-derived growth factor) favorisent la régénération de l'épithélium respiratoire en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales respiratoires (Barrow, Wang et al. 1993).

L'augmentation de l'expression de ces facteurs de croissance par les cellules épithéliales respiratoires lésées faciliterait la réépithélialisation par un mécanisme de réparation autocrine. Le rôle spécifique des facteurs de croissance dans la différenciation des cellules épithéliales respiratoires et la régénération complète de l'épithélium des voies aériennes est cependant encore mal connu.



**Figure 15 : Etapes de la régénération de l'épithélium respiratoire des voies aériennes dans le modèle de xénogreffe humanisée dans la souris nude**

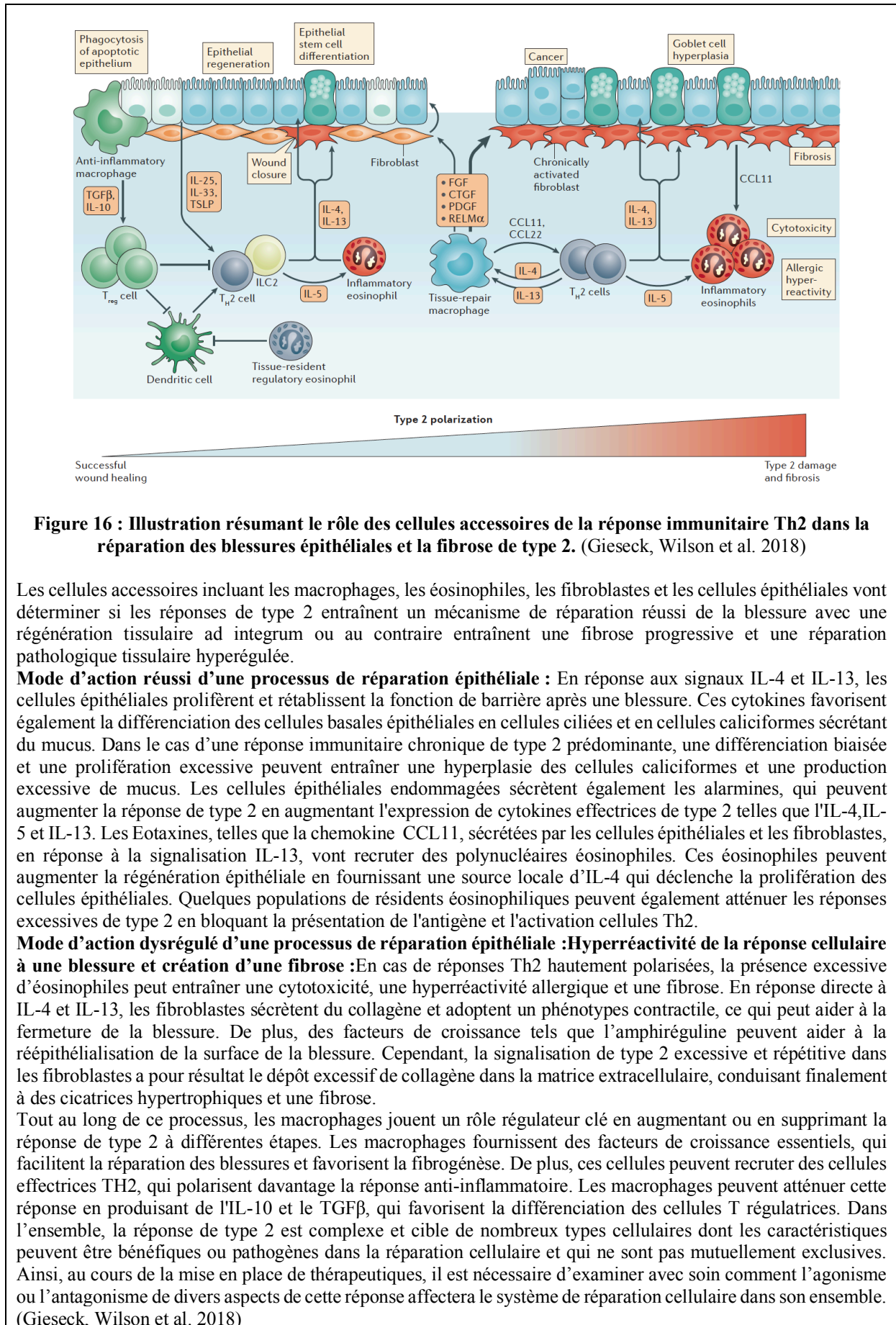
Ce modèle permet de mimer la cinétique des événements aboutissant à la régénération complète de l'épithélium respiratoire. L'étape I (A) est caractérisée par une adhérence et une migration cellulaires : l'épithélium en cours de régénération est constitué d'une monocouche de cellules indifférenciées aplaties. L'étape II (B) est caractérisée par une prolifération cellulaire importante : les cellules forment un épithélium pluristratifié recouvert d'une couche de cellules malpighiennes. Au cours de l'étape III (C), l'épithélium se pseudostratifie progressivement. L'étape IV (D) est caractérisée par une pseudostratification et une différenciation mucociliaire complète de l'épithélium : à ce stade, l'épithélium régénéré est parfaitement similaire à un épithélium recouvrant les voies aériennes humaines. Les sections de xénogreffes ont été colorées à l'hématoxyline et l'éosine. Barre : 75  $\mu$ m.

D'après (Puchelle 2000) et (Coraux, Hajj et al. 2005)

### **Dysrégulation de la réparation épithéliale dans la PNS et influence des cytokines**

**Les polypes sont des « excroissances » oedémato-fibro-épithéliales associées à un infiltrat cellulaire inflammatoire riche en polynucléaires éosinophiles et à des perturbations de la différenciation épithéliale.** Au sein des polypes, le nombre de cellules ciliées est en général diminué au profit d'une hyperplasie caliciforme (Norlander, Westrin et al. 1996) (Chapelin, Coste et al. 1996). On rencontre aussi des zones de métaplasie malpighienne ou d'hyperplasie basale (Kakoi and Hiraide 1987). Dans notre équipe, Coste et al. avaient montré une prolifération cellulaire accrue au sein de l'épithélium des polypes nasaux versus l'épithélium d'une muqueuse témoin (Coste, Rateau et al. 1996, Coste, Rateau et al. 1996). Des médiateurs pro-inflammatoires incluant IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ . pourraient être responsable d'une métaplasie de l'épithélium et d'une réparation épithéliale dysrégulée (Jeffery 1991). Le TGF- $\beta$ 1 surexprimé dans les polypes (Coste, Lefaucheur et al. 1998), accélérât la vitesse de fermeture des blessures dans un modèle de blessure mécanique réalisé sur des cultures primaires de cellules épithéliales nasales en augmentant la vitesse de migration des cellules (Lechapt-Zalcman, Pruliere-Escabasse et al. 2006). Enfin, après fermeture de la blessure le TGF- $\beta$ 1 diminuait la quantité de mucus produit et la différenciation des cellules épithéliales (Holgate 2000, Lazard, Moore et al. 2009). Le TGF- $\beta$ 1 pourrait être responsable d'un remodelage de l'épithélium respiratoire et pro-fibrosant (Ohno, Lea et al. 1992, Boxall, Holgate et al. 2006). L'IL-8 et l'IL-13 surexprimées dans la PNS participent également au remodelage en favorisant la production de mucus et l'hyperplasie des glandes sous muqueuses (Kano, Tanabe et al. 2011). L'IL-13, cytokine majeure mise en cause dans l'asthme serait également une cytokine pro-fibrosante indépendamment du TGF-  $\beta$ 1 (Kaviratne, Hesse et al. 2004). Néanmoins, en réponse à une blessure chronique, des mécanismes de réparation cellulaires peuvent devenir hyperactifs et dérégulés, entraînant un faible potentiel de régénération avec une fibrose croissante.

Une revue de la littérature récente proposée par l'équipe de Wynn (Gieseck, Wilson et al. 2018) a analysé le rôle de la réponse immunitaire Th2 dans la réparation tissulaire en général et les mécanismes de fibrose à travers des exemples de pathologies touchant différents organes mais ayant toutes en commun une composante pro-fibrosante (Gieseck, Wilson et al. 2018). Il montre qu'un bon nombre de types cellulaires clés - associés aux réponses immunitaires de type 2 - notamment les cellules Th2, les éosinophiles, les mastocytes, les basophiles et les macrophages activés par IL-4 et IL-13 régulent également la réparation tissulaire après une blessure. En effet, ces populations cellulaires peuvent exercer une activité protectrice cruciale en réduisant l'inflammation des tissus et en activant des mécanismes importants de régénération des tissus. Néanmoins, lorsque les processus de réparation médiés par les cytokines de type 2 deviennent chroniques, ils peuvent également contribuer au développement d'une réponse cellulaire inappropriée et d'une fibrose pathologique dans de nombreux systèmes organiques (Gieseck, Wilson et al. 2018) (cf. Figure 16).



**Figure 16 : Illustration résumant le rôle des cellules accessoires de la réponse immunitaire Th2 dans la réparation des blessures épithéliales et la fibrose de type 2. (Gieseck, Wilson et al. 2018)**

Les cellules accessoires incluant les macrophages, les éosinophiles, les fibroblastes et les cellules épithéliales vont déterminer si les réponses de type 2 entraînent un mécanisme de réparation réussi de la blessure avec une régénération tissulaire ad integrum ou au contraire entraînent une fibrose progressive et une réparation pathologique tissulaire hyperrégulée.

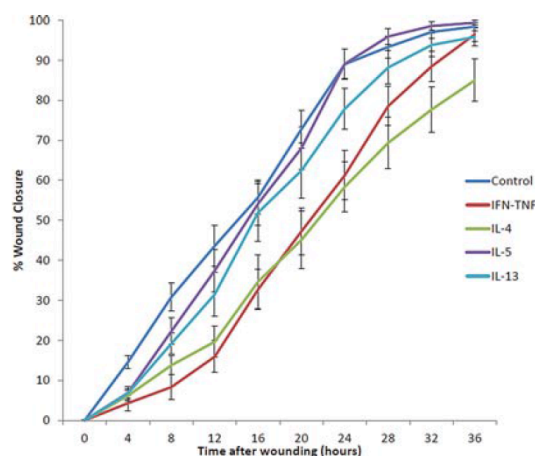
**Mode d'action réussi d'une processus de réparation épithéliale :** En réponse aux signaux IL-4 et IL-13, les cellules épithéliales prolifèrent et rétablissent la fonction de barrière après une blessure. Ces cytokines favorisent également la différenciation des cellules basales épithéliales en cellules ciliées et en cellules caliciformes sécrétant du mucus. Dans le cas d'une réponse immunitaire chronique de type 2 prédominante, une différenciation biaisée et une prolifération excessive peuvent entraîner une hyperplasie des cellules caliciformes et une production excessive de mucus. Les cellules épithéliales endommagées sécrètent également les alarmines, qui peuvent augmenter la réponse de type 2 en augmentant l'expression de cytokines effectrices de type 2 telles que l'IL-4, IL-5 et IL-13. Les Eotaxines, telles que la chemokine CCL11, sécrétées par les cellules épithéliales et les fibroblastes, en réponse à la signalisation IL-13, vont recruter des polynucléaires éosinophiles. Ces éosinophiles peuvent augmenter la régénération épithéliale en fournissant une source locale d'IL-4 qui déclenche la prolifération des cellules épithéliales. Quelques populations de résidents éosinophiles peuvent également atténuer les réponses excessives de type 2 en bloquant la présentation de l'antigène et l'activation cellules Th2.

**Mode d'action dysrégulé d'une processus de réparation épithéliale : Hyperréactivité de la réponse cellulaire à une blessure et création d'une fibrose :** En cas de réponses Th2 hautement polarisées, la présence excessive d'éosinophiles peut entraîner une cytotoxicité, une hyperréactivité allergique et une fibrose. En réponse directe à IL-4 et IL-13, les fibroblastes sécrètent du collagène et adoptent un phénotype contractile, ce qui peut aider à la fermeture de la blessure. De plus, des facteurs de croissance tels que l'amphiréguline peuvent aider à la réépithélialisation de la surface de la blessure. Cependant, la signalisation de type 2 excessive et répétitive dans les fibroblastes a pour résultat le dépôt excessif de collagène dans la matrice extracellulaire, conduisant finalement à des cicatrices hypertrophiques et une fibrose.

Tout au long de ce processus, les macrophages jouent un rôle régulateur clé en augmentant ou en supprimant la réponse de type 2 à différentes étapes. Les macrophages fournissent des facteurs de croissance essentiels, qui facilitent la réparation des blessures et favorisent la fibrogénèse. De plus, ces cellules peuvent recruter des cellules effectrices TH2, qui polarisent davantage la réponse anti-inflammatoire. Les macrophages peuvent atténuer cette réponse en produisant de l'IL-10 et le TGFβ, qui favorisent la différenciation des cellules T régulatrices. Dans l'ensemble, la réponse de type 2 est complexe et cible de nombreux types cellulaires dont les caractéristiques peuvent être bénéfiques ou pathogènes dans la réparation cellulaire et qui ne sont pas mutuellement exclusives. Ainsi, au cours de la mise en place de thérapeutiques, il est nécessaire d'examiner avec soin comment l'agonisme ou l'antagonisme de divers aspects de cette réponse affectera le système de réparation cellulaire dans son ensemble. (Gieseck, Wilson et al. 2018)

Certains facteurs inflammatoires ont déjà démontré des effets sur la réparation épithéliale en particulier la fermeture de blessure. Tan et al. (Tan, Hatzirodos et al. 2008) ont montré *in vitro* dans un modèle de culture de cellules épithéliale non nasales que le NGF (nerve growth factor) et le KGF (keratinocyte growth factor) accélèrent la fermeture des blessures épithéliales et augmentaient l'expression des protéines de jonction intercellulaires par rapport aux blessures contrôles (Tan, Hatzirodos et al. 2008). L'association de doses élevées d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) serait au contraire inhibitrice de la réparation épithéliale (Schaffer, Weimer et al. 2002).

L'effet des interleukines IL-4/IL-13/IL-5 sur la fermeture de blessure a aussi été étudié dans un modèle *in vitro* de CENH: IL-13 et IL-5 n'auraient pas d'influence sur la vitesse de fermeture des blessures et IL-4 diminuerait la vitesse de fermeture *in vitro* avec une absence de fermeture complète (Wise, Den Beste et al. 2013) (cf. Figure 17). Le taux d'Annexine 2 (protéine à la fois cytoplasmique et membranaire qui participe à la formation des jonctions intercellulaire) serait également diminuée en présence d'IL-4 par rapport aux zones de blessure contrôles sans IL. Ainsi l'IL-4 aurait un rôle d'inhibition de la migration cellulaire (Wise, Den Beste et al. 2013).



**Figure 17 : Pourcentage de fermeture des blessures *in vitro* en fonction du temps et en fonction de l'exposition ou non aux facteurs inflammatoires IL-4, IL-5 et IL-13 dans un modèle de culture primaire en ALI de cellules épithéliales nasales humaines issues de biopsies de tissu épithélial sain d'après Wise SK et Al. (2013)**  
(Wise, Den Beste et al. 2013)

Les effets précis au niveau cellulaire des autres cytokines de type Th1 et Th2 sur la réparation épithéliale nasale restent encore mal caractérisés à ce jour (Wise, Den Beste et al. 2013).

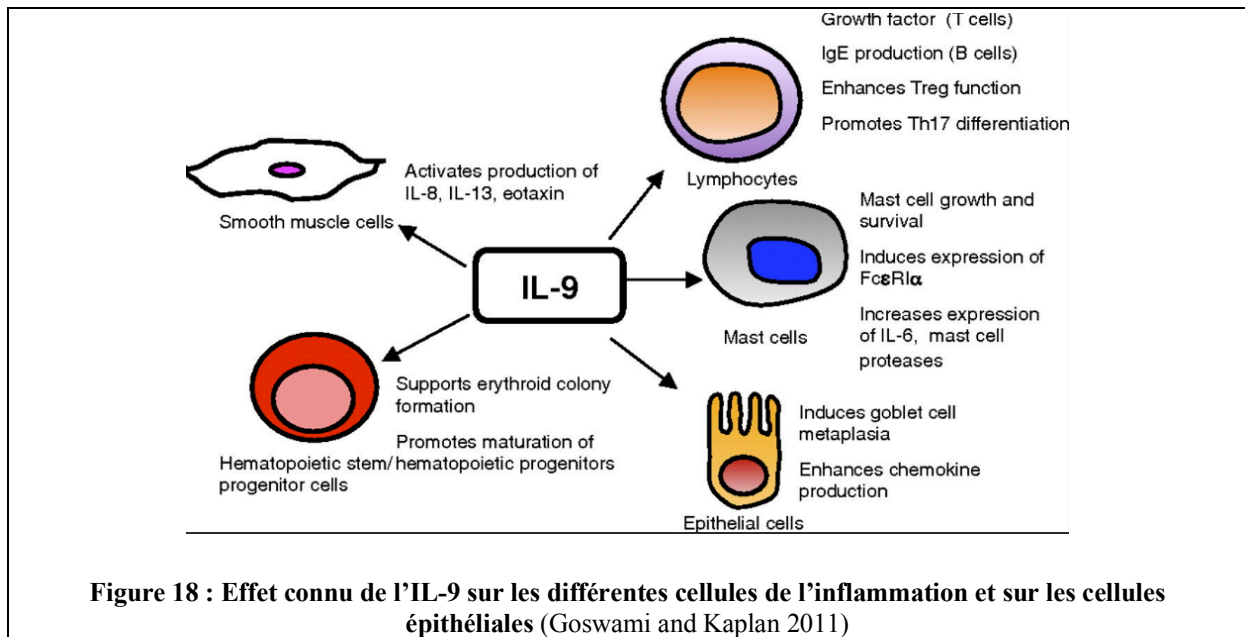
### **Influence directe de l'IL-6 sur la cellule épithéliale et la réparation**

Depuis la fin des années 80, il a été décrit l'existence de récepteurs de l'IL-6 (IL-6R) à la surface de cellules épithéliales, dont certaines sont polarisées, par exemple les hépatocytes et les cellules épithéliales intestinales (Castell, Geiger et al. 1988, Molmenti, Ziambaras et al. 1993). Molmenti et Al.

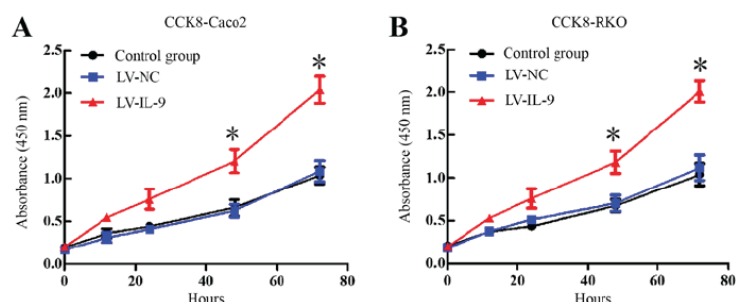
avaient montré que le récepteur à l'IL-6 était localisé à la face apicale mais également à la baso-latérale des cellules épithéliales intestinales (Caco-2) (Molmenti, Ziambaras et al. 1993). Une étude a décrit au début des années 2000 que les deux sous-unités transmembranaires du complexe récepteur de l'interleukine-6, le récepteur de l'IL-6 gp80 et le transducteur de signal gp130, sont situés à la phase baso-latérale de la membrane plasmique de cellules épithéliales polarisées (Madin-Darby canine kidney MDCK), face au compartiment sanguin et peuvent capter ainsi facilement l'IL-6 circulant (Martens, Bode et al. 2000). Concernant son influence potentielle sur la réparation épithéliale des CENH, il a été précédemment décrit que l'IL-6 (dans des modèles de blessure de cellules épithéliales biliaire humaines ou de cellules épithéliales cornéennes) accélérât la vitesse de fermeture de blessure (Arranz-Valsero, Soriano-Romani et al. 2014, Jiang, Cao et al. 2016). Dans un modèle de cancer du côlon, une croissance intra-tumorale de cellules épithéliales est observée lors d'une stimulation avec le complexe IL-6/sIL-6R (Scheller, Ohnesorge et al. 2006). De plus, dans tous ces modèles animaux, la progression de la maladie peut être interrompue en interférant spécifiquement avec la signalisation de l'IL-6 à l'aide de la protéine gp130Fc soluble dans le recombinant. En ce qui concerne le rôle moléculaire de l'IL-6, il est connu que l'IL-6 est impliquée dans la phase de réponse aiguë suivant la cicatrisation de la plaie, augmentant la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse en induisant la production de VEGF (Mihara, Hashizume et al. 2012). L'IL6 peut aussi induire une réponse immunitaire T helper 17 (Th17) via la voie de signalisation intracellulaire STAT 3 (Mucida and Salek-Ardakani 2009). STAT3 régule également le processus de migration cellulaire. Il est donc important pour la cicatrisation des blessures. En utilisant le modèle de souris déficientes en IL-6, une étude a montré que le système IL-6 était impliqué de manière pivot dans la réparation de la barrière de perméabilité de l'épiderme via STAT3 (Wang, Schunck et al. 2004). Dans un modèle *in vitro* de cancer de l'ovaire, l'IL-6 augmenterait la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales épithéliales (Touboul, Lis et al. 2013). Ses effets sur les mécanismes de réparation épithéliale nasale ne sont pas encore connus.

### **Influence directe de l'IL-9 sur la cellule épithéliale**

Des observations récentes ont montré que l'IL-9 pouvait avoir un effets direct sur les cellules épithéliales nasales humaines depuis que l'on a découvert que les cellules épithéliales elle-même étaient porteuses du récepteur à l'IL-9 (IL-9R $\alpha$ ) et que l'IL-9 pouvait induire directement la transcription des mucines et une hyperproduction de mucus par les cellules caliciformes (Longphre, Li et al. 1999, Louahed, Toda et al. 2000, Reader, Hyde et al. 2003, Vermeer, Harson et al. 2003, Goswami and Kaplan 2011) (cf. Figure 18).



Il est également capable d'induire la production de CCL20 par les cellules épithéliales qui va attirer les cellules dendritiques sur le site inflammatoire (Lu, Hong et al. 2012). L'IL-9 serait capable d'induire la production de cytokines par la cellule épithéliale elle-même (Goswami and Kaplan 2011). L'IL-9 a été également décrite comme une cytokine pro-tumorale. La dérégulation d'IL-9 est capable (comme observé dans le cancer broncho-pulmonaire) d'activer la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT de la cellule sur laquelle elle s'est fixée et va induire la croissance cellulaire autonome, la transformation maligne des cellules et une meilleure adhésivité cellulaire et va protéger les cellules tumorales de l'apoptose (Ye, Zhou et al. 2012). L'IL-9 serait capable d'induire la prolifération des cellules épithéliales dans le cancer du sein. Hsieh et al. ont utilisé des lignées cellulaires du cancer du sein et ont constaté que l'IL-9 est impliquée dans la prolifération, la croissance cellulaire, la migration cellulaire, et diminuait de l'apoptose des cellules cancéreuses (Hsieh, Hsu et al. 2016). Une étude a récemment rapporté que des cultures de cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 et des cellules épithéliales de cancer colo-rectales RKO, transfectées par un lentivirus porteur d'IL-9, présentaient une prolifération cellulaire augmentée par rapport aux cultures contrôles (cf. Figure 19), (Tian, Li et al. 2019). Ses effets sur les mécanismes de réparation épithéliale nasale ne sont pas encore connus.



**Figure 19: Graphique présentant le rôle de l'IL-9 capable à l'état transfecté d'induire la prolifération cellulaire des cellules épithéliales Caco2 (A) et RKO (B)**

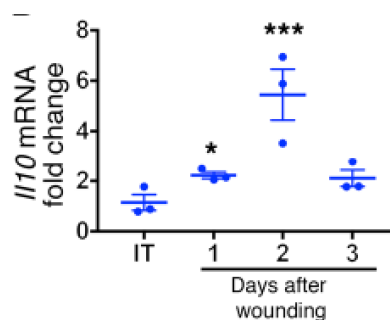
En comparaison avec le groupe contrôle en noir et le LV-NC (lentiviral Vector- Negativ Control) en bleu, l'hyperexpression de l'IL-9 augmente la prolifération cellulaire des cellules RKO et des cellules Caco2

\* $p < 0,05$  Abréviations : CCK8 Cell counting Kit-8

(Tian, Li et al. 2019)

## Influence directe de l'IL-10 sur la cellule épithéliale

Les effets de l'IL-10 sur la réparation de la barrière épithéliale de la muqueuse nasale n'ont pas encore été complètement élucidés. Il existerait une augmentation des niveaux d'IL-10 suite à des blessures réalisées sur des cultures de cellules épithéliales intestinales SKC-15 (Quiros, Nishio et al. 2017). Après blessure, un rôle bénéfique de l'IL-10 a été décrit dans des tissus tels que le muscle cardiaque, l'endothélium de la carotide et l'épithélium pulmonaire (Inoue 2000, Novak, Weinheimer-Haus et al. 2014, Verma, Garikipati et al. 2016, Quiros, Nishio et al. 2017). Dans un modèle *in vivo* murin de blessure épithéliale de la muqueuse intestinale, une expression augmentée de la protéine IL-10 et de l'ARNm a été rapportée dès 1 jour après la blessure avec un pic observé au 2<sup>ème</sup> jour de blessure (Quiros, Nishio et al. 2017) (cf. Figure 20).



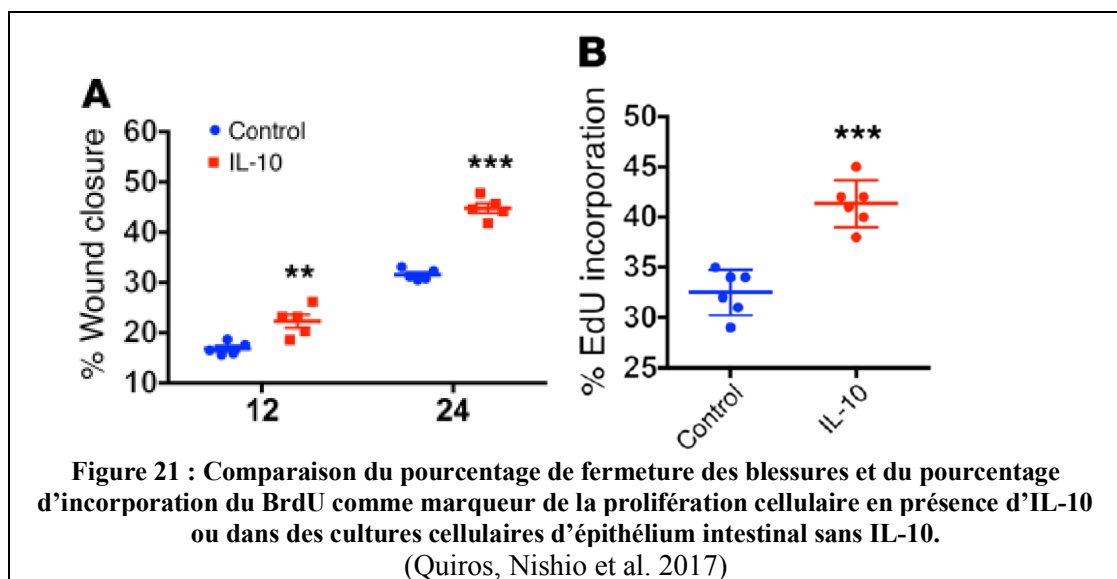
**Figure 20 : Effet de la réparation cellulaire sur la sécrétion d'IL-10**

Expression augmentée l'ARNm de l'IL-10 a été mise en évidence dans un modèle *in vivo* murin de plaie de la muqueuse colique dès 1 jour après la blessure avec un pic observé au 2<sup>ème</sup> jour de blessure (expression de l'ARN messager multipliée par 5)

(Quiros, Nishio et al. 2017)

Les auteurs ont montré que l'IL-10 était nécessaire pour la fermeture optimale de la plaie de la muqueuse intestinale avec absence de fermeture des blessures dans le modèle *in vivo* de souris knock-

out pour l'IL-10. Cette étude a également mis en évidence la capacité de l'IL-10 à induire une prolifération cellulaire au sein des cultures (cf. Figure 21) (Quiros, Nishio et al. 2017).



**Les dommages épithéliaux causés par des médiateurs inflammatoires pourraient induire une prolifération cellulaire accrue par le biais de processus de réparation épithéliale. Les cellules inflammatoires accessoires participant à la réponse immunitaire Th2 pourraient, elles aussi, réguler positivement la prolifération des cellules épithéliales en sécrétant des facteurs de croissance. Un objectif de recherche important dans les années à venir serait ainsi la caractérisation des différents mécanismes cellulaires, moléculaires et éventuellement génétiques qui sous-tendent les anomalies de réparation, ce qui pourrait permettre d'identifier des outils visant à inhiber les mécanismes endogènes responsables d'une hyperréactivité de la réponse cellulaire à une blessure (Gieseck, Wilson et al. 2018)**

### 2.3.3 La Polypose Naso-sinusienne : modèle de dysrégulation de l'épuration muco-ciliaire ?

Dans des conditions physiologiques, les cellules épithéliales qui tapissent la muqueuse nasale jouent également un rôle essentiel dans la clairance muco-ciliaire et la défense de l'hôte. La fonction ciliaire est un élément clef dans l'élimination des agents extérieurs et la prévention des maladies chroniques inflammatoires. Chez les patients atteints de dyskinésie ciliaire primitive, la RSC (avec polypes dans 30% des cas) est une pathologie constante associée à la dilatation des bronches (Bequignon, Dupuy et al. 2019). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'incapacité des cils à transporter le mucus

visqueux provoque une RSC qui s'accompagne de polypes dans 30 à 60% d'entre eux (Henriksson, Westrin et al. 2002, Weber, Iyomasa et al. 2017). La clairance muco-ciliaire des voies respiratoires est un phénomène dynamique et peut, dans des conditions appropriées, être stimulée. Cela a été démontré dans un certain nombre d'études mesurant les taux basaux de la clairance du mucus chez les sujets sains, ainsi que les changements qui se produisent dans la maladie et dans la réponse à l'inhalation de produits toxiques exogènes et des médicaments (Wanner 1996). Ce processus d'épuration est en partie fonction de la vitesse de battement ciliaire (Satir and Sleight 1990). Il est également fortement influencée par la composition du mucus et ses propriétés viscoélastiques (Puchelle, de Bentzmann et al. 1995, Winters and Yeates 1997, Tarran, Grubb et al. 2001). Les bactéries peuvent aussi augmenter la sécrétion de mucus et diminuer ou désorganiser l'activité ciliaire, altérant ainsi l'épuration mucociliaire (Wilson, Alton et al. 1987). Différentes agressions vont modifier au niveau nasal la constitution du mucus nasal et entraîner, dans la PNS, une hyperexpression de mucines (MUC1, -2, -4, -5AC, -5B -7, and -8) (Kato, Song et al. 2019). En particulier, la production de MUC5AC est augmentée par le biais des cytokines inflammatoires impliquées dans la PNS telles que TNF, IL-4, IL-13, IL-8, and IL17A (Kato, Song et al. 2019). Les neutrophiles présents en cas de réaction inflammatoire dans les voies aériennes vont produire une protéase, l'élastase qui va augmenter elle aussi la production de mucines (Fischer and Voynow 2002). Cette hyperexpression de mucines, associée aux altérations de l'épithélium respiratoire, semble avoir une importance dans la physiopathologie de maladies chroniques inflammatoires telles que l'asthme, la bronchite chronique, la fibrose pulmonaire ou la PNS (Rennard 1999, Voynow 2002, Watelet, Bachert et al. 2002).

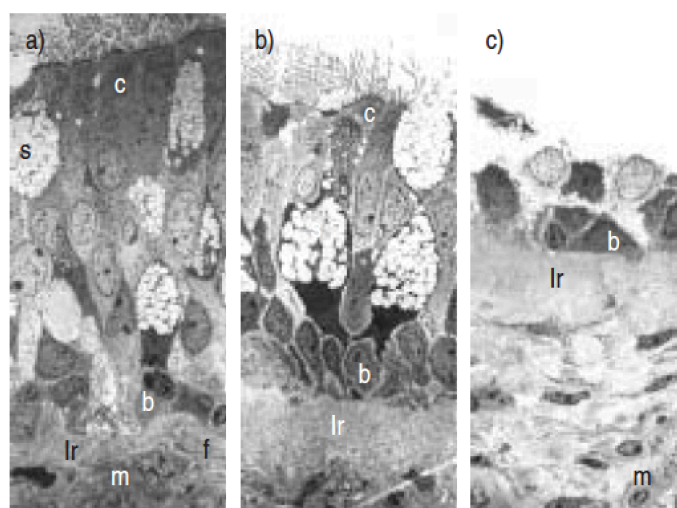
Outre la production de mucus, la cellule épithéliale assure un rôle essentiel dans l'épuration muco-ciliaire grâce au battement synchronisé des cils. Le battement des cils des cellules avoisinantes est synchronisé avec un décalage de phase permettant de créer une onde métachrone qui optimise le transport du mucus et des aérocontaminants piégés par ce dernier. L'efficacité du battement ciliaire reste à ce jour mal caractérisée dans la PNS. Dans la littérature, le seul paramètre utilisé pour caractériser la fonction ciliaire dans la PNS est la fréquence de battement ciliaire (FBC), mais les résultats des études *ex vivo* sont très hétérogènes. Certaines études ont montré que la FBC avait des valeurs proches de la normale (Slater, Smallman et al. 1996, Kozlov, Shilenkov et al. 2008), tandis que d'autres ont constaté une augmentation de cette fréquence par rapport aux patients contrôles (Braverman, Wright et al. 1998). En revanche, la FBC était significativement plus faible dans des cultures de CENH en interface air-liquide (ALI) issues de polypes par rapport à la FBC mesurée dans les mêmes cultures issues de contrôles, (Li, Li et al. 2014). Enfin, la FBC seule ne peut pas renseigner ni sur la qualité de la coordination du battement ciliaire et ni sur son efficacité globale.

Concernant la clairance muco-ciliaire globale, elle a été historiquement étudiée *in vivo* par le temps de clairance de la saccharine qui manque de précision et a été depuis abandonné. Ces études ont néanmoins montré que le temps de clairance de la saccharine est plus long chez les patients porteurs de PNS (Slater, Smallman et al. 1996, Kozlov, Shilenkov et al. 2008).

**La PNS comporte des anomalies de l'épithélium cilié au niveau structurel mais également au niveau fonctionnel : l'épuration muco-ciliaire a été cependant jusqu'à ce jour très peu caractérisées dans la PNS, avec des données hétérogènes ne portant que sur la seule fréquence du battement. Le développement récent de nouvelles techniques d'investigation de la fonction ciliaire permettrait d'envisager une caractérisation plus précise et plus complète des éventuelles altérations du battement ciliaire et donc de l'épuration muco-ciliaire dans la PNS, qui pourraient participer à la maladie inflammatoire chronique.**

## 2.4. PNS et Asthme, des caractéristiques physiopathologiques communes

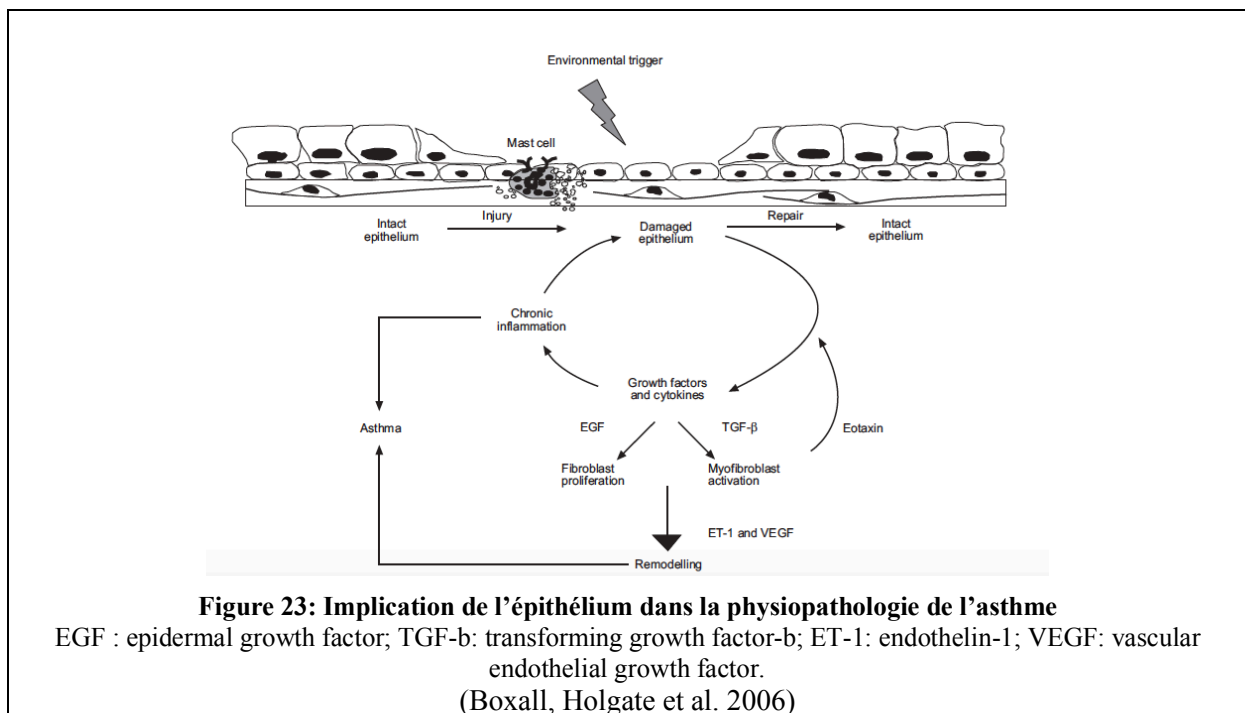
L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des bronches, d'origine multifactorielle, de plus en plus répandue dans les pays en développement et qui toucherait 10% de la population mondiale (Boxall, Holgate et al. 2006). Bien que l'asthme et la PNS soient fréquemment associés, la relation physiopathologique existant entre ces deux pathologies est encore mal connue. Les atteintes bronchiques et sinusiennes peuvent ainsi se développer simultanément ou la PNS peut précéder l'apparition de l'asthme (Larsen 1996). L'association épidémiologique entre l'asthme et la PNS est assez bien documentée. Il a également été démontré que l'augmentation de la sévérité de l'asthme était associée à une aggravation de l'inflammation sino-nasale (Pearlman, Chandra et al. 2009, Lin, Chandra et al. 2011). Dans l'asthme, à différents phénotypes correspondent différents endotypes inflammatoires, dont l'asthme allergique est le plus fréquent. Cependant les patients porteurs d'une PNS sont le plus souvent associés à un asthme de type non allergique (Settipane 1996). La maladie asthmatique se caractérise par une inflammation chronique et un remodelage tissulaire des voies respiratoires inférieures qui présente de grandes similitudes avec celles de la PNS : fibrose sous-épithéliale, associées à des dommages épithéliaux, une œdème et une augmentation de la névascularisation (Boxall, Holgate et al. 2006) (cf. Figure 22). Une hyperplasie des myofibroblastes est également associée dans l'asthme, comme dans la PNS (Wang, Escudier et al. 1997, Boxall, Holgate et al. 2006, Meng, Zhou et al. 2013).



**Figure 22 : Images en microscopie électronique montrant le remodelage tissulaire dans l'asthme**

a) un épithélium normal, b) un épithélium respiratoire d'un patient porteur d'un asthme léger c) épithélium d'un patient atteint d'un asthme sévère. L'épithélium est fréquemment endommagé dans les voies respiratoires des patients asthmatiques, révélant des zones dénudées où les cellules basales sont exposées (c), une augmentation des cellules à mucus (cellules caliciformes) (b) et un épaississement de la lame réticulée. Abréviations : b: cellule basale, c: cellules épithéliales ciliées, f: (myo)fibroblaste, lr: lame réticulée, m: mastocyte, s: cellules à mucus (Boxall, Holgate et al. 2006)

Les autres caractéristiques de l'épithélium bronchique chez le patient asthmatique sont une augmentation du nombre de cellules caliciformes (cellules à mucus) (Ordonez, Khashayar et al. 2001) et une augmentation de la taille des glandes sous-muqueuses (Carroll, Mutavdzic et al. 2002) entraînant une libération excessive de mucus. Comme dans la PNS, la mucine la plus largement surexprimée est la MUC5AC. On retrouve, de façon analogue à la PNS, un phénomène pro-fibrosant avec une présence accrue de fibroblastes (Boxall, Holgate et al. 2006). Concernant les dommages épithéliaux, certaines fonctions épithéliales sont altérées de manière similaire à la PNS. En particulier, le dysfonctionnement de la barrière épithéliale est impliquée dans la pathophysiologie de l'asthme. Il a été démontré en effet que l'épithélium des voies respiratoires des patients asthmatiques présentait un certain nombre d'anomalies structurelles et fonctionnelles, notamment une diminution de l'expression des protéines de jonction (jonctions serrées), une augmentation de la perméabilité cellulaire (Holgate 2007, de Boer, Sharma et al. 2008, Holgate, Arshad et al. 2009, Xiao, Puddicombe et al. 2011). Outre une susceptibilité accrue aux blessures, une réparation dysrégulée et une prolifération accrue ont été observées au sein de l'épithélium des voies respiratoires des patients asthmatiques (Holgate, Lackie et al. 2000, Vignola, Chiappara et al. 2001, Trautmann, Kruger et al. 2005, Xiao, Puddicombe et al. 2011). L'épithélium libère des cytokines proinflammatoires et des facteurs de croissance profibrosants qui peuvent favoriser le remodelage et perpétuer le cycle inflammatoire chronique (cf. Figure 23). Les fibroblastes activés peuvent à leur tour libérer des facteurs qui favorisent l'inflammation ainsi que les processus de remodelage, tels que l'hyperplasie des cellules musculaires lisses et l'angiogenèse. Il est postulé, de façon similaire à la physiopathologie de la PNS, que le remodelage tissulaire et l'inflammation empêchent la réparation normale de l'épithélium endommagé conduisant au développement de l'asthme.



De manière analogue à la PNS, les deux principaux endotypes d'asthme reconnus sont basés sur le profil inflammatoire des voies respiratoires : on distingue l'asthme à forte réponse T2 (« T2-high asthma ») (réponse induite par les cellules T-helper 2 (Th2) ou également les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2)) et l'asthme à faible réponse T2 (« T2-low asthma ») (Brussino, Heffler et al. 2018). La physiopathologie de l'asthme à faible réponse T2 n'est pas complètement comprise, mais pourrait être caractérisée par une inflammation neutrophilique, suggérant une réponse inflammatoire activant des cellules Th1 et/ou Th17 et serait associé à une forme d'asthme plus sévère et cortico-résistante. La recherche actuelle tend à identifier des biomarqueurs qui seraient reliés à la sévérité de la maladie asthmatique, comme par exemple, les Circulating neutrophil extracellular traps (NET) circulants, qui reflètent l'activation des neutrophiles et qui pourraient être un marqueur de la sévérité dans l'asthme (Granger, Taille et al. 2019).

En revanche, dans l'asthme à forte réponse T2, l'augmentation des polynucléaires à éosinophiles, induite par une surproduction de cytokines de type 2 par les lymphocytes Th2 et les cellules lymphoïdes innées, est généralement trouvée chez de nombreux patients (Brussino, Heffler et al. 2018).

**L'inflammation chronique et le remodelage tissulaire sont les signes fondamentaux de l'asthme. Une voie physiopathologique commune est donc suggérée entre l'atteinte des voies aériennes inférieures dans l'asthme et l'atteinte des voies aériennes supérieures de la PNS. La dysfonction épithéliale serait, comme dans la PNS, impliquée de façon majeure dans la physiopathologie de l'asthme (Boxall, Holgate et al. 2006, Holgate 2007).**

## **2.5. Le traitement de la PNS et enjeux d'avenir pour les biothérapies**

### **2.5.1 Stratégies thérapeutiques médicales recommandées**

Chez les patients souffrant de PNS, le traitement médical constitue toujours la première ligne thérapeutique et comprend des irrigations nasales et des glucocorticoïdes par voie locale. Les irrigations au sérum salé sont recommandées dans la plupart des « guidelines » mais les essais randomisés de bonne qualité sur ce sujet sont limités (Chong, Head et al. 2016). En revanche, beaucoup d'études démontrent l'efficacité des glucocorticoïdes par voie nasale versus placebo sur l'ensemble des symptômes et sur la réduction objective de la taille des polypes. L'efficacité a été démontrée dans une méta-analyse publiée en 2016 avec 13 études retenues sur 3770 références montrant toutes un effet bénéfique des corticoïdes locaux sur le score de symptômes (Chong, Head et al. 2016). Il existe très peu d'effets indésirables avec ces traitements, les principaux étant l'épistaxis et la sensation d'irritation nasale. Le passage systémique est estimé à moins de 1%, ce qui permet d'utiliser au long cours ces traitements avec une bonne sécurité. Ils sont cependant probablement sous-utilisés en raison d'une prescription insuffisante et une faible adhérence au traitement (Hopkins 2019). Une étude a rapporté que seulement 20% des patients porteurs de PNS utilisaient des glucocorticoïdes et le plus souvent à un dosage inférieur aux posologies recommandées. Des études ont démontré que l'efficacité des corticoïdes locaux est augmentée après chirurgie en raison de l'amélioration de l'accessibilité du traitement à l'ensemble de la cavité nasale (Kalish, Snidvongs et al. 2012). Pour les patients présentant des symptômes sévères chez qui le traitement local initial est insuffisant, une cure courte de glucocorticoïdes par voie orale doit être envisagée (Hopkins 2019). Une revue Cochrane portant sur 8 études randomisées montre un bénéfice à court terme d'une cure courte (2 à 3 semaines) de glucocorticoïdes par voie orale (à des doses variables en moyenne 0,5 mg/kg avec une dose maximale de 60 mg) en comparaison à un placebo (Head, Chong et al. 2016). Les effets digestifs et l'insomnie sont les principaux effets adverses rapportés. Des antibiotiques par macrolides à mi dose au long cours ont été aussi proposés en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires (Sharma, Lakhani et al. 2014). Dans l'étude de Yamada et al. (Yamada, Fujieda et al. 2000), un traitement antibiotique par macrolide à faible dose a permis de réduire la production d'IL-8 dans les polypes et de diminuer leur taille (Yamada, Fujieda et al. 2000). Cependant, leur bénéfice semble limité aux patients avec des niveaux normaux d'IgE (Cervin and Wallwork 2014). Une revue récente de la littérature sur les macrolides au long cours retient sept études pertinentes dans la PNS et ne retrouve pas d'effet bénéfique des macrolides sur la qualité de vie reliée aux symptômes rhinologiques (SNOT 22) ou sur le score endoscopique de polypes ou le score scannographique (Seresirikachorn, Suwanparin et al. 2019).

### **2.5.2 Place du traitement chirurgical endoscopique**

La chirurgie endoscopique dans la PNS est réservée aux patients qui ont un bénéfice insuffisant au regard des symptômes, aux patients cortico-dépendants ou à ceux présentant une complication de leur PNS. L'objectif de la chirurgie est d'améliorer l'accès des glucocorticoïdes par voie locale en réalisant l'exérèse des polypes. Un récent consensus recommande qu'en cas de PNS non compliquée, le traitement chirurgical peut être proposé s'il persiste des symptômes importants et des signes objectifs sur le scanner, après un essai d'au minimum 8 semaines de traitement par un corticoïde local et 1 à 3 semaines de glucocorticoïdes par voie générale (Rudmik, Soler et al. 2016). La procédure habituelle propose soit une polypectomie (exérèse des polypes des fosses nasales avec une squelettisation des méats), soit une ethmoïdectomie qui consiste en un évidement complet de l'ensemble des sinus. La corticothérapie locale doit être ensuite poursuivie au long cours dans les deux cas. Les complications sévères oculaires et cérébro-méningées de l'ethmoïdectomie sont exceptionnelles. Une étude rétrospective monocentrique avait montré sur 127 patients une efficacité comparable des 2 techniques à 3 ans concernant le score fonctionnel et la taille des polypes endoscopique (Devars du Mayne, Pruliere-Escabasse et al. 2011). Le traitement chirurgical montre dans une large cohorte une amélioration de la qualité de vie à long terme qui se maintient au-delà de 5 ans (Hopkins, Slack et al. 2009). Cependant le problème majeur reste la récurrence des polypes avec un taux estimé à 40% à 18 mois après la chirurgie dans une large cohorte de patients de plus de 350 patients (DeConde, Mace et al. 2017). Dans le suivi d'une large cohorte de plus de mille patients opérés pour une PNS, 20% des patients avaient une reprise chirurgicale dans les 5 ans (Hopkins, Slack et al. 2009). En cas d'intolérance à l'aspirine associée, une désensibilisation sous contrôle médical strict aurait montré, en post chirurgie, une diminution du risque de récurrence (Hopkins, Slack et al. 2009, Klimek, Dollner et al. 2014, Levy and Smith 2017).

### **2.5.3 Nouveaux enjeux thérapeutiques**

#### **Amélioration de la délivrance locale des glucocorticoïdes**

Un nouveau dispositif par inhalation, dans lequel le produit est délivré au niveau nasal au moment de l'expiration du patient améliorerait considérablement le contrôle des symptômes, avec une disparition des polypes chez 25% des patients dans une étude contrôlée versus placebo mais sans comparaison directe avec les systèmes locaux de délivrance classiques des glucocorticoïdes (Leopold, Elkayam et al. 2019). Des stents avec des glucocorticoïdes sont actuellement également mis au point pour une utilisation avant et après une chirurgie des sinus, avec pour objectif d'augmenter les concentrations locales du produit conduisant à un meilleur contrôle de l'inflammation et améliorer l'observance. Un essai randomisé avec un stent biodégradable de glucocorticoïdes versus placebo a montré une réduction significative de l'incidence de la chirurgie, du score de symptômes et de la taille des polypes (Kern, Stolovitzky et al. 2018); davantage de données sont nécessaires pour déterminer le rapport coût-

efficacité et la place de tels stents dans la pratique.

### Apparition des thérapies monoclonales

Les anticorps monoclonaux qui ciblent directement la voie inflammatoire ont été suggérés comme une nouvelle thérapie pour la PNS. Le mécanisme d'action des différentes thérapies monoclonales qui ont été testées dans la PNS est présenté dans le tableau suivant et dans la Figure 24:

#### Rappel du mode d'action

##### des différentes thérapies ciblées testées dans la PNS :

**L'Omalizumab est un anticorps monoclonal humanisé produit par la technique dite de l'ADN recombinant, qui se fixe de manière sélective aux immunoglobulines E (IgE) humaines.** L'anticorps est une IgG1 kappa obtenue par la fusion d'une région d'origine humaine avec des régions de complémentarité se fixant aux IgE et provenant d'un anticorps murin.

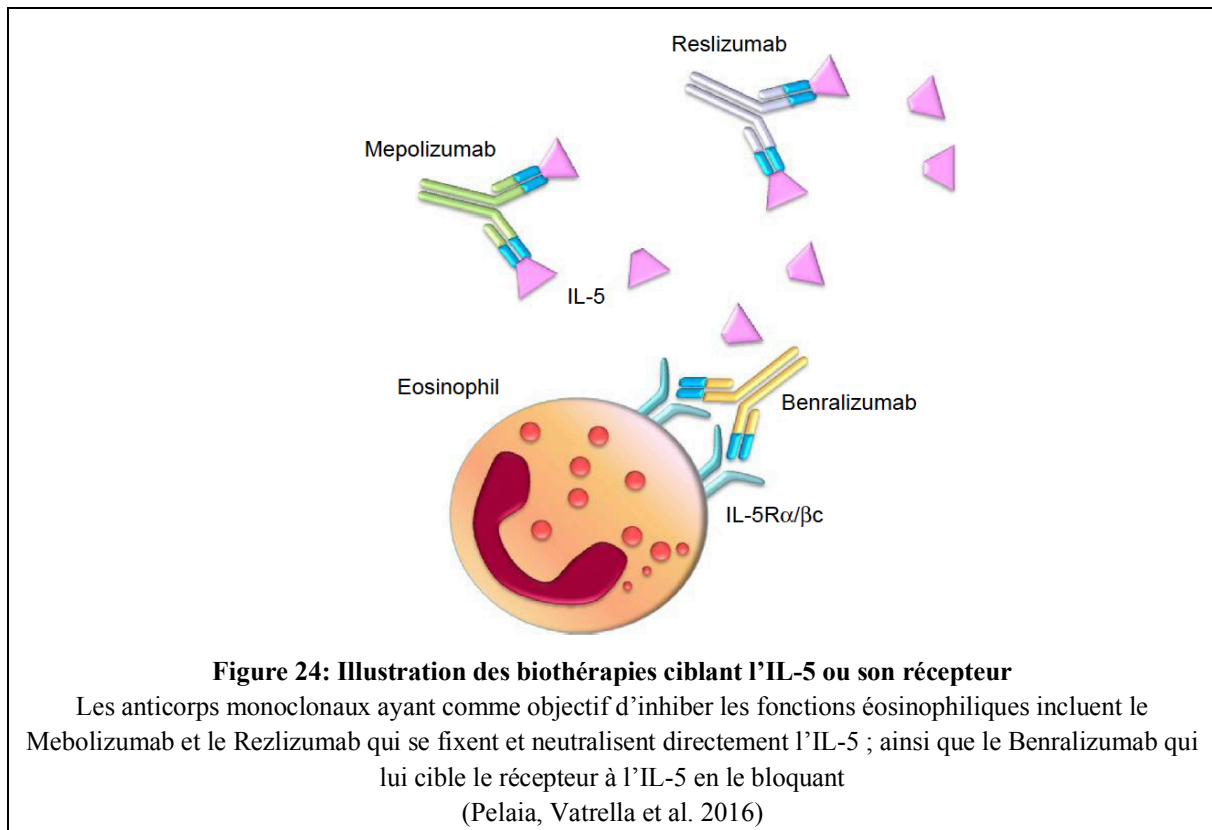
Asthme allergique : L'Omalizumab se fixe aux IgE et empêche la fixation des IgE aux FcεpsiRI (récepteurs de haute affinité des IgE), réduisant ainsi la quantité d'IgE circulantes pouvant déclencher la chaîne de réactions allergiques. Le traitement des sujets atopiques par l'omalizumab a entraîné un phénomène de rétrocontrôle à l'origine de la diminution des récepteurs FcεpsiRI présents à la surface des basophiles. Par ailleurs, la libération d'histamine *in vitro* à partir de basophiles isolés chez des sujets traités par Omalizumab a été réduite d'environ 90 % après stimulation par un allergène par rapport aux valeurs préthérapeutiques.

**Le Reslizumab est un anticorps monoclonal humanisé (IgG4, κ) dirigé contre l'interleukine 5 (IL-5) humaine.** Le reslizumab se lie spécifiquement à l'IL-5 et interfère avec la liaison de l'IL-5 à son récepteur de surface cellulaire. L'IL-5 est une cytokine impliquée dans la différenciation, la maturation, le recrutement et l'activation des éosinophiles humains. Le reslizumab se lie à l'IL-5 humaine avec une affinité de l'ordre du picomolaire, bloquant ainsi sa fonction biologique, ce qui a pour conséquence de réduire la survie et l'activité des éosinophiles.

**Le Mépolizumab est un anticorps monoclonal humanisé (IgG1, kappa), qui cible l'interleukine-5 (IL-5) humaine avec une affinité et une spécificité élevées.** L'IL-5 est la principale cytokine intervenant dans la croissance et la différenciation, le recrutement, l'activation et la durée de vie des éosinophiles. Le Mépolizumab inhibe l'activité biologique de l'IL-5 à une concentration nanomolaire en bloquant la liaison de l'IL-5 à la chaîne alpha du complexe récepteur de l'IL-5 exprimé sur la surface cellulaire des éosinophiles. Il inhibe ainsi la voie de signalisation de l'IL-5 et réduit la production et la durée de vie des éosinophiles.

**Le Benralizumab est un anticorps monoclonal humanisé (IgG1, kappa), afucosylé, anti-éosinophiles qui cible le récepteur à l'IL-5.** Il se lie à la sous-unité alpha du récepteur humain de l'interleukine 5 (IL-5R<sub>alpha</sub>) avec une affinité et une spécificité élevées. Le récepteur de l'IL-5 est spécifiquement exprimé à la surface des éosinophiles et des basophiles. La réduction de l'inflammation éosinophilique est obtenue par l'apoptose des éosinophiles et des basophiles.

**Le Dupilumab est un anticorps monoclonal recombinant humain de type IgG4 qui inhibe la signalisation de l'interleukine-4 et l'interleukine-13.** Le Dupilumab inhibe la signalisation de l'IL-4 via le récepteur de type I (IL-4Rα/γc), et la signalisation à la fois de l'IL-4 et l'IL-13 via le récepteur de type II (IL-4Rα/IL-13Rα). L'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines majeures de type 2 (notamment Th2) impliquées dans la PNS.



Dans de petits essais randomisés avec un recul relativement faible (6 mois), des anticorps monoclonaux approuvés pour le traitement de l'asthme allergique réfractaire, y compris l'Omalizumab (Gevaert, Calus et al. 2013) (anti-IgE) et le Mepolizumab (anti IL-5) (Gevaert, Van Bruaene et al. 2011) ont été testés dans la PNS. L'Omalizumab, le Mepolizumab et le Dupilumab (anti IL-4 / IL-13) (Bachert, Mannent et al. 2016) ont significativement réduit les scores de symptômes et la taille endoscopique des polypes. Concernant les essais sur le Mepolizumab et le Dupilumab, la taille des polypes était significativement diminuée chez respectivement 60% et 70% des participants avec un effet d'amélioration du score de qualité de vie liée aux symptômes rhinologiques (SNOT-22). Plusieurs essais de phase 3 en cours évaluent ces médicaments. Deux récentes études de phase 3 randomisées contrôlées versus placebo viennent d'être publiées dans le Lancet en septembre 2019 qui évaluent l'efficacité du Dupilumab à 24 et à 52 mois de traitement (1 injection tous les 15 jours) chez les patients porteurs de PNS âgés de plus de 18 ans ne répondant pas à la corticothérapie locale et encore symptomatiques malgré la prise de corticoïdes systémiques ou une chirurgie dans les 2 précédentes années (n=276 et n=143 patients respectivement) (Bachert, Han et al. 2019). Ces deux études montrent une efficacité durable sur cette période, significative sur le score endoscopique de polypes, le score scannographique, l'obstruction nasale et l'anosmie. L'efficacité était similaire chez les patients présentant un asthme associé et ceux ayant une polyposse récidivante malgré la chirurgie. On constate également une diminution des biomarqueurs sériques tels que le taux d'IgE total, la periostine, TARC et l'éotaxine 3. La principale limitation actuellement est l'absence d'autorisation

de mise sous le marché (AMM) de ces thérapies ciblées pour la PNS seule. Selon Claire Hopkins (Hopkins 2019), les coûts élevés, le risque d'anaphylaxie et l'utilisation de l'injection sous-cutanée sont des facteurs limitants dans l'application généralisée de tels traitements à l'heure actuelle. La classification de la RSC et PNS en différents endotypes établis sur la base de du profil inflammatoire (par exemple, sur la base de l'expression de différentes cytokines inflammatoires de type 2) a été proposé pour mieux prédire l'évolution de la maladie et l'efficacité des thérapies (Bachert and Akdis 2016). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour identifier les biomarqueurs cliniquement pertinents et pour déterminer si les traitements basés sur chaque endotype sont plus efficaces que les stratégies actuelles. Par comparaison avec l'asthme, une étude récente a par exemple montré que le taux d'éosinophiles circulants dans l'asthme allergique sévère ne permettait pas de distinguer les bons des mauvais répondeurs à l'Omalizumab (Humbert, Taille et al. 2018). La recherche de biomarqueurs est nécessaire dans l'asthme comme dans la PNS pour l'identification phénotypique afin de guider la thérapeutique (Taille, Bourdin et al. 2016).

### **Perspective thérapeutique de la thérapie monoclonale ciblant l'IL-9**

Les caractéristiques de l'IL-9, comme nous l'avons vu auparavant, font de cette cytokine une candidate potentielle dans la modulation de la réponse inflammatoire au cours de la PNS en association avec l'asthme. Un anticorps anti-IL-9, le MEDI-528, a été étudié dans l'asthme et semblait réduire les exacerbations (Gong, Pan et al. 2017). Il a notamment été testé sur un modèle murin d'asthme induit par l'ovalbumine sur des souris BALB/C et réduisait les concentrations de PNE, de lymphocytes, d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 dans le lavage bronchoalvéolaire (Cheng, Arima et al. 2002).

### **Perspectives thérapeutiques de la thérapie monoclonale ciblant l'IL-6**

Un anticorps monoclonal anti récepteur à l'IL-6, le Tocilizumab, est actuellement utilisé dans la polyarthrite rhumatoïde et dans l'arthrite juvénile idiopathique systémique. Il est commercialisé en France depuis 2009 et, depuis 2015, la voie sous cutanée est disponible. Le Tocilizumab se lie de manière spécifique aux récepteurs solubles et membranaires de l'interleukine IL-6 (sIL-6R et mIL-6R)). Il a été démontré que le Tocilizumab inhibe la transmission du signal médié par les récepteurs sIL-6R et mIL-6R. Les effets secondaires sont peu fréquents, (toxicité hématologique, et hépatique). L'IL-6 est décrite depuis peu comme une cytokine importante dans la physiopathologie de l'asthme où elle ne serait pas seulement impliquée dans la réponse inflammatoire de type Th1 mais également participerait à la réponse Th2 qui reste prédominante dans la PNS dans la population caucasienne. Autre élément faisant son originalité, l'existence de son récepteur soluble qui lui permettrait ensuite une fois couplée à son récepteur soluble d'activer un grand nombre de types cellulaires n'exprimant pas son récepteur membranaire. Le Tocilizumab pourrait être envisagée comme une nouvelle thérapie ciblée dans la PNS.

### **Perspectives thérapeutiques de la thérapie monoclonale ciblant l'IL-10**

Il y a une dizaine d'années, l'administration d'IL-10 recombinante (rIL-10) était prometteuse en tant que traitement anti-inflammatoire. Certains des premiers essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de psoriasis avec des résultats encourageants (Saxena, Khosraviani et al. 2015). Contrairement à beaucoup d'autres cytokines recombinantes, l'rIL-10 était relativement bien tolérée et l'injection sous-cutanée de l'rIL-10 permettait une nette amélioration clinique des lésions psoriasiques (Mollazadeh, Cicero et al. 2019). Les divers essais cliniques qui ont suivi ont été plutôt décevants dans des maladies auto-immunes (diabète de type 1, sclérose en plaques, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis) avec des effets contradictoires et le plus souvent modestes (Saxena, Khosraviani et al. 2015). L'essai du blocage adverse des effets de l'IL-10 à l'aide d'anticorps dirigés contre la cytokine a également été développé. Ces études ont été entreprises pour renforcer la réponse immunitaire aux infections et améliorer les vaccins. Ainsi, la prévention de la suppression immunitaire ou le renversement du système immunitaire transitoire en bloquant l'IL-10 est un domaine d'étude émergent important (Mosser and Zhang 2008). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'arguments de poids pour envisager des thérapies pro- ou anti- IL-10 dans la PNS.

**Actuellement la PNS se situe à un tournant de sa thérapeutique grâce à l'arrivée de biothérapies (anti IgE, anti IL-5, anti IL-4/IL-13) dont les premiers résultats sont très prometteurs.**

**Les nouveaux enjeux thérapeutiques dans la PNS sont :**

- i) d'améliorer la délivrance des glucocorticoïdes locaux, traitement ayant fait preuve de son efficacité**
- ii) d'aider à l'essor des thérapies monoclonales en définissant de nouvelles cibles thérapeutiques et de trouver de nouvelles voies d'administration à cette thérapeutique, l'injection sous cutanée pouvant constituer un facteur limitant à son utilisation.**
- iii) rechercher des biomarqueurs pour l'identification phénotypique afin de guider la thérapeutique**

---

# Objectifs

---

### 3. Objectifs de la thèse

---

Les objectifs de cette thèse étaient de tenter de répondre à trois questions sur la physiopathologie de la PNS et d'en dégager les perspectives thérapeutiques :

- 1) Existe-t-il *ex vivo* une altération de l'efficacité du battement ciliaire dans la polypose naso-sinusienne pouvant entretenir le processus inflammatoire et diminuer l'efficacité de la barrière épithéliale contre les agressions extérieures ?
- 2) Quelle est l'influence *in vitro* des cytokines en particulier l'IL-6 sur les processus de réparation épithéliale après blessure en particulier la migration cellulaire, la prolifération et différenciation cellulaire épithéliale et le battement ciliaire?
- 3) Quelle est, au niveau de la cellule épithéliale, l'expression et la fonction *in vitro* du FcRn, le Récepteur néonatal pour le Fragment Constant (Fc) des Immunoglobulines de type IgG comme support potentiel de la diffusion locale des biothérapies ?

---

# Méthodes spécifiques à l'étude des cellules épithéliales

---

## 4. Méthodes spécifiques à l'étude des cellules épithéliales: choix, justifications, limites

---

### 4.1. Modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines en interface air-liquide

Pour ce travail de thèse, j'ai utilisé un modèle de culture primaires de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) en interface air-liquide (ALI). Ce modèle de culture a été mis au point et caractérisé dans notre équipe à la fin des années 90 par le Dr Escudier et le Pr Coste afin d'étudier le rôle de la cellule épithéliale dans la physiopathologie de la PNS. Le modèle a d'abord été développé et caractérisé dans l'unité INSERM U492 en s'appuyant sur des travaux de cultures cellulaires antérieurs basés sur des explants de trachées humaines obtenues au décours d'autopsies (Yamaya, Finkbeiner et al. 1992, Gruenert, Finkbeiner et al. 1995). Il a été ensuite caractérisé au laboratoire de l'U955 tant sur le plan morphologique que fonctionnel (mémoire de DEA de biologie et physiologie de la circulation et de la respiration Brugel L 1997; Papon JF 1998 ; Coste A; Prulière-Escabasse V, 2000). La nature épithéliale des cellules en culture a été confirmée par cytométrie en flux et par analyse de l'immunofluorescence de la cytokératine14 montrant 95% et 99% des cellules positives aux jours 3 et 7, respectivement. **Après une prolifération intense au cours de la première semaine, les cellules épithéliales atteignent leur stade différencié pendant les deuxième et troisième semaines de culture avec présence de cellules ciliées battantes et de cellules sécrétoires produisant du mucus à la surface des cultures (Coste, Brugel et al. 2000, Papon, Coste et al. 2002).**

Les cellules sont obtenues à partir de polypes, déchets opératoires récupérés au cours d'interventions chirurgicales à type d'ethmoïdectomies ou polypectomies. Après une phase de dissociation enzymatique, les cellules sont ensemencées sur filtres dans des puits recouverts de collagène de type IV (ensemencement de  $10^6$  cellules par puit) et placées en interface air/liquide au bout de 24H. Cette méthode de culture permet d'obtenir, après une phase de prolifération précoce (sur quelques jours), des cellules bien différenciées avec, dès la fin de la première semaine, la mise en place d'un épithélium polarisé, cilié et sécrétoire. Les cultures sont observées quotidiennement en microscopie optique, afin de vérifier la confluence cellulaire (J3-J4) puis la présence de cellules « battantes » témoignant d'une différenciation ciliée (dès la deuxième semaine). Des mesures de la résistance du tapis cellulaire et de la différence de potentiel transépithéliale sont réalisées régulièrement au moyen d'un microvoltmètre épithélial (EVOM<sup>®</sup>) afin de suivre la bonne cohésion et la polarisation des cellules en culture. Après un pic initial la première semaine ( $\sim 1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , la résistance électrique des cultures, se

stabilisait dès la deuxième semaine ( $\sim 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) confirmant la bonne étanchéité du tapis cellulaire et suggérant l'établissement de jonctions serrées.

Selon Gruenert et al., les modèles en ALI permettent d'obtenir une différenciation ciliée et sécrétoire très proche de celle observée *in vivo* (Gruenert, Finkbeiner et al. 1995). Il a été démontré que la différenciation morphologique ainsi que les propriétés fonctionnelles, tels que le transport des ions, sont similaires dans les cellules en culture de polypes nasaux ou de muqueuse trachéo-bronchique. D'autre part, au sein de notre unité, ce modèle de culture a été validé par les valeurs mesurées de transports trans-épithéliaux (différence de potentiel et résistance) qui sont très proches des valeurs physiologiques. Le modèle de culture primaire de CENH apparaît ainsi comme un meilleur modèle que les explants ou les lignées cellulaires pour étudier les mécanismes métaboliques et moléculaires sous-jacents à la fonction normale et pathologique des cellules épithéliales des voies respiratoires (Gruenert, Finkbeiner et al. 1995) ou pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliquant les cellules épithéliales des voies aériennes de conduction dans de nombreuses pathologies ou encore pour évaluer des agents toxiques ou pharmacologiques. Il s'agit donc d'un modèle de culture très bien adapté pour étudier le comportement de la cellule épithéliale en réponse à un facteur inflammatoire.

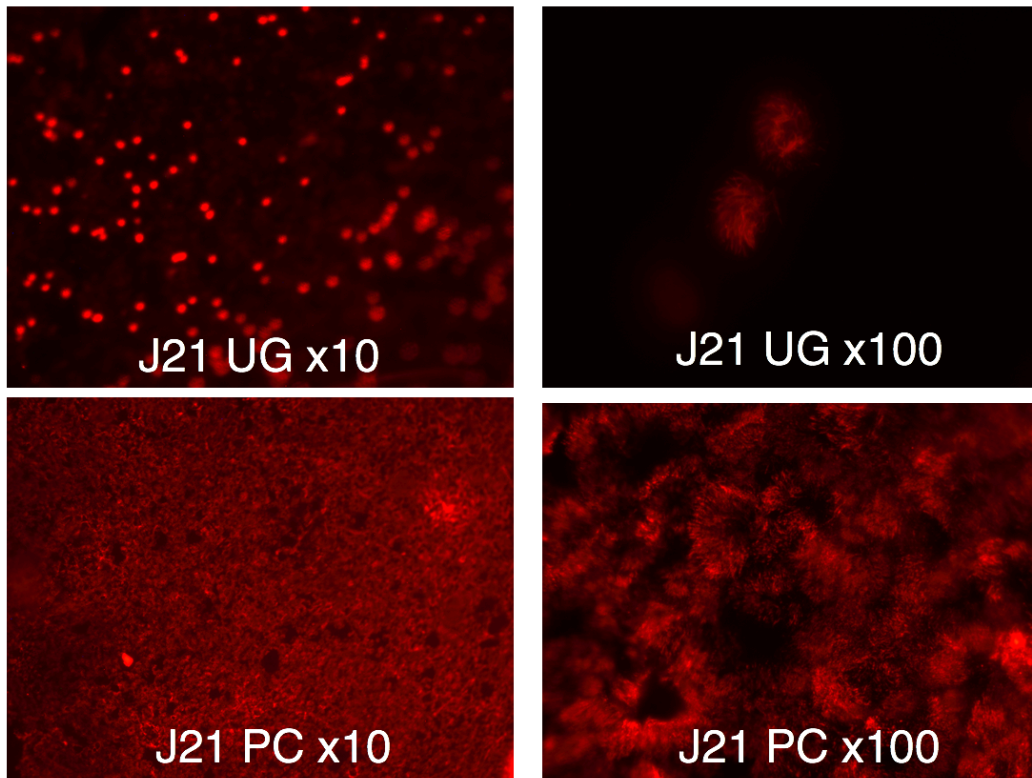
Dans notre équipe, ce modèle a servi en particulier à étudier les processus infectieux d'invasion cellulaire : Botterel et al. ont étudié ainsi le phénomène de phagocytose de l'*aspergillus fumigatus* par la cellule épithéliale et les modifications morphologiques et électrophysiologiques des cellules épithéliales nasales induites par ce champignon (Botterel, Cordonnier et al. 2002, Botterel, Gross et al. 2008). Ce modèle a permis également d'évaluer l'effet du TGF- $\beta 1$  sur l'expression et la fonction de CFTR dans des cultures de polypes et a montré que le TGF- $\beta 1$  régulait négativement l'expression du gène et de la protéine CFTR (Pruliere-Escabasse, Fanen et al. 2005). Plus récemment, ce modèle a servi dans notre équipe à une analyse protéomique différentielle des cellules épithéliales nasales provenant de patients atteints de mucoviscidose (Jeanson, Guerrero et al. 2014).

Pour cette thèse, les déchets opératoires étaient récupérés au cours d'interventions réalisées dans le Service d'ORL et de chirurgie cervico-faciale du Pr Coste à l'Hôpital Intercommunal de Créteil et du Pr Papon au Centre Hospitalo-Universitaire de Kremlin-Bicêtre. Les polypes des patients atteints de mucoviscidose ou de dyskinésie ciliaire primitive, ou les polypes de patients porteurs de surinfection patente n'ont pas été retenus pour ces travaux. Conformément à la législation, chaque patient a été informé avant l'intervention par le chirurgien ORL et n'a pas formulé d'opposition à l'utilisation de ces déchets opératoires pour la réalisation des cultures primaires de CENH. Plus d'une cinquantaine de cultures ont été réalisées pendant les 3 premières années de ma thèse selon le protocole mis en annexe 1.

**Mises au point personnelles: obtention de l'avis favorable du CPP et optimisation du modèle de culture**

Dès le commencement de ma thèse, pour se mettre en conformité avec la législation actuelle, j'ai demandé et obtenu l'accord du Comité de Protection des Personnes Ile de France X (cf en annexe 3) pour l'utilisation des prélèvements de tissus nasal non utilisés de polypes (déchets opératoires) à des fins de recherche (CPP IDF X 2016-01-01).

J'ai optimisé le modèle de culture en améliorant la différenciation épithéliale en utilisant le Pneumacult-ALI medium et caractérisé sur le plan immunohistochimique et électrophysiologique ces cultures différenciées.



**Figure 25 : Différenciation épithéliale obtenue *in vitro* après 3 semaines de cultures (J21) de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) dans le modèle de culture utilisé pour cette thèse**

Comparaison immunohistochimique de puits (issus d'un même patient) cultivés soit avec le milieu de culture « classique » en ultrosér G (UG) (2 images du haut au grossissement X10 à gauche et x100 à droite) soit avec le Pneumacult-ALI (PC) (2 images du bas au grossissement X10 à gauche et x100 à droite). L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti- $\beta$ IV tubulin (1/500) (Abcam ab-11315) permettait de caractériser les cils de l'épithélium respiratoire en rouge.

**Limites du modèle**

Les limites du modèle sont inhérentes au choix d'une culture primaire dépendant de la quantité de déchets opératoires récupérés et de la variabilité interindividuelle propre à chaque patient. Parfois un faible rendement était obtenu (moins d'une dizaine de puits) à partir des polypes récupérés au cours d'une intervention pouvant gêner la réalisation des expériences en triplicate avec plusieurs conditions de concentration d'ILs. Il n'a donc pas été possible par exemple de tester sur les mêmes cultures l'effet de plusieurs ILs (IL-5, IL-6, IL-9 et IL-10) et le même problème quantitatif s'est parfois posé pour

l'étude des effets-dose.

La différenciation ciliée peut ne pas être toujours présente au sein de la culture. Dans une récente revue de la littérature, l'équipe montpelliéraine de Vachier et al. (Gras, Petit et al. 2017) rapportait que la présence de cellules épithéliales ciliées battantes dans le prélèvement initial serait le seul paramètre associé au succès de l'obtention d'un épithélium pseudo stratifié bien différencié cilié après 28 jours de culture en ALI même si la culture nécessite une phase de redifférenciation avec une prolifération initiale à partir des cellules basales uniquement (Gras, Petit et al. 2017). Ainsi ce modèle de culture serait dépendant de la qualité du prélèvement initial. Cependant, grâce à l'utilisation du Pneumacult-ALI nous avons par contre toujours obtenu une différenciation ciliée au bout de 21 jours.

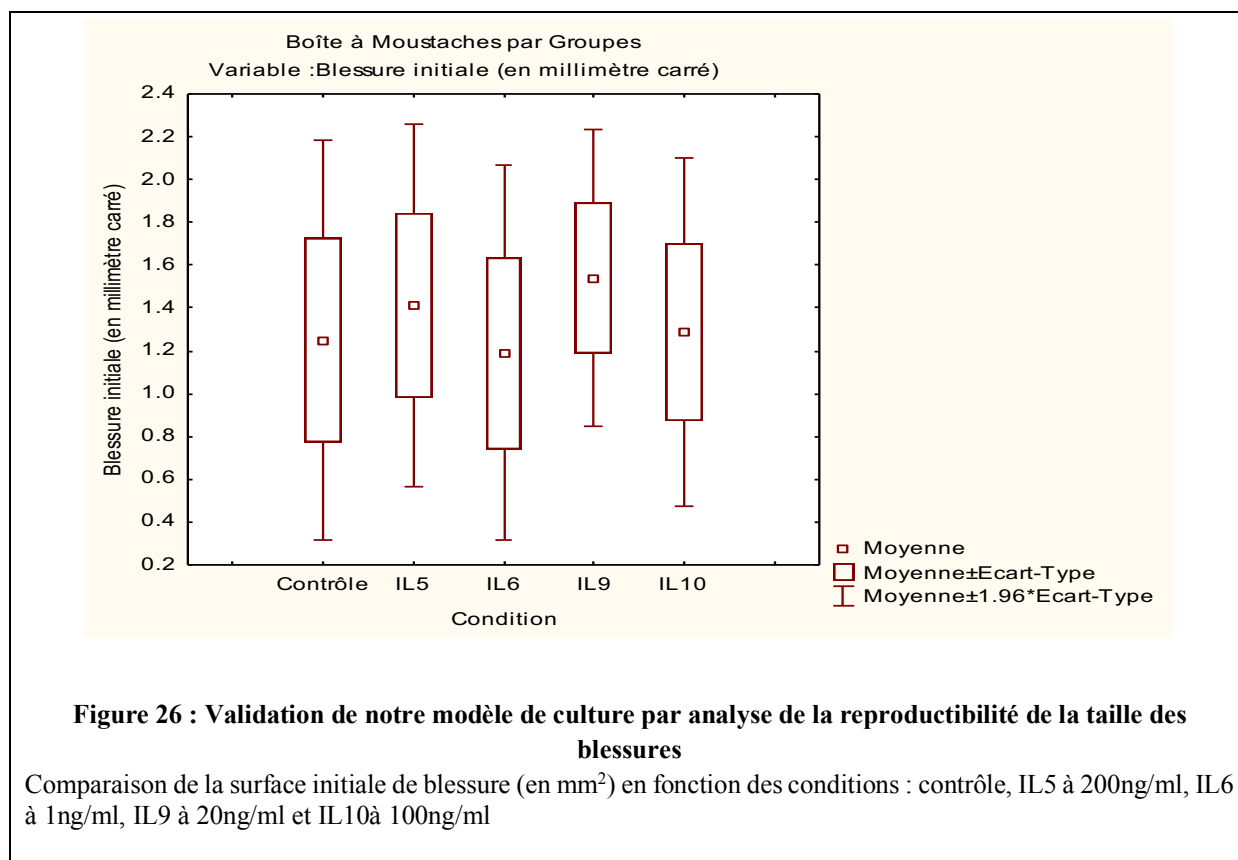
### 4.2. Modèle *in vitro* de blessure mécanique de l'épithélium

Pour évaluer le rôle de la cellule épithéliale dans le processus de réparation, de nombreux modèles de « blessure et réparation » *in vitro* de l'épithélium respiratoire utilisant généralement des cellules épithéliales humaines en culture primaire ou des lignées cellulaires ont été décrits ((Herard, Zahm et al. 1996) (Zahm, Kaplan et al. 1997, Dorscheid, Wojcik et al. 2001).

Nous avons développé au sein de notre unité au début des années 2000 un modèle de blessure *in vitro* de CENH en culture primaire (Advenier D. TGF-  $\beta$ 1 et réparation des cellules épithéliales dans la polypose naso-sinusienne. Mémoire de DEA de la physiologie de la circulation et de la respiration, 2000). L'agression choisie pour étudier les anomalies de la réparation épithéliale est la blessure mécanique. Elle était réalisée *in vitro* sur des CENH en ALI, à partir d'un modèle développé pour des pneumocytes de type II en culture (Kheradmand, Folkesson et al. 1994). Une blessure de la couche épithéliale était réalisée grâce à l'extrémité d'une pipette Pasteur en verre (FisherBrand, diamètre: 1mm). La pression exercée au niveau de la blessure était suffisante pour éliminer les cellules, sans altérer le filtre. Trois lavages successifs avec du milieu PBS-PSFG (1ml) étaient effectués afin d'éliminer d'éventuelles cellules persistant au niveau de la blessure. Le milieu sous l'insert (DMEM-F12-PFSG) était changé tous les jours jusqu'à fermeture de la blessure. Un précédent travail réalisé dans l'équipe avait montré, dans ce modèle de blessure, que la fermeture des blessures se faisait à vitesse constante pour s'achever entre 24 et 36 heures selon les cultures et que les cellules recouvrant la blessure exprimaient la cytokératine 14 (Advenier D. TGF-  $\beta$ 1 et réparation des cellules épithéliales dans la polypose naso-sinusienne. Mémoire de DEA de la physiologie de la circulation et de la respiration, 2000).

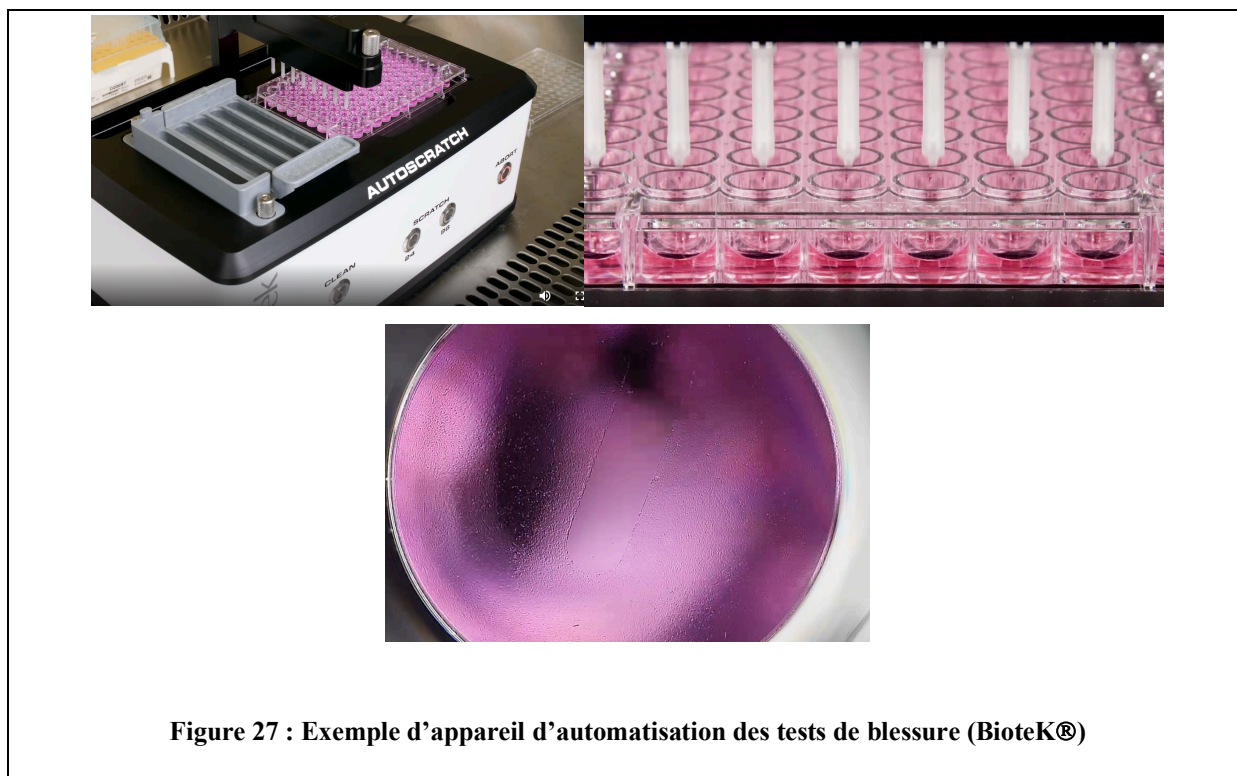
J'ai testé la validité de notre modèle en évaluant la reproductibilité de la taille de la blessure. L'évaluation de la reproductibilité de la taille des blessures réalisées manuellement a été faite par mesure de l'aire des blessures, à l'aide d'un logiciel informatique d'analyse d'image (ImageJ®). La surface des 102 blessures initiales (T0) a été évaluée. Il n'existait pas de différence significative entre la surface des

blessures initiales dans chaque groupe de puits blessés stimulés ou non par une IL ( $p=0.11$  ; Anova de Kruskal-Wallis) (cf. Figure 26)



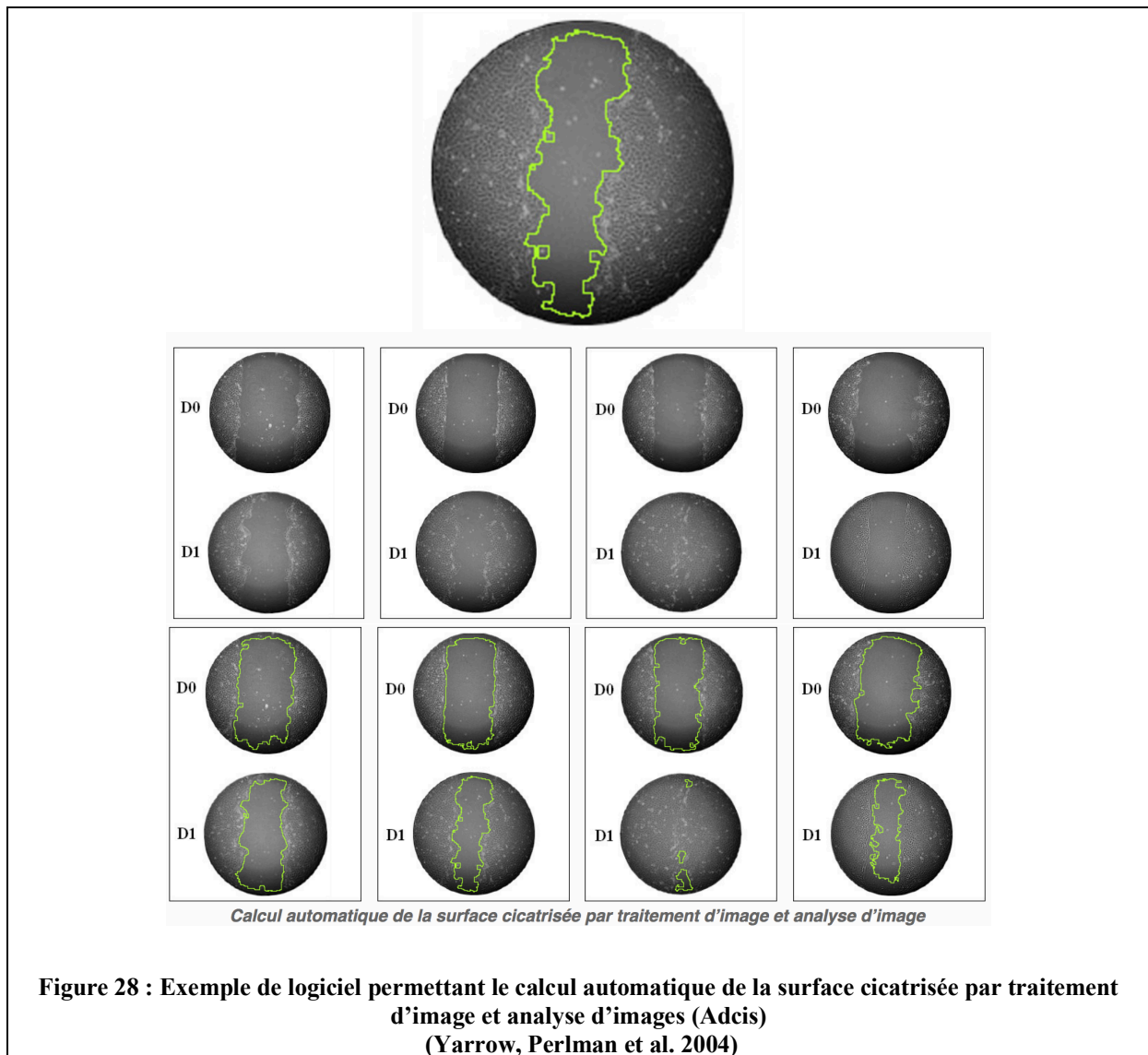
### Limites du modèle

Notre modèle de blessure épithéliale est donc un modèle éprouvé depuis près d'une vingtaine d'années avec une bonne reproductibilité des blessures réalisées manuellement. Cependant la réalisation automatique des blessures constituerait une optimisation indiscutable de ce modèle (cf. un exemple Figure 27)



Il sera également à l'avenir nécessaire d'améliorer la technique de mesure des blessures au fil du temps, car elle est pour l'instant chronophage et éventuellement source de biais de mesures.

ADCIS a par exemple développé un logiciel très innovant pour quantifier automatiquement la cicatrisation des plaies au fil du temps (cf. Figure 28). La quantification automatique par rapport à une méthode manuelle présente l'avantage de s'affranchir des artéfacts liés à l'opérateur. Dans cette application, la quantification est effectuée de manière efficace d'une manière plus précise, plus fiable et plus reproductible qu'une méthode manuelle (Ghazi, Deng-Pichon et al. 2012).



Dans cette thèse, nous avons choisi un protocole de blessure mécanique manuelle bien caractérisé pour évaluer la migration cellulaire afin d'appréhender la dysrégulation du phénomène de cicatrisation/réparation au cours de la PNS.

A l'avenir, la réalisation automatique des blessures à l'aide d'un outil spécifique permettrait de diminuer encore la variabilité de la taille des blessures, et l'analyse numérique automatisée de la taille des blessures évoluant au fil du temps pourrait apporter précision et gain de temps.

### 4.3. Outils d'analyse du battement ciliaire

En moins de 40 ans, les outils d'analyse du battement ciliaire ont beaucoup évolué. Dans le passé, diverses méthodes d'évaluations du transport muco-ciliaire ont été utilisées avant d'être abandonnées comme le test de la saccharine, (Canciani, Barlocco et al. 1988) consistant à déposer un peu de cette substance à l'entrée des cavités nasales et à mesurer le temps nécessaire à la perception du goût sucré. De manière similaire, il a été proposé de mesurer le temps de parcours de marqueurs (Schipper, Verhoef et al. 1991) comme des gouttes de colorants (van de Donk, van den Heuvel et al. 1982) ou encore des particules de charbon (Passali, Bellussi et al. 1984) entre l'entrée des voies aériennes et le rhinopharynx. Ces tests ont été abandonnés en pratique clinique dans la mesure où ils se sont révélés peu reproductibles, peu spécifiques et nécessitant une parfaite coopération du patient (immobilisation sur un long moment, absence de toux ou de reniflement,...). Par la suite, des techniques de suivi du transport de radio isotopes dans les cavités nasales des patients, albumine marquée ou <sup>99m</sup>Technicium, ont été proposés (Del Donno, Pavia et al. 1988, Munkholm, Nielsen et al. 2015). Malgré une bonne sensibilité (de l'ordre de 95%) pour le diagnostic de la DCP, une faible spécificité (55%) réduit l'intérêt de ces techniques pour le diagnostic, d'autant qu'elles impliquent une certaine lourdeur inhérente à l'utilisation de composés radioactifs (De Boeck, Proesmans et al. 2005). La caractérisation du battement reposait il y a quelques années encore quasi exclusivement sur la mesure de sa fréquence, normalement comprise entre 11 et 15 Hz à la température corporelle (Chilvers and O'Callaghan 2000).

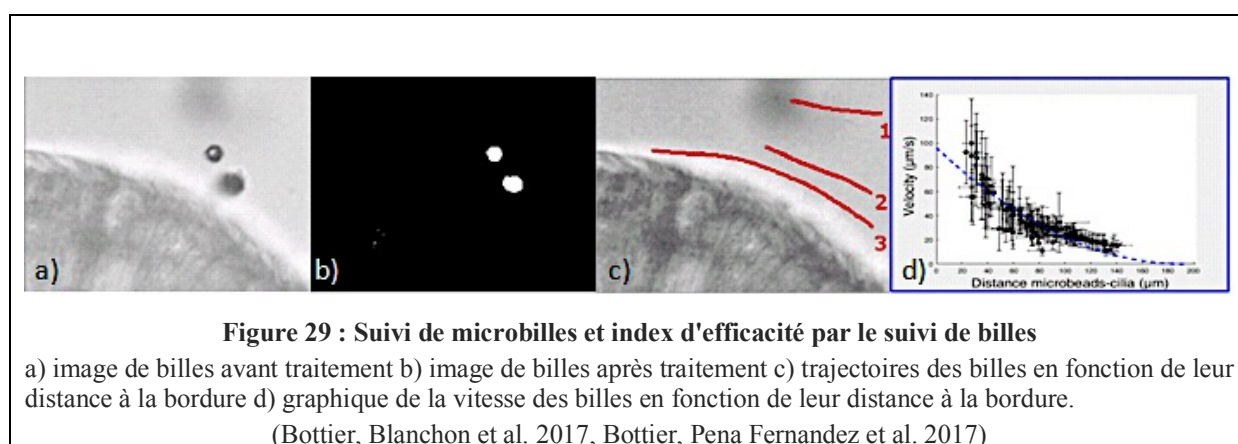
Le développement de la vidéomicroscopie numérique à haute vitesse (VMHV) qui permet de coupler la microscopie optique avec une caméra numérique à haute vitesse, utilisé pour la première fois en 1984 sur un épithélium de palais de grenouille (Dresdner and Wong 1984) a permis d'améliorer la caractérisation du battement ciliaire avec la possibilité d'avoir une description qualitative du battement. En 2000, Chilvers et al. (Chilvers and O'Callaghan 2000) ont montré l'intérêt de cette technique par rapport aux autres techniques classiques pour le diagnostic de la DCP. La VMHV est désormais couramment utilisée (Papon, Bassinet et al. 2012, Jackson, Behan et al. 2016). Au sein de notre unité de recherche, Papon et al. (Papon, Bassinet et al. 2012) ont décrit, l'intérêt clinique d'avoir une description quantitative du battement à partir de douze paramètres quantitatifs :

- longueur du cil
- angle de battement
- fréquence de battement ciliaire
- durée de la phase aller
- durée de la phase retour
- durée de pause entre phase aller et phase retour
- durée de pause entre phase retour et phase aller suivante
- durée de pause totale
- distance parcourue par la pointe du cil (correspond à l'amplitude du battement) par seconde

- aire couverte par le cil par seconde
- distance parcourue par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battants
- aire couverte par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battants

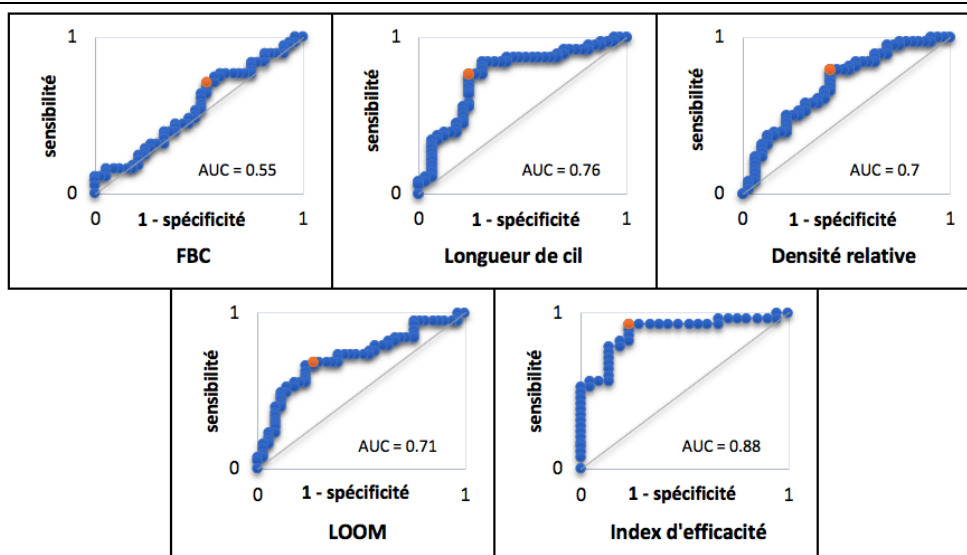
Papon et al. ont démontré que la distance parcourue par la pointe du cil par seconde pondérée par le pourcentage d'amas battants au sein d'un prélèvement était le meilleur paramètre pour discriminer des patients atteints de DCP et des patients contrôles avec une spécificité et une sensibilité proche de 95% (Papon, Bassinet et al. 2012).

Le développement de l'analyse quantitative par VMHV a été poursuivie par l'équipe avec la mise au point de nouveaux paramètres : la mesure de la longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM) ainsi que la caractérisation numérique de la densité relative des cils (Bottier, Blanchon et al. 2017, Bottier, Pena Fernandez et al. 2017). Néanmoins l'ensemble de ces paramètres ne donnant pas d'information sur l'efficacité globale du battement, notre équipe a développé un nouvel outil permettant d'évaluer l'efficacité du battement ciliaire *ex-vivo* par mesure de la contrainte de cisaillement par suivi de billes le long d'une bordure ciliée. La contrainte de cisaillement est la force tangentielle à la bordure par unité de surface exercée par les cils. Elle caractérise le transfert de force des cils vers le fluide utile au déplacement du fluide le long de la bordure. Elle peut donc être assimilée à un index d'efficacité du battement pour le déplacement du fluide contrairement à la fréquence seule (Bottier, Blanchon et al. 2017, Bottier, Pena Fernandez et al. 2017). Ces microbilles de polystyrène de 4,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Polybead© Microspheres, Polysciences, Inc.), ajoutées dans le milieu contenant les cellules ciliées sont des marqueurs de l'écoulement généré par le battement ciliaire. L'analyse du profil des vitesses des billes en fonction de la distance à la bordure ciliée (cf. Figure 29) permet de calculer la contrainte exercée par les cils sur le fluide. L'estimation de cet index est basée sur une modélisation 2D (modèle mathématique) de l'écoulement induit par les cils, développée au laboratoire et validée par l'expérience. L'ensemble du rationnel scientifique à ce travail est développé dans les publications de Mathieu Bottier (Bottier, Blanchon et al. 2017, Bottier, Pena Fernandez et al. 2017).



Pour caractériser le battement ciliaire dans la PNS dans ce travail de thèse, nous avons donc associé aux critères classiques d'analyse du battement ciliaire les paramètres les plus récents, soient : index d'efficacité, longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM), densité ciliaire et les paramètres plus classiques : le score semi-quantitatif d'évaluation de la mobilité ciliaire des amas cellulaires, la fréquence du battement ciliaire (FBC) et la longueur des cils. Ces paramètres sont étudiés grâce à un logiciel d'analyse semi-automatique StreamDV développé par l'équipe de recherche à partir de la plateforme Matlab. Le principe de mesure de ces paramètres est présenté en annexe 2 de cette thèse. Nous avons décidé de tenir compte de l'ensemble de ces paramètres, car la FBC, qui est le paramètre d'analyse le plus fréquemment utilisé actuellement, est manifestement insuffisant pour préjuger de l'efficacité du battement ciliaire. En effet, une fréquence conservée associée à une mauvaise coordination du battement ciliaire ne garantit pas une épuration efficace. De plus, une fréquence normale a déjà été observée dans certains cas de DCP et de RSC (Kozlov, Shilenkov et al. 2008, Dalrymple and Kenia 2019).

L'étudiante de Master 2 que j'ai co-encadré avec le Professeur Coste, Marion Renaud a testé la capacité de ces nouveaux outils d'analyse du battement ciliaire à discriminer un groupe porteur de « rhinosinusites chroniques » d'un groupe « contrôle ». Ce travail a démontré que l'index d'efficacité, présentait une sensibilité de 93% et une spécificité de 76% pour une valeur seuil de 0.34mPa avec une VPP de 84% et une VPP de 89%. L'AUC (Area Under the Curve) calculée d'après les courbes ROC était à 0.88 ce qui permet d'affirmer que l'index d'efficacité est un paramètre bien discriminant. A l'inverse, nous avons confirmé objectivement que la FBC semblait être le paramètre le moins discriminant avec une AUC de 0.55. Les autres paramètres, longueur de cil, densité ciliaire relative et LOOM se sont révélés également plus discriminants que la FBC sans être pour autant suffisants avec une AUC comprise entre 0.7 et 0.8. Les courbes ROC des différents paramètres d'analyse sont présentés dans la Figure 30.



**Figure 30 : Comparaison des différents paramètres d'analyse quantitative du battement ciliaire entre les groupes « rhinosinusites chroniques » et « contrôle »**

Le paramètre est discriminant lorsque l'AUC est supérieure à 0.7. L'index d'efficacité paraît être le paramètre le plus discriminant (AUC>0.8)

L'index d'efficacité apparaît donc comme un indice global de l'efficacité potentielle du battement ciliaire mais présente cependant quelques limites : il reste une extrapolation aux conditions *in vivo* et il reflète uniquement la force exercée par le cil indépendamment du mucus. Il ne décrit donc pas l'effet potentiel du mucus sur le battement ciliaire et ne reflète pas non plus, directement, la propulsion par les cils du mucus.

**En moins de 40 ans, les outils d'analyse du battement ciliaire ont beaucoup évolué. Notre équipe de recherche a participé à l'essor de la vidéomicroscopie à haute vitesse en définissant des nouveaux paramètres quantitatifs d'analyse. De plus l'équipe a récemment développé un nouvel outil d'analyse (suivi de microbilles le long de la bordure ciliée de l'épithélium) qui permet d'évaluer l'efficacité du battement ciliaire par mesure de la contrainte de cisaillement, c'est à dire la force par unité de surface exercée par les cils sur le fluide qui permet le déplacement de ce dernier.**

**L'étude de l'efficacité du battement ciliaire dans la PNS qui a été réalisée dans le cadre de cette thèse d'université est la première application clinique de ce nouvel outil d'analyse du battement ciliaire.**

---

# Travaux

---

## 5. Travaux

---

### 5.1. Caractérisation de l'efficacité du battement ciliaire dans la PNS

#### 5.1.1 Contexte et objectif du travail

L'épuration muco-ciliaire est un élément clé de la physiologie naso-sinusienne et pourtant elle reste actuellement très peu caractérisée dans la PNS. Une des hypothèses physiopathologiques de la PNS serait une altération de la clairance muco-ciliaire pouvant entretenir le processus inflammatoire et diminuer l'efficacité de la barrière épithéliale contre les agressions extérieures.

Dans ce premier travail, j'ai donc souhaité caractériser l'efficacité du battement ciliaire dans une cohorte de patients atteints de PNS avec un nouvel outil basé sur la vitesse des microbilles en tant que marqueur du flux généré par le battement ciliaire.

#### 5.1.2 Méthodes

**Pour répondre à cette question, nous avons analysé de manière prospective la fonction ciliaire *ex vivo* chez 45 patients atteints de PNS.** Pour cela, un brossage nasal a été réalisé de manière simultanée au niveau de polypes des cavités nasales (NP) et de la partie moyenne du cornet inférieur (IT) au cours de procédures chirurgicales pour une PNS et comparés à 10 brossages de patients témoins au niveau du cornet inférieur. Les bordures ciliées ont été analysées *ex vivo* par VMHV pour mesurer: la fréquence de battement ciliaire (FBC), la longueur ciliaire, la densité ciliaire relative, la longueur de l'onde métachrone et l'index d'efficacité de battement ciliaire. La mesure et l'analyse de ces paramètres sont détaillées en annexe 2.

#### 5.1.3 Principaux résultats

Ce travail a permis d'analyser de manière différentielle d'une part, la fonction ciliaire de la muqueuse des polypes et celle des cornets inférieurs des mêmes patients porteurs de PNS (Tableau 1), et d'autre part de la comparer à celles de muqueuses contrôles (Tableau 2). Chez les patients atteints de PNS, des amas de cellules ciliées battants ont été trouvés dans tous les brossages au niveau des polypes, et seulement dans deux tiers des cas au niveau des cornets inférieurs. Globalement, la densité ciliaire relative ne différait pas significativement des patients contrôles, mais la longueur d'onde métachrone et la longueur des cils étaient significativement diminuées (cf. Tableau 2). La FBC moyenne (6,7 Hz) était également significativement plus lente au niveau des cornets inférieurs par rapport aux polypes (8,4 Hz) et aux cornets contrôles (8,2 Hz) (cf. Tableau 2). L'index d'efficacité de battement ciliaire était

significativement diminué au niveau des polypes (0,38 mPa) et des cornets inférieurs (0,2 mPa) chez les patients atteints de PNS par rapport aux patients contrôles (0,87 mPa).

**Tableau 1: Comparaison pairée des paramètres *ex vivo* du battement ciliaire des cornets inférieurs et des polypes chez les mêmes patients présentant une PNS (Test de Wilcoxon)**

| Paramètres<br>(Moyenne +/- Ecart type)     | Cornets inférieurs<br>(patients avec PNS) | Polypes       | p            |
|--|---|---------------|--------------|
| FBC (Hz) (n=24)                            | 6.7 +/- 1.8                               | 8.6 +/- 2.3   | <b>0.005</b> |
| Densité relative des cils (%) (n=24)       | 61.1 +/- 9.8                              | 64.7 +/- 11.1 | 0.14         |
| LOOM ( $\mu\text{m}$ ) (n=23)              | 4.7 +/- 1.5                               | 7.1 +/- 2.9   | <b>0.012</b> |
| Longueur des cils ( $\mu\text{m}$ ) (n=24) | 6.2 +/- 0.8                               | 6.3 +/- 0.8   | 0.6          |
| Index d'efficacité (mPa) (n=11)            | 0.2 +/- 0.06                              | 0.4 +/- 0.1   | <b>0.004</b> |

**Tableau 2: Paramètres *Ex vivo* du battement ciliaire des cellules épithéliales provenant des cornets inférieurs (CI) et des polypes chez des patients porteurs de polypose naso-sinusienne (PNS) en comparaison aux brossage des cornets inférieurs des patients « contrôles » DS: Deviation standard ; CI: cornet inférieur**

| Paramètres:                                     | Patients avec<br>PNS   | Patients avec<br>PNS    | Patients<br>contrôles | Comparaison<br>CI (PNS) vs<br>Contrôles | Comparaison<br>Polypes vs<br>Contrôles |
|---|------------------------|-------------------------|-----------------------|---|--|
| (Moyenne +/- DS)                                | (CI)<br>(n=24)         | (Polypes)<br>(n=45)     | (CI)<br>(n=10)        | p                                       | p                                      |
| Fréquence du battement (Hz)                     | 6.7 +/- 1.8            | 8.4 +/- 2.5             | 8.2 +/- 1.2           | <b>0.02</b>                             | 0.9                                    |
| Densité ciliaire relative (%)                   | 61.1 +/- 9.8           | 64.1 +/- 10.4           | 68.2 +/- 9.3          | 0.08                                    | 0.33                                   |
| Longueur de l'onde métachrone ( $\mu\text{m}$ ) | 4.7 +/- 1.5            | 6.4 +/- 2.6             | 10.8 +/- 2            | <b>0.000006</b>                         | <b>0.00003</b>                         |
| Longueur du cil ( $\mu\text{m}$ )               | 6.2 +/- 0.8            | 6.2 +/- 0.9             | 7 +/- 0.7             | <b>0.008</b>                            | <b>0.02</b>                            |
| Index d'efficacité du battement (mPa) (n)       | 0.2 +/- 0.06<br>(n=11) | 0.38 +/- 0.14<br>(n=30) | 0.87 +/- 0.2          | <b>0.0001</b>                           | <b>0.000004</b>                        |

### 5.1.4 Discussion

Notre étude suggère que les paramètres classiques de l'analyse du battement ciliaire, tels que la FBC et la densité ciliaire sont préservés dans les polypes des patients atteints de PNS par rapport au groupe contrôle. Cependant, l'efficacité du battement ciliaire semble être altérée avec un manque de coordination (diminution de la longueur de l'onde métachrone). De plus, au niveau des cornets inférieurs des mêmes patients porteurs de PNS, nous rapportons une diminution des amas ciliés battants avec une diminution de la FBC. Une des conséquences physiopathologiques dans la PNS serait donc une altération de la clairance mucociliaire conduisant à la stase de mucus dans les fosses nasales et faisant le lit d'une inflammation persistante. Nos résultats corroborent l'hypothèse d'une dyskinésie ciliaire acquise chez des patients atteints de PNS pouvant participer au processus inflammatoire chronique.

#### Comment expliquer la diminution de l'efficacité du battement ciliaire dans la PNS ?

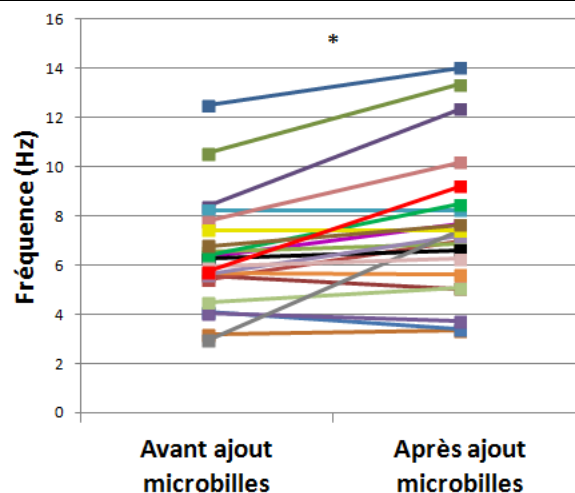
Dans le cas particulier de la physiopathologie de la PNS, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

- **Il pourrait y avoir des altérations de la structure des cils sans altération de leur fréquence de battement mais perturbant leur mécanique et donc leurs capacités de propulsion.** Li et al. (Li, Li et al. 2014) ont eux aussi constaté en microscopie électronique à balayage une ultrastructure anormale des cils (désordonnée, trop dense et allongée) au niveau de l'épithélium des polypes. Cependant nous avons retrouvé davantage de bordures ciliées sans battement au niveau des cornets inférieurs par rapport aux polypes des mêmes patients et également par rapport aux cornets inférieurs des sujets contrôles, amputant ainsi une partie importante de la surface de la muqueuse nasale fonctionnelle. Dans le même esprit, Kozlov et al. (Kozlov, Shilenkov et al. 2008) ont quant à eux trouvé une fréquence plutôt conservée au niveau des polypes ( $8,7 \pm 1,07$  Hz) versus le cornet inférieur ( $6,5 \pm 0,35$  Hz) chez 10 patients atteints de PNS.
- **Dans la PNS, les conditions locales pourraient entraîner une dysfonction de la modulation dynamique du battement ciliaire en réponse aux stimuli environnementaux.**

Le mécanisme physiologique observé au niveau de tout épithélium respiratoire est le battement continu et coordonné de la bordure ciliée. En cas de stress (comme par exemple, exercice physique, infection, ou fièvre) la fréquence du battement s'accélère pour améliorer la clairance du mucus (Cohen 2006). Ainsi la motilité du système cilié respiratoire peut être soumise à une modulation dynamique de manière physiologique en réponse à un stimuli exo- ou endogène correspondant à la réponse physiologique de défense de la cellule épithéliale. Dans les résultats de ce travail, la préservation de la fréquence du battement ciliaire des patients porteurs de

polypes par rapport aux sujets contrôles pourrait n'être qu'apparente. En effet, pour faire face à l'hypersécrétion de mucus observée au niveau des polypes (et peut-être aussi les éventuelles modifications des propriétés rhéologiques de ce mucus), le battement ciliaire pourrait s'accélérer. La disparité entre la fréquence de battement observée au niveau des polypes et au niveau des cornets inférieurs des mêmes patients pourrait s'expliquer par cette théorie.

Du point de vue mécanique, la présence de polypes qui se projettent dans la lumière nasale induit une augmentation de la contrainte de cisaillement générée à la surface de l'épithélium par le flux d'air. Ce phénomène a déjà été rapporté des maladies obstructives des voies respiratoires (Liu, Li et al. 2013). Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de la FBC et de l'indice d'efficacité du battement ciliaire au niveau des polypes par rapport au cornet inférieur des mêmes patients. Les variations du battement ciliaire au cours du cycle nasal peuvent étayer cette hypothèse. Le cycle nasal, caractérisé chez les sujets sains par des variations périodiques de la répartition du débit aérien entre chaque fosse nasale (droite/gauche), permet à chaque cavité nasale alternativement de se consacrer, principalement, au «conditionnement d'air» dans la fosse nasale décongestionnée ou à l'épuration du mucus dans la cavité nasale controlatérale congestionnée (White, Bartley et al. 2015). Ainsi, le transport mucociliaire est plus rapide dans la fosse nasale congestionnée où le tissu turbinal est de plus grand volume avec donc plus de contraintes de cisaillement à sa surface en lien avec le flux aérien. Les polypes pourraient ainsi créer des conditions mécaniques stimulant le battement à la surface de leur épithélium. Mathieu Bottier avait évalué l'influence des microbilles sur le battement (cf. Figure 31) en testant l'évolution de la fréquence de battement ciliaire avant et après ajout de microbilles.



**Figure 31 : Effet de l'ajout de microbilles sur la fréquence de battement ciliaire**

Chaque trait représente, par patient, l'évolution de la Fréquence de battement ciliaire avant et après ajout de microbilles. Le \* indique une différence significative ( $p < 0,05$ ). On voit donc ici que la présence des microbilles entraîne une augmentation significative de la FBC (travaux de thèse de Mathieu Bottier).

La FBC moyenne après le dépôt des billes était significativement ( $p = 0,003$ ) augmentée de 15% suggérant que les billes elles-mêmes pourraient générer une contrainte mécanique stimulant le battement ciliaire.

### **L'altération de l'efficacité du battement ciliaire dans la PNS serait-elle d'origine innée ou causée par le microenvironnement inflammatoire ?**

Une des hypothèses physiopathologiques de la PNS pourrait donc être une altération de l'épuration muco-ciliaire qui pourrait être soit innée soit acquise induite par l'environnement inflammatoire. Il existe actuellement peu de données dans la littérature sur l'impact des médiateurs de l'inflammation (IL 4, 5, 6, 9, 10 et 13) sur le battement ciliaire (Kato, Ohashi et al. 1998, Jiao, Duan et al. 2016). En effet, outre les mutations génétiques, l'inflammation des voies respiratoires et les infections pourraient avoir un impact sur la structure et la fonction des cils (Guan, Peng et al. 2018). Le rôle du microenvironnement inflammatoire sur la fonction ciliaire est une question importante à laquelle je souhaitais répondre en partie dans un autre travail de cette thèse.

### **Quelles sont les perspectives thérapeutiques suggérées par ces résultats?**

La PNS serait donc probablement une maladie acquise de l'épuration muco-ciliaire, confortant l'intérêt en thérapeutique de l'importance d'associer aux traitements des irrigations nasales afin d'améliorer le drainage mécanique du mucus. De plus, l'AMP-cyclique permet de réguler favorablement le battement ciliaire (Kogiso, Hosogi et al. 2018). L'utilisation de molécules thérapeutiques capables d'augmenter l'AMP-cyclique pourrait être intéressante pour améliorer le battement ciliaire.

**En conclusion, nous avons montré en utilisant un nouvel outil d'analyse de battement basé sur le suivi de microbilles dont le déplacement est induit par la force du cil exercée sur le fluide, que l'efficacité de battement ciliaire était altérée dans la PNS, tandis que les paramètres classiques (fréquence de battement ciliaire, densité ciliaire relative et longueur des cils) semblent préservés. L'hypothèse d'une altération acquise du battement ciliaire induite par les contraintes mécaniques générées par la présence des polypes, par les modifications quantitatives et qualitatives du mucus, et par les cytokines pro inflammatoires méritent des études complémentaires.**

## 5.1.5 Article soumis

Soumis à l'European Respiratory Journal depuis le 16/08/2019



**Ex vivo characterization of ciliary beating in chronic rhinosinusitis with nasal polyps**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | <i>European Respiratory Journal</i>   |
| Manuscript ID:                | ERJ-01602-2019  |
| Manuscript Type:              | Original Article  |
| Date Submitted by the Author: | 16-Aug-2019   |
| Complete List of Authors:     | BECAUD, Justine; Centre Hospitalier Intercommunal de Creteil, ENT; INSERM U955; CNRS, ERL7000; Université Paris-Est Creteil Val de Marne<br>RENAUD, Marion; Centre Hospitalier Intercommunal de Creteil; INSERM U955; Université Paris-Est Creteil Val de Marne; CNRS, ERL7000<br>ANGELY, Christelle; INSERM U955; Université Paris-Est Creteil Val de Marne; CNRS, ERL7000<br>Thomas, Lucie; INSERMU933<br>FILOCHE, Marcel; INSERM U955; CNRS, ERL7000; Université Paris-Est Creteil Val de Marne<br>Escudier, Estelle; Hopital Armand-Trousseau, Centre de Référence des Maladies Respiratoires Rares<br>Papon, Jean-Francois; NSERM, UMR_S955, Equipe 13,<br>COSTE, André; CHI Créteil, ORL<br>Louis, Bruno; INSERM, U955; Université Paris-Est Creteil, Faculte de Medecine, UMR_S955<br>Bequignon, Emilie; Hopital Henri Mondor, Otolaryngology; Institut Mondor de recherche biomédicale, ; Université Paris-Est Creteil Val de Marne Faculte de medecine; CNRS ERL7240   |
| Key Words:                    | nasal polyposis, mucociliary clearance, ciliary function, chronic sinusitis, (asthma with) chronic sinusitis, nasal polyps  |
| Abstract:                     | <p>Question: One pathophysiological hypothesis for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is an alteration of mucociliary clearance, a major defense mechanism of the respiratory airway system. Ciliary beating remains poorly characterized in CRSwNP. We aimed to characterize ciliary beating efficiency in a cohort of CRSwNP patients with a new tool based on microbead velocity as a marker of the flow generated by ciliary beating.</p> <p>Methods: Nasal brushings of nasal polyps (NP) and the middle part of the inferior turbinate (IT) were prospectively taken from 45 patients during surgical procedures for CRSwNP and compared to 10 nasal brushings from control patients (CP). The ciliated edges were analyzed ex vivo by digital high-speed video-microscopy to measure: ciliary beating frequency (CBF), ciliary length, relative ciliary density, metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index.</p> <p>Results: In patients with CRSwNP, beating ciliated cell clusters were found in all brushings from NPs versus only two-thirds in the IT. Overall, relative ciliary density was not significantly different from CPs but</p> |

|  |   |
|--|---|
|  | <p>metachronal wavelength and cilia length were significantly lower. Mean CBF (6.7Hz) was also significantly lower in the IT compared to NPs (8.4Hz) and CPs (8.2Hz). Ciliary beating efficiency index was significantly lower in the NPs (0.38mPa) and IT (0.2mPa) in CRSwNP patients compared to CPs (0.87mPa).</p> <p>Conclusion/Answer: Ciliary beating efficiency seems to be poorly coordinated in patients with CRSwNP. Our results support the hypothesis of acquired ciliary dyskinesia in CRSwNP patients that could participate in the chronic inflammatory process.</p> |
|  |   |

SCHOLARONE™  
Manuscripts

***Ex vivo* characterization of ciliary beating in chronic rhinosinusitis with nasal polyps**

Justine Bécaud<sup>1,2,3,4\*</sup> MD ; Marion Renaud<sup>1,2,3,4\*</sup> MD ; Christelle Angely<sup>2,3,4</sup> PhD ; Lucie Thomas<sup>5</sup> PhD ; Marcel Filoche<sup>2,3,4</sup> PhD ; Estelle Escudier<sup>5,6,7</sup> MD-PhD ; Jean-François Papon<sup>2,4,8,9</sup> MD-PhD ; André Coste<sup>1,2,3,4</sup> MD-PhD ; Bruno Louis<sup>2,3,4</sup> PhD; Émilie Béquignon<sup>1,2,3,4</sup>MD

1.AP-HP, Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, Créteil, 94010, France ;

2.INSERM, U955, Créteil, 94010, France ;

3.Université Paris-Est Créteil, Faculté de Médecine, Créteil, F-94010, France ;

4.CNRS, ERL 7000, Créteil, 94010, France ;

5.Inserm U933, Paris, France ;

6.Université Pierre et Marie Curie, Paris, France ;

7.AP-HP Hôpital Armand-Trousseau, Service de génétique et d'embryologie médicale, Paris, France ;

8.AP-HP, Hôpital Bicêtre, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, Le Kremlin-Bicêtre, 94270, France ;

9.Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, F-94275, France ;

\*These authors have contributed equally to this work

**Running head: Ciliary beating in nasal polyposis**

**Correspondence and requests for reprints should be addressed to:**

Dr Émilie Bequignon: INSERM U955 Équipe 13

Faculté de Médecine

8 rue du General Sarrail

94010 Créteil Cedex, France

Phone : + 33 1 49 81 24 91

Fax : + 33 1 49 81 24 23

E-mail : [emilie.bequignon@gmail.com](mailto:emilie.bequignon@gmail.com)

### **Abstract**

**Question:** One pathophysiological hypothesis for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is an alteration of mucociliary clearance, a major defense mechanism of the respiratory airway system. Ciliary beating remains poorly characterized in CRSwNP. We aimed to characterize ciliary beating efficiency in CRSwNP with a new tool based on microbead velocity as a marker of the flow generated by ciliary beating.

**Methods:** Nasal brushings of nasal polyps (NP) and the middle part of the inferior turbinate (IT) were prospectively taken from 45 patients during surgical procedures for CRSwNP and compared to 10 nasal brushings from control patients (CP). The ciliated edges were analyzed *ex vivo* by digital high-speed video-microscopy to measure: ciliary beating frequency (CBF), ciliary length, relative ciliary density, metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index.

**Results:** In patients with CRSwNP, beating ciliated cell clusters were found in all brushings from NPs versus only two-thirds in the IT. Overall, relative ciliary density was not significantly different from CPs but metachronal wavelength and cilia length were significantly lower. Mean CBF (6.7Hz) was also significantly lower in the IT compared to NPs (8.4Hz) and CPs (8.2Hz). Ciliary beating efficiency index was significantly lower in the NPs (0.38mPa) and IT (0.2mPa) in CRSwNP patients compared to CPs (0.87mPa).

**Conclusion/Answer:** Ciliary beating efficiency seems to be poorly coordinated in patients with CRSwNP. Our results support the hypothesis of acquired ciliary dyskinesia in CRSwNP patients that could participate in the chronic inflammatory process.

### **Take Home message:**

Using a new tool of beating analysis based on microbead velocities, we showed that ciliary beating efficiency is decreased in CRSwNP, while classic parameters (ciliary beat frequency, relative ciliary density and cilia length) are preserved in nasal polyps.

**Abbreviations :**

*AERD: aspirin exacerbated respiratory disease*

*ALI: air-liquid interface*

*CBF: ciliary beating frequency*

*CP: control patients*

*CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps*

*IT: inferior turbinate*

*MBT: microbead tracking*

*NP: nasal polyps*

*PCD: primary ciliary dyskinesia*

### Introduction

Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is a common chronic inflammatory disease, affecting 4% of the population [1], characterized by exuberant hyperplastic inflammatory growth of nasal polyps (NP) into the sinonasal cavities. This inflammatory disease greatly affects quality of life as it is associated with year-round symptoms such as nasal obstruction, rhinorrhea, anosmia and facial pain or pressure. NPs are frequently associated with aspirin sensitivity and asthma, a condition known as Aspirin Exacerbate Respiratory Disease (AERD). The pathophysiology of this inflammatory disease remains poorly understood. Several etiological hypotheses have been formulated, such as the allergic hypothesis or the role of *Staphylococcus aureus* super antigens, but they do not explain all the mechanisms involved. One of the pathophysiological hypotheses of CRSwNP is that there is an alteration of nasal mucociliary clearance, a major defense mechanism of the respiratory airway system. Some *in vivo* studies evaluating mucociliary clearance by saccharine clearance time found that clearance times could be increased in patients with CRSwNP (>20 min) [2, 3]. However, this type of mucociliary clearance evaluation is subjective and is affected by the individual geometry of the nasal cavity which varies from patient to patient. Ciliary beating efficiency therefore remains poorly characterized to date in CRSwNP. In the literature, the only parameter used to characterize ciliary function is the ciliary beating frequency (CBF), but the results of *ex vivo* studies in CRSwNP are highly variable. Some studies have found that CBF stays relatively steady [2, 3] with values close to normal, while others have found an increase in CBF [4] compared to healthy populations. In contrast, a recent *in vitro* study of epithelial nasal cells (from NPs and the mucosa of healthy patients) in primary air-liquid interface (ALI) cultures, showed that CBF was significantly lower in ciliated edges from polyps [5]. The recent development of new investigative tools allows a more complete characterization of this ciliary function [6]. Alone, the CBF cannot provide information on the quality of the ciliary beating coordination and its overall efficiency. Other factors, such as ciliary density, the metachronal wavelength and the amplitude of cilia beating, can also explain a variation in efficiency [6].

The aim of this *ex vivo* study was to compare the ciliary beating efficiency of ciliated edges in patients with CRSwNP with control patients (CP) using a new ciliary function analysis tool based on microbead velocity as a marker of the flow generated by ciliary beating.

### Materials and methods

#### *Study population*

Consecutive patients undergoing an ethmoidectomy for CRSwNP under general anesthesia in our reference center were prospectively investigated for *ex vivo* ciliary function analysis. For each nasal side, the degree of nasal polyposis (NP grade) was evaluated at the beginning of surgery according to the Lildholdt [7] four-group classification:

- 1: polyps in the middle meatus that do not reach the inferior rim of the middle turbinate;
- 2: polyps in the middle meatus that do reach the inferior rim of the middle turbinate;
- 3: polyps in the nasal fossa that extend lower than the inferior rim of the middle turbinate
- 4: polyps filling up the nasal fossa

Patients undergoing endonasal surgery for septoplasty, mucocele or fungus ball were enrolled as CPs. Informed consent was obtained from all patients and the study was approved by the local Ethics Committee (CPP IDF X 2016-01-01 and CPP IDF VII 2019-A00973-54). For each patient, we collected the intrinsic and extrinsic factors that could modify ciliary beating: tobacco, asthma (according to the GINA definition of asthma [8]), respiratory allergies, corticosteroid treatment, aspirin intolerance, AERD (according to the definition by Navarro *et al.* [9]), and active sinonasal infection. CPs were non-smokers, non-asthmatic and had not received corticosteroids (either topical or systemic) the month before surgery. Mild intermittent allergic rhinitis outside the allergic season and without nasal symptomatology was not an exclusion criterion for CPs.

#### *Nasal epithelial cells*

To characterize ciliary beating in CRSwNP, nasal brushing was performed for each patient i) directly on NPs and ii) at the mucosal control location in the middle part of the inferior turbinate (IT) with a 2mm cytology brush (Laboratoires Gyneas, Goussainville, France). In CPs, nasal brushing was only performed on the IT, either on the least deviated and obstructive side for septoplasties or on the contralateral fossa of the pathology. Nasal brushings were always performed under general anesthesia before starting surgery, with a local preparation of the nasal fossa using cotton balls with lidocaine and naphazoline.

If the NPs were associated with purulent secretions, a bacteriological sample was taken with a sterile swab under endoscopy for analysis.

The cells were suspended in a survival medium (*DMEM-HAM-F12-Penicillin-Streptomycin-Fungizone-Gentamycin*), transported to the laboratory, and examined within 6 hours.

### *Digital high-speed video-microscopy*

All *ex vivo* ciliary function analyses were performed at controlled room temperature (20–25°C) in the laboratory. We used an inverted microscope in brightfield conditions associated with a  $\times 40$  objective and a  $\times 100$  objective. 20  $\mu\text{L}$  of 4.5  $\mu\text{m}$  polystyrene microbeads at a concentration of 0.125%w/v, were added to 80  $\mu\text{L}$  of survival medium containing beating ciliated cells in suspension, and placed between a microscope slide and a cover slide. Cilia movements were recorded with a digital camera (PixeLINK A741, Ottawa Canada) at a rate of 358 frames per second. Each movie was composed of 1,800 frames with a definition of  $256 \times 192$  pixels, each individual pixel being  $(0.32 \times 0.32) \mu\text{m}^2$  with a  $\times 40$  objective and  $(0.13 \times 0.13) \mu\text{m}^2$  with a  $\times 100$  objective. All areas containing intact undisrupted ciliated epithelial edges larger than 50  $\mu\text{m}$ , beating in the plane of the camera were recorded. As recommended, isolated ciliated cells were excluded. For each nasal brushing, the presence of cellular clusters (ciliated and non-ciliated) and of mobile cilia were first described and the percentage of beating ciliated edges determined for each patient. Briefly, after identifying 10 areas of cellular clusters, an epithelial edge with most of the cilia beating was scored 10; an edge with half of the cilia beating was scored 5, and an edge with the fewest cilia beating was scored 0. The percentage of beating ciliated edges was defined as the addition of the 10 scores (from 0 to 100). If the ciliated edge was mobile, we recorded the ciliated edge of 10 different cell clusters to analyze the CBF, the cilia length, the relative ciliary density, the metachronal wavelength, and the ciliary beating efficiency analysis. Cilia length was measured with a  $\times 100$  objective.

### *Evaluation of ciliary beating parameters and the ciliary beating efficiency index*

All parameters were studied using analysis software developed by our team from the Matlab platform. The CBF (in Hz) was obtained by the temporal analysis of the grey level by fast Fourier transformation. The relative ciliary density was assessed by comparing the grey level average of the background of the image with the grey level of the area containing cilia. Since ciliated areas are darker than the background, the higher the percentage, the higher the relative ciliary density. The metachronal wavelength (in  $\mu\text{m}$ ) was obtained by inferring the phase variation of the main beating frequency along the ciliated edge. This phase shift, which expresses the delay of a cilia in the cycle compared to the neighbouring cilia, creates a metachronal wave that participates in the movement of mucus. The length of the cilia (in  $\mu\text{m}$ ) is measured on the most rectilinear cilia for which the base, apical extremity and entire path are visible. Finally, microbead velocity was used as marker of the flow generated by the ciliary beating to evaluate the shear stress induced by cilia on the fluid (mean ciliary efficiency index (in mPa)). All parameters and measurement details of the microbead tracking (MBT) are available in Bottier's publication [6].

### *Statistical analysis*

Statistics were performed with a statistical software package (Statistica v7.1; Stat Soft, France). Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD).

Nonparametric Wilcoxon test was used for the comparison of quantitative paired parameters between NPs and IT from same patients. Fisher's test was used for the qualitative paired variables. The Kruskal-Wallis test was used to compare one parameter (the ciliary beating efficiency index) between the four nasal polyposis grade groups.

The qualitative parameters between patients with CRSwNP and CPs were analyzed using the Chi-squared test (unpaired data). The Mann-Whitney test for unpaired quantitative data was used to compare NPs or IT *vs* CPs and to compare the influence of intrinsic and extrinsic factors that could modify ciliary beating in NPs.

A p-value  $<0.05$  was considered as significant.

## Results

### *Epidemiologic characteristics*

Nasal brushings were obtained from 45 patients with CRSwNP and 10 CPs during endonasal surgery (Figure 1). The CRSwNP population included 26 men (57.8%) and 19 women (42.2%) with a mean age of 50.1±12.9 years. Tobacco addiction was present in 15.6% of patients with CRSwNP and respiratory allergy in 13.3%. No statistical difference was observed between patients with CRSwNP and CPs in terms of age, gender and respiratory allergy. Asthma was more frequent in patients with CRSwNP than in the CPs: 53.3% vs. 0%, p=0.002). The epidemiological characteristics of the study population and the nasal polyposis grade of the CRSwNP patients are reported in Table 1. An acute infection of the upper airways was present at the time of surgery in 11 patients with CRSwNP (24.4%). Bacteriological samples showed positive cultures with a single pathogen in six patients: two patients with methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; one with Group A streptococcus; one with *Streptococcus pneumoniae*; one with *Haemophilus influenzae*; and the last one with *Branhamella catarrhalis*.

### *Ciliary beating characteristics in patients with CRSwNP and in CPs with a ×40 objective microscopic analysis*

In patients with CRSwNP, cell clusters were observed in all nasal brushings from NPs and in 97.8% from the IT. Cell clusters and mobile cilia were present in all CPs. In CRSwNP, the presence of mobile cilia on cellular clusters was significantly lower on the IT (n=34, 77.3%) than on the NPs (n=45, 100%). The nasal brushing characteristics on microscopy are summarized in Table 2 and the flow chart is detailed in Figure 1.

### *Ciliary beating parameters in NP (n=45)*

In the 45 nasal brushings from NPs, the mean CBF was 8.4±2.5Hz, the mean relative ciliary density was 64.1±10.4%, the mean metachronal wavelength was 6.4±2.6µm and the mean cilia length 6.2±0.9µm. The mean ciliary efficiency index (that could be measured in 30 NPs) was 0.38±0.14mPa.

### *Comparison of ciliary beating parameters between the IT and NPs from the same patient (n=24)*

The ciliary beating of the nasal epithelial cells of the IT and NPs from the same patient was compared in 24 patients with analyzable edge films at both locations. The percentage of beating ciliated edges was significantly lower in the IT (32.5%) than in the NPs (61.4%). The comparison is detailed in Figure 2. The mean CBF was also significantly lower in epithelial cells from the IT compared to the NPs (6.7±

1.8 Hz vs 8.6 $\pm$ 2.3 Hz, respectively) as was the mean metachronal wave (4.7 $\pm$ 1.5 $\mu$ m vs 7.1 $\pm$ 2.9 $\mu$ m, respectively). Mean ciliary density and mean ciliary length were similar in the IT and NPs from the same patient: 61.1 $\pm$ 9.8 % and 6.2 $\pm$ 0.8  $\mu$ m in IT and 64.7 $\pm$ 11.1 % and 6.3 $\pm$ 0.8 $\mu$ m in NPs, respectively. Comparison of mean ciliary beating efficiency index between the NPs and IT could be performed in 11 patients, showing a significantly lower index in the IT (0.2 $\pm$ 0.06mPa) than in the NPs (0.4 $\pm$ 0.1mPa).

### *Influence of intrinsic and extrinsic factors on ciliary beating parameters in NPs in patients with CRSwNP*

None of the factors tested in our CRSwNP study population (allergy, tobacco, asthma and purulent secretion) had a significant impact on the results of ciliary beating parameters, except the presence of purulent secretion (p=0.03) which significantly decreased the metachronal wave (Table 3).

### *Influence of nasal polyposis grade on ciliary beating efficiency*

No significant difference was observed in the ciliary beating efficiency index of the IT and NPs according to the nasal polyposis grade. Neither did the nasal polyposis grade affect ciliary beat efficiency index in the IT or NPs.

### *Comparison of ciliary beating in CRSwNP patients and control patients*

Relative ciliary density was not significantly different between CRSwNP patients (or between the IT and NPs) and CPs. The metachronal wavelength was significantly lower in the NPs of CRSwNP patients (both in the NPs and IT of patients with CRSwNP) when compared to CPs (Table 4). The CBF in the NPs (n=45) of CRSwNP patients was similar to that measured in CPs (8.4 $\pm$ 2.5Hz vs 8.2 $\pm$ 1.2Hz), while it was significantly lower in the IT of CRSwNP patients (6.7 $\pm$ 1.8Hz). Cilia length was significantly shorter in CRSwNP patients compared with CPs (Table 4). The ciliary beating efficiency index was significantly lower both in the NPs (0.38mPa $\pm$ 0.1mPa) and in IT (0.2 $\pm$ 0.06mPa) compared with CPs (0.87 $\pm$ 0.2mPa) (Table 4).

### Discussion

#### *Summary of main results*

This *ex vivo* analysis of new ciliary beating parameters based on microbead velocities showed for the first time that the ciliary beating efficiency index and metachronal wavelength are lower both in the IT and NPs in patients with CRSwNP. The study showed intact beating ciliated cell clusters in the NPs of patients with CRSwNP with a preserved CBF and relative ciliary density when compared to CPs. Contrary to NPs, beating ciliated cell clusters were found in only two-thirds of IT brushings in the same patients. In the IT, relative ciliary density was also preserved but CBF was significantly lower than in NPs or CPs. Cilia length was shorter both in NPs and in the IT of patients with CRSwNP compared with CPs.

#### *Interpretation of findings*

This *ex vivo* characterization in high-speed videomicroscopy of the classic ciliary beating parameters in patients with CRSwNP and CPs is consistent with the literature data. Taking into account that temperature induces variations in CBF with a linear CBF decrease between 37°C (CBF = 14.1Hz) and 25°C (CBF = 9.5Hz) [10], the CBF observed in NPs in our study of 8.4Hz at 25°C (equivalent to 12.4Hz at 37°C) was similar to the data of Kozlov *et al.* [2] and Slater *et al.* [3]. The CBF in the NPs was similar to the CBF of the CPs and to the data of the literature [11]. This suggests, therefore, that CBF alone is insufficient to fully characterize ciliary beating. Similarly, CBF may be low, normal or high in primary ciliary dyskinesia (PCD) depending on the genotype, prompting the European Respiratory Society to recommend assessing ciliary beat patterns to diagnose PCD [12]. The mean cilia length values in the NPs and IT of the CRwNP population were significantly shorter to those of our CPs but remained within the range values of healthy patients (5.2-7.7  $\mu\text{m}$ ) as reported by Papon *et al.* [13]. Mean relative ciliary densities in the CRSwNP patients and CPs were similar and in the same order of magnitude as found by Bottier *et al.* [6]. The metachronal wave values in our CPs were also similar to the data from Bottier *et al.* [6] and to the relatively few values reported in the literature in animal models (frog oesophagus [14] or rabbit trachea [15]), but were lower in our CRSwNP patients. Altogether, these results suggest that, while there is no reduction in the number of cilia in CRSwNP, there is a lack of coordination. Nevertheless, like CBF, cilia length and the two new parameters (relative ciliary density and metachronal wave) are insufficient to evaluate mucociliary transport efficiency.

#### *Strengths and limitations of the current study*

The major strength of this study is that we used a new tool of ciliary beating analysis, microbead tracking analysis developed by Bottier *et al.* [6], to better understand the physiopathology of CRSwNP. The

current study constitutes the first clinical application of this technique. To date, mucociliary clearance has mostly been studied *in vivo* by saccharine clearance time or rhinoscintigraphy. These two approaches have limitations: on one hand, saccharine clearance time lacks precision, and on the other rhinoscintigraphy is affected by the individual geometry of the nasal cavity, which varies from patient to patient, and is only available in some hospitals [16]. Some studies have shown that the saccharine clearance time is longer in CRSwNP [2, 3]. Contrary to saccharine test to evaluate the mucociliary clearance, the ciliary beating efficiency index that we used in our study gives the shear stress, i.e., the force per unit area allowing the fluid induced by the ciliated epithelium to move. This index, despite the extrapolation to *in vivo* conditions, appears as a global index of the potential efficiency of ciliary beating [6]. It reflects ciliary beating alone without being affected by mucus properties and does not describe the effect of the mucus on ciliary beating. In our study, the low ciliary beating efficiency index observed in the IT and NPs when compared to CPs supports the hypothesis of an alteration of mucociliary clearance in CRSwNP, independent of potential alterations in mucus composition and viscoelastic properties but directly linked to the forces of propulsion of cilia beating.

### *Implications for practice and future research*

To pinpoint the exact reason for the loss of cilia beating efficiency in NPs is difficult. We could argue that CRSwNP induces an abnormal cilia architecture without alteration of CBF. Li et al.[5] showed by scanning electron microscopy that abnormal cilia architecture (untidy, overly dense and lengthened) was commonly found on NPs. Apart from genetic mutations, airway inflammation and infections could have an impact on cilia [17]. In the same way in CRSwNP, chronic mucosal inflammation and inappropriate response to injury of the nasal epithelium lead to abnormal epithelial remodeling and to aberrant epithelial damage (hyperplasia or squamous metaplasia). However, the underlying mechanism remains poorly understood and several hypotheses have been formulated such as the allergic hypothesis or the role of *Staphylococcus aureus* super antigens [18]. Furthermore, several inflammatory cytokines have been implicated in the development of airway mucociliary dysfunction such as IFN- $\gamma$ , IL-13, and IL-17 which modify ciliary differentiation [19].

Another point may be the potential modification of cilia beating induced by variations in nasal shear stress, a pathophysiological manifestation characteristic of airway obstructive diseases [20]. The nasal cycle, characterized in healthy patients by recurrent variations in air mass-flow partitioning between each airway, enables each passageway to alternatively take turns in either predominantly undertaking the “air-conditioning” in decongested nasal fossa or mucus clearance in contralateral congested nasal fossa [21]. In patients with a healthy nasal cycle, mucociliary transport is faster in the congested airways. From the mechanical point of view the presence of polyps clearly induces, at least at the level of the polyps, an increase in the shear stress generated on the epithelium surface by the airflow. This hypothesis

could explain the increased CBF and the nearly 2-fold higher ciliary beat efficiency index in NPs compared to the IT from same patients; the shear stress probably being higher at the NP level.

In addition, surprisingly, there are more ciliated edges with no beating in the IT compared to NPs and also compared to CPs, thus amputating a significant part of the surface of the functional nasal mucosa. Along the same lines, Kozlov *et al.* [2], found no functional cilia in IT brushings in 10 patients with CRSwNP. Such findings are in agreement with a lower ciliary beat efficiency index. However, the reason for the alteration of ciliary beating in apparently normal epithelial mucosa of the IT in patients with CRSwNP remains to be explained.

### Conclusion

Our study suggests that the classic parameters of ciliary beating analysis such as CBF and cilia length are preserved in NP in patients with CRSwNP. However, ciliary beating efficiency seems to be altered and there is a lack of coordination. Moreover, we report a decrease in cilia differentiation and cilia beating in the IT of the same patients. Altogether, these results support the hypothesis of acquired ciliary dyskinesia in CRSwNP that could play a role in the chronic inflammatory process. Further studies are required to test the influence of pro-inflammatory cytokines directly on ciliary beating on ALI cultures of primary human nasal epithelial cells and to evaluate the correlation between stress and ciliary beating.

**Funding:** This work was supported in part by a grant overseen by the ENT French Society (SFORL) (Dr Becaud) and Strasbourg University Hospital (Dr Renaud)

**Acknowledgement:** We thank Mrs V. Fourrier for her assistance in samples analysis and in data acquisition. We thank Felicity Neilson for linguistic revision.

### Bibliography

1. Sharma R, Lakhani R, Rimmer J, Hopkins C. Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; : CD006990.
2. Kozlov VS, Shilenkov VV, Azatian AS, Kramnoï AI. [Mucociliary transport and motility of the ciliary system of the nasal mucosa in patients with chronic polypous rhinosinusitis]. *Vestn. Otorinolaringol.* 2008; : 10–13.
3. Slater A, Smallman LA, Logan AC, Drake-Lee AB. Mucociliary function in patients with nasal polyps. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1996; 21: 343–347.
4. Braverman I, Wright ED, Wang CG, Eidelman D, Frenkiel S. Human nasal ciliary-beat frequency in normal and chronic sinusitis subjects. *J Otolaryngol* 1998; 27: 145–152.
5. Li YY, Li CW, Chao SS, Yu FG, Yu XM, Liu J, Yan Y, Shen L, Gordon W, Shi L, Wang DY. Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps. *J Allergy Clin. Immunol.* 2014; 134: 1282–1292.
6. Bottier M, Blanchon S, Pelle G, Bequignon E, Isabey D, Coste A, Escudier E, Grotberg JB, Papon J-F, Filoche M, Louis B. A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part I, experimental analysis. *PLoS Comput. Biol.* 2017; 13: e1005605.

7. Lildholdt T, Rundercrantz H, Lindqvist N. Efficacy of topical corticosteroid powder for nasal polyps: a double-blind, placebo-controlled study of budesonide. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995; 20: 26–30.
8. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2019. Available from : [www.ginasthma.org](http://www.ginasthma.org).
9. Navarro AM, Delgado J, Muñoz-Cano RM, Dordal MT, Valero A, Quirce S. Allergic respiratory disease (ARD), setting forth the basics: proposals of an expert consensus report. *Clin Transl Allergy* [Internet] 2017 [cited 2019 Jun 27]; 7 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437581/>.
10. Green A, Smallman LA, Logan AC, Drake-Lee AB. The effect of temperature on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995; 20: 178–180.
11. Chilvers MA, O’Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000; 55: 314–317.
12. Dalrymple RA, Kenia P. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: a guideline review. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2018; .
13. Papon J-F, Bassinet L, Cariou-Patron G, Zerah-Lancner F, Vojtek A-M, Blanchon S, Crestani B, Amselem S, Coste A, Housset B, Escudier E, Louis B. Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7: 78.
14. Sleight MA, Blake JR, Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988; 137: 726–741.
15. Gheber L, Priel Z. Metachronal activity of cultured mucociliary epithelium under normal and stimulated conditions. *Cell Motil. Cytoskeleton* 1994; 28: 333–345.
16. Brondeel L, Sönstabö R, Clement P, van Ryckeghem W, van den Broek M. Value of the Tc99m particle test and the saccharin test in mucociliary examinations. *Rhinology* 1983; 21: 135–142.
17. Guan W-J, Peng Y, Zi X-X, Tan KS, He T-T, Zhong N-S, Wang DY. Motile Ciliary Disorders in Chronic Airway Inflammatory Diseases: Critical Target for Interventions. *Curr Allergy Asthma Rep* 2018; 18: 48.
18. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M, Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang DY, Wormald PJ. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol. Suppl.* 2012; 23: 3 p preceding table of contents, 1–298.
19. Jiao J, Duan S, Meng N, Li Y, Fan E, Zhang L. Role of IFN- $\gamma$ , IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin. Exp. Allergy* 2016; 46: 449–460.
20. Liu C, Li Q, Zhou X, Kolosov VP, Perelman JM. Cortactin mediates elevated shear stress-induced mucin hypersecretion via actin polymerization in human airway epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2013; 45: 2756–2763.
21. White DE, Bartley J, Nates RJ. Model demonstrates functional purpose of the nasal cycle. *Biomed Eng Online* 2015; 14: 38.

**Tables**

**Table 1: Epidemiological characteristics of the study population (N=55)**

| Characteristics                      | Patients with CRSwN<br>n=45 | Control patients<br>n=10 | P value |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------|
| Gender, n (%)                        |                             |                          | 0.31    |
| Male                                 | 26 (57.8)                   | 4 (40)                   |         |
| Female                               | 19 (42.2)                   | 6 (60)                   |         |
| Age, mean +/- SD                     | 50.1 +/- 12.9               | 52.2 +/- 15.5            | 0.46    |
| Tobacco, n (%)                       | 7 (15.6)                    | 0                        | 0.18    |
| Asthma, n (%)                        | 24 (53.3)                   | 0                        | 0.002   |
| Aspirin intolerance, n (%)           | 12 (26.7)                   | 1 (10)                   | 0.22    |
| AERD, n (%)                          | 10 (22.2)                   | 0                        | 0.08    |
| Respiratory allergy, n (%)           | 6 (13.3)                    | 1 (10)                   | 0.78    |
| Oral corticosteroids, n (%)          | 3 (6.7)                     | 0                        | 0.4     |
| Active upper airway infection, n (%) | 11 (24.4)                   | 0                        | 0.1     |
| Nasal polyps grading                 |                             |                          |         |
| - Grade I (n (right) / n (left))     | 3 / 3                       |                          |         |
| - Grade II                           | 7 / 5                       |                          |         |
| - Grade III                          | 22 / 23                     |                          |         |
| - Grade IV                           | 13 / 14                     |                          |         |

CRSwNP: Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps  
AERD: Aspirin-exacerbated respiratory disease

**Table 2: Comparison of microscopic (x40 objective) ciliary beating characteristics in nasal brushings of epithelial cells in the inferior turbinate and in nasal polyps in the same patients with CRSwNP (N=45)**

| Characteristics:                                | Inferior Turbinate<br>N=45 | Nasal Polyps<br>N=45 | P (Paired-test) |
|---|----------------------------|----------------------|-----------------|
| Presence of cellular clusters, n (%)            | 44 (97.8)                  | 45 (100)             | > 0.05          |
| -ciliated                                       | 34 (77.3)                  | 45 (100)             | 0.003           |
| Presence of mobile cilia, n (%)                 | 32 (72.7)                  | 45 (100)             | 0.0002          |
| Percentage of beating ciliated edges (%) (n=32) | 32.5 +/- 17.1              | 61.4 +/- 16.3        | 0.000004        |

CRSwNP: Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyp

**Table 3: Influence of intrinsic and extrinsic factors on ciliary beating parameters in nasal polyps in patients with CRSwNP (N=45)**

|   | Ciliary beat frequency | Relative density | Metachronal wave | Cilia length | Ciliary beating efficiency index |
|---|------------------------|------------------|------------------|--------------|----------------------------------|
| Allergy (Y=6/N=39)                          | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=3/N=27)                 |
| Tobacco (Y=7/N=38)                          | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=6/N=24)                 |
| Asthma (Y=24/N=21)                          | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=20/N=10)                |
| Aspirin intolerance (Y=13/N=32)             | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=10/N=20)                |
| AERD (Y=11/N=34)                            | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=10/N=20)                |
| Acute infection of upper airway (Y=10/N=35) | NS                     | NS               | 0.045            | NS           | NS<br>(Y=5/N=25)                 |
| Corticosteroid treatment (Y=3/N=42)         | NS                     | NS               | NS               | NS           | NS<br>(Y=2/N=28)                 |

NS = Not significant Y: Yes = number of CRSwNP patients with the studied factor); N: No = number of CRSwNP patients without the studied factor) CRSwNP: Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps AERD : Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease

**Table 4: *Ex vivo* parameters of cilia and ciliary beating of epithelial cells from inferior turbinate (IT) and nasal polyps (NP) in patients with CRSwNP compared to control patients (CP) CRSwNP: Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps DS: Deviation standard**

| Parameters (Mean +/- DS):                  | CRSwNP patients (IT) (n=24) | CRSwNP patients (NP) (n=45) | Control patients (n=10) | Comparison IT vs CP p-value | Comparison NP vs CP p-value |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Cilia beat frequency (Hz)                  | 6.7 +/- 1.8                 | 8.4 +/- 2.5                 | 8.2 +/- 1.2             | <b>0.02</b>                 | 0.9                         |
| Relative ciliary density (%)               | 61.1 +/- 9.8                | 64.1 +/- 10.4               | 68.2 +/- 9.3            | 0.08                        | 0.33                        |
| Metachronal wavelength (µm)                | 4.7 +/- 1.5                 | 6.4 +/- 2.6                 | 10.8 +/- 2              | <b>0.000006</b>             | <b>0.00003</b>              |
| Cilia length (µm)                          | 6.2 +/- 0.8                 | 6.2 +/- 0.9                 | 7 +/- 0.7               | <b>0.008</b>                | <b>0.02</b>                 |
| Ciliary beating efficiency index (mPa) (n) | 0.2 +/- 0.06 (n=11)         | 0.38 +/- 0.14 (n=30)        | 0.87 +/- 0.2            | <b>0.0001</b>               | <b>0.000004</b>             |

Figures

Figure 1 : Flow chart

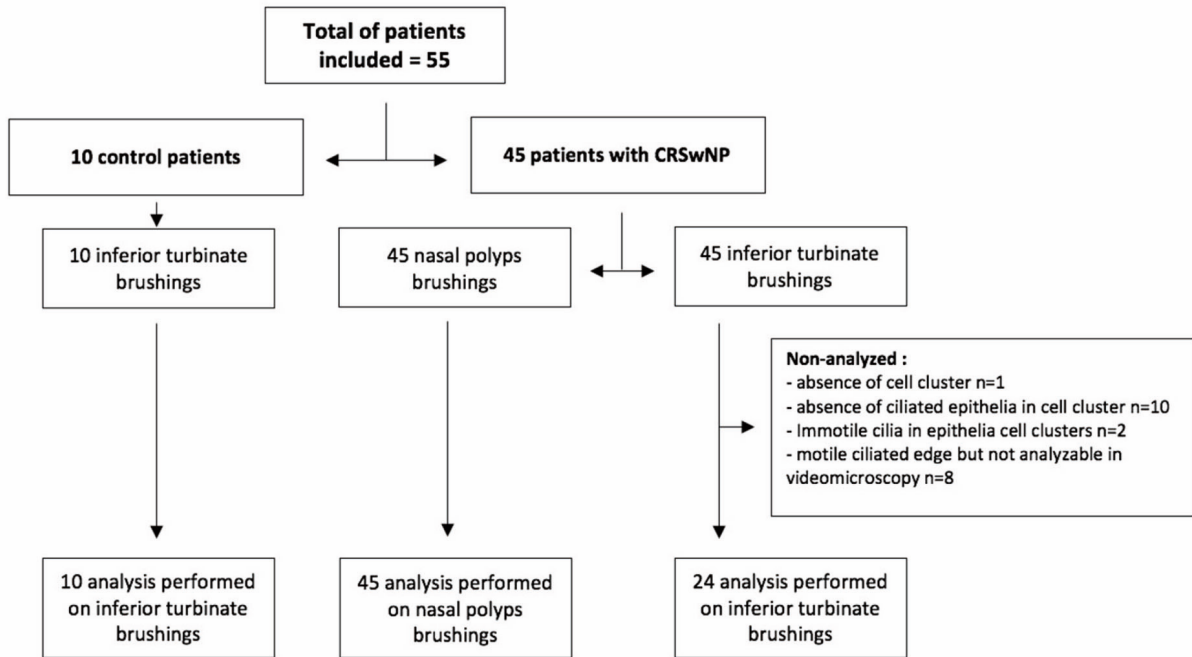
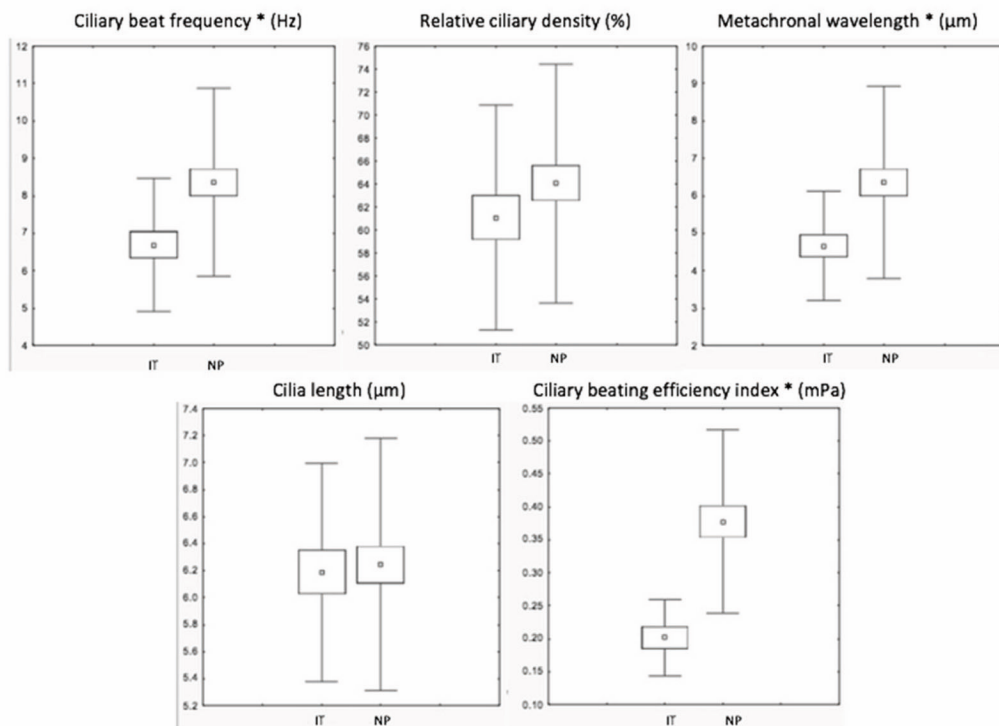


Figure 2: Characteristics of the cilia and ciliary beating parameters in inferior turbinate (IT) vs in nasal polyps (NP) in the same patients with CRSwNP (n=24 for all parameters except for the ciliary beating efficiency index, n=11). \* p<0.05



## 5.2. Influence des cytokines sur la réparation épithéliale et sur le battement ciliaire

### 5.2.1 Contexte et objectif du travail

Comme nous l'avons vu précédemment, le mécanisme initial de formation d'un polype pourrait être la perte de la continuité épithéliale secondaire à une agression. Deux réponses pathologiques peuvent être théoriquement observées : soit un défaut de réparation épithéliale, soit au contraire une hyperactivation de la réparation épithéliale pouvant aboutir à la croissance dysrégulée d'un épithélium ayant subi parallèlement un remodelage tissulaire avec l'apparition d'une fibrose associée et d'un infiltrat de cellules inflammatoires. Il semblerait que, dans le cas de la physiopathologie de la PNS, la 2<sup>ème</sup> réponse soit celle observée aboutissant à la formation exubérante des polypes (Watelet, Dogne et al. 2015). Une altération de l'efficacité du battement ciliaire pourrait être aussi en cause dans la pérennisation de l'inflammation. Comme exposé dans la partie mise au point, certaines cytokines ont été identifiées comme jouant un rôle prédominant dans la réaction inflammatoire dans la PNS comme IL4/IL13, IL-5 en induisant recrutement des PNE. Certaines interleukines ont une expression augmentée dans la PNS mais leur rôle est moins bien décrits c'est le cas de l'IL-9, IL-10 et IL-6. Les effets précis au niveau cellulaire des cytokines de type Th1 et Th2 sur la réparation épithéliale nasale restent encore mal connus à ce jour (Wise, Den Beste et al. 2013). Il me semblait donc logique d'intégrer dans ce travail des ILs provenant des deux profils inflammatoires présents dans la PNS, des ILs produites par les lymphocytes Th2 mais également des ILs produites par les lymphocytes Th1 car même si le profil Th1 n'est pas majoritaire dans les populations caucasiennes atteints de PNS, les interleukines pro-Th1 pourraient être impliquées dans le remodelage tissulaire et dans la dysrégulation épithéliale (Weathington, van Houwelingen et al. 2006). **Nous avons retenu deux interleukines appartenant au profil de réponse inflammatoire type Th2 qui ont un rôle majeur dans l'activation de la voie éosinophilique, les interleukines IL-5 et IL-9. Nous avons ensuite sélectionné deux interleukines plutôt en rapport avec le profil de réponse inflammatoire Th1 dans la PNS : IL-6 et IL-10.** Comme nous l'avons vu, l'IL-6 aurait l'originalité d'être impliquée dans les 2 profils inflammatoires Th1 et Th2. En synthèse, le tableau suivant résume pour les cytokines choisies pour ce travail, leur rôle dans la réponse inflammatoire dans la PNS, leur effet attendu sur la réparation épithéliale et l'existence d'éventuelles thérapeutiques ciblant ces ILs:

## Travaux

|       | Rôle dans la PNS   | Rôle dans la réparation épithéliale   | Anticorps disponible            |
|-------|--|---|---------------------------------|
| IL-5  | Migration, prolifération et activation des PNE   | Pas d'effet dans une étude <i>in vitro</i> sur CENH   | Mepolizumab<br>Benralizumab     |
| IL-6  | Activation des lymphocytes T et B<br>Très peu étudié dans la PNS   | Non étudié sur CENH<br>Accélère la fermeture de blessure de cellules épithéliales biliaire et cornéennes<br><br><b><u>Effet attendu dans notre étude :</u></b><br>Augmentation de la réparation épithéliale   | Tocilizumab                     |
| IL-9  | Prolifération et survie des PNE<br>Très peu étudié dans la PNS   | Non étudié sur CENH<br>Augmente la prolifération de cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 et des cellules épithéliales de cancer colo-rectales RKO, transfectées par un lentivirus porteur d'IL-9<br>Crée une métaplasie mucipares sur cellules bronchiques<br><br><b><u>Effet attendu dans notre étude :</u></b><br>Augmentation de la réparation épithéliale et du nombre de cellules à mucus | Medi528 développé dans l'asthme |
| IL-10 | Taux corrélé au taux d'IL5, d'IL-13 et de l'interferon $\gamma$<br>Pourrait inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les lymphocytes Th1<br>Pourrait créer un environnement anti-inflammatoire permettant la survie de <i>S. aureus</i> en intra-cellulaire | Non étudié sur CENH<br>Diminue l'apoptose cellulaire<br>Accélère la fermeture de cellules épithéliales intestinales<br><b><u>Effet attendu dans notre étude:</u></b><br>augmentation de la réparation épithéliale   | Non disponible                  |

**Tableau récapitulatif du rôle, de chaque IL étudiée, dans la PNS, dans la réparation épithéliale et du traitement ciblant cette IL**

Notre hypothèse était, que parmi les cytokines impliquées dans la physiopathologie de la réponse inflammatoire dans la PNS, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-10 pourraient modifier les mécanismes de réparation épithéliale et l'épuration muco-ciliaire. Wise et al. ont évalué l'effet de l'IL-5 sur la cinétique de fermeture après blessure et ne retrouvait pas de différence avec les contrôles sur un modèle de culture de cellules épithéliales nasales *in vitro*. Nous l'avons choisi en raison de son importance clé dans la

boucle inflammatoire auto-entretenu de la PNS et, a priori, elle pouvait constituer notre contrôle négatif puisque il n'y a pas eu d'effet retrouvé sur la réparation épithéliale (Wise, Den Beste et al. 2013).

**L'objectif de ce travail était d'évaluer *in vitro* l'influence des cytokines IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 sur les processus de réparation épithéliale après blessure en particulier la migration cellulaire, la prolifération et différenciation cellulaire épithéliale et le battement ciliaire.**

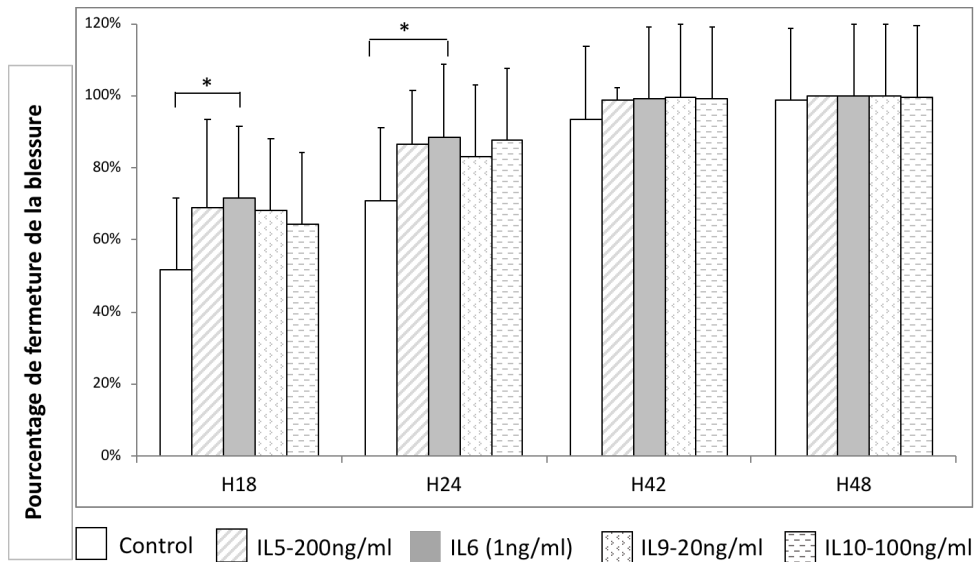
### 5.2.2 Méthodes

Pour répondre à cet objectif, des cultures primaires de CENH issus de polypes provenant de 38 patients au cours d'interventions chirurgicales pour une PNS ont été utilisées dans un modèle *in vitro* de fermeture de blessure pour étudier la réparation épithéliale (migration/différenciation/prolifération) et la fonction ciliaire. Les effets de concentrations croissantes d'IL-6 (1 ng/mL, 10 ng/mL et 100 ng/mL) et d'autres ILs (IL-5 (200ng/ml), IL-9 (20ng/ml et IL-10 (100ng/ml)) sur la cinétique de fermeture de la blessure ont été comparés à des cultures sans modulation d'ILs. Après la fermeture de la blessure, le processus de différenciation a été caractérisé dans des conditions basales et après une supplémentation par chaque IL étudiée isolément en utilisant la cytokératine-14, MUC5AC et la tubuline  $\beta$ IV comme immunomarqueurs des cellules basales, muqueuses et ciliées, respectivement, à des stades de réparation précoce (2 jours après la fermeture de la blessure), intermédiaire (7 jours après la fermeture de la blessure) et tardif (12 jours après la fermeture de la blessure). L'influence des ILs sur le processus de réparation cellulaire au sein de la blessure a été également étudié de façon comparative aux zones non blessées pour s'affranchir de l'effet des ILs sur l'épithélium sain (calcul du ratio de nombre de noyaux marqués au DAPI dans la zone blessée/nombre de noyaux dans la zone hors blessure). Enfin, les bordures ciliées des cultures primaires, modulées ou non par l'IL-6, ont été analysées par VMHV pour mesurer: la FBC, la longueur ciliaire, la densité ciliaire relative, la longueur d'onde de l'onde métachrone et l'index d'efficacité de battement ciliaire par analyse du profil de vitesse de microbilles (dont le déplacement était induit par la bordure ciliée).

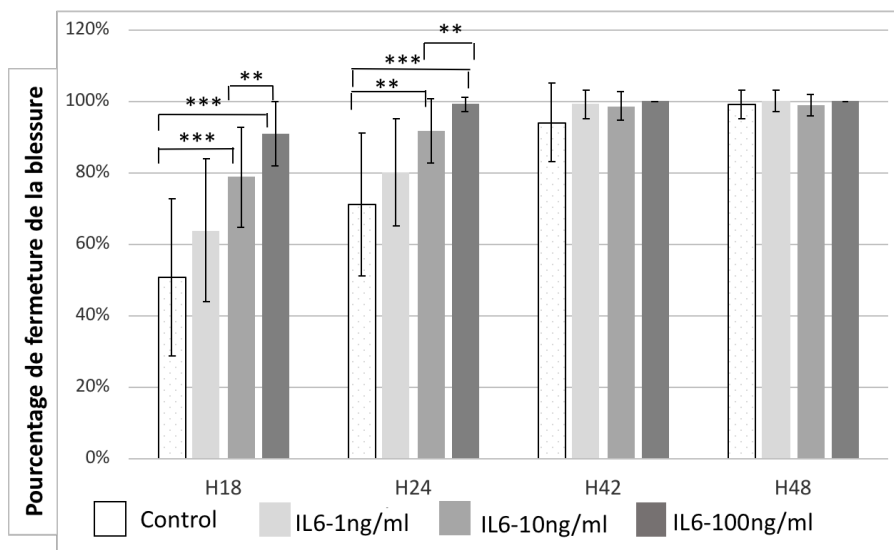
### 5.2.3 Principaux résultats

Dans ce travail, nous avons montré que l'IL-6 accélérât la réparation après blessure *in vitro* avec un effet dose-réponse, alors qu'aucun effet n'a été observé après stimulation par les autres IL testées. 24 heures après la blessure, 79% des puits blessés avec IL6-100 (n = 15/19) étaient complètement refermés, contre 46% dans le groupe IL6-10 (n = 10/22), contre 28% dans le groupe IL6-1 (n = 8/29) versus 15% dans le groupe témoin (n = 7/48) (cf. Figure 1 et 2).

**Figure 1 : Etude de l'effet des IL-5, -6, -9-10 sur la cinétique de fermeture des blessures**  
**Comparaison du pourcentage moyen de fermeture après blessure de cultures de CENH (n=11 patients) à intervalles réguliers entre les puits contrôles et ceux modulés par chaque interleukine isolément. \*=*p* value<0.05**

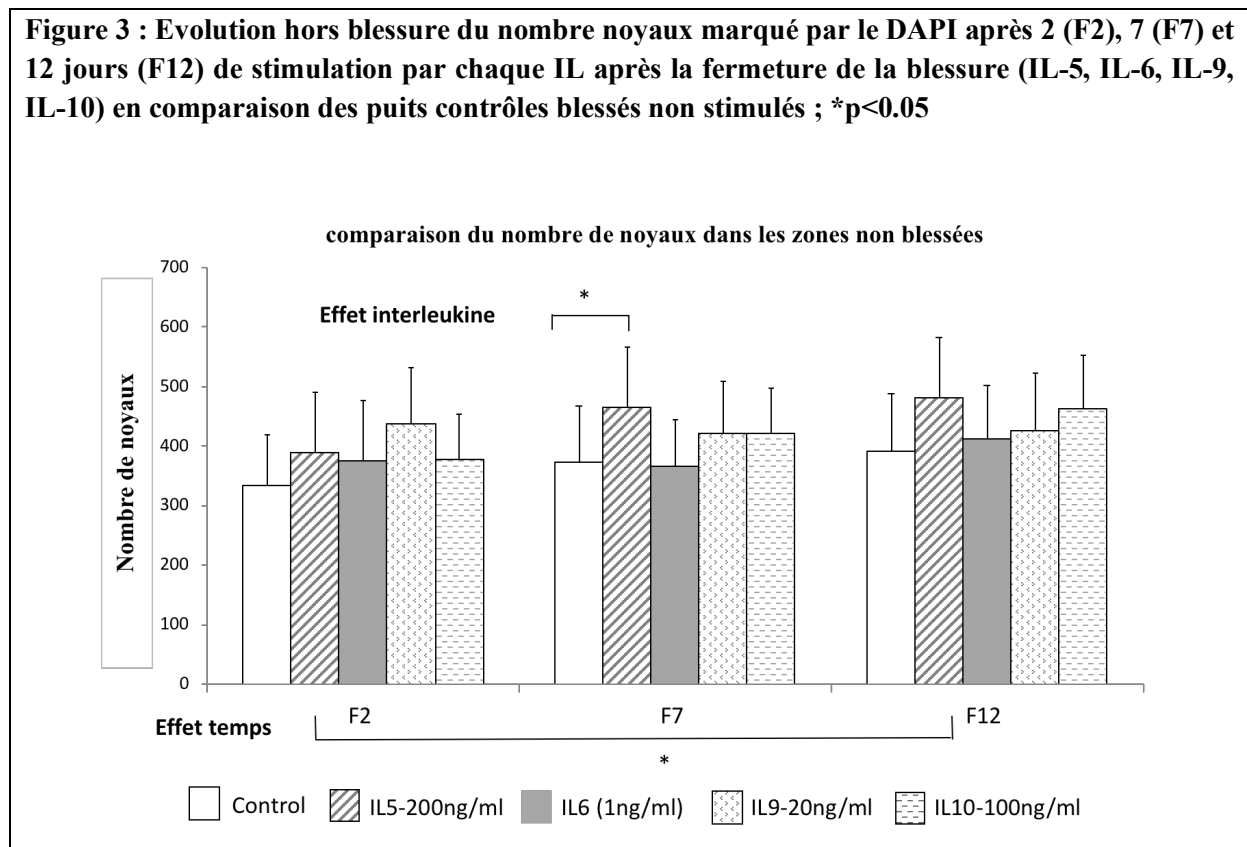


**Figure 2 : Étude de l'effet dose-réponse de l'IL6 sur la fermeture des blessures**  
**Comparaison du pourcentage moyen de réparation de la blessure de cultures de CENH (n=6 patients) à chaque intervalle entre les puits contrôles et chaque concentration en IL-6 testée: IL6-1, IL6-10; IL6-100 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml respectivement) \* = valeur *p* <0,05; \*\* = *p* <0,005; \*\*\* = *p* <0,0005**



Dans ce travail, nous avons analysé la différenciation et le nombre de cellules au sein des zones blessées et non blessées : nous avons comparé l'effet temporel au sein de chaque groupe IL. Dans les groupes stimulés par IL-6, IL-9 et IL-10, il n'y avait pas de différence significative entre les trois temps en fonction du nombre de noyaux, de la proportion de ciliée cellules, ou cellules caliciformes ou basales dans les zones non blessées. Dans le seul groupe stimulé par l'IL-5, nous avons constaté un effet temporel avec une augmentation significative du nombre moyen de noyaux entre le jour 2 et le jour 12 ( $481 \pm 59$  vs  $390 \pm 60$ ,  $p = 0,03$ ) et un effet de l'interleukine avec une augmentation significative de la cellularité au 7<sup>ème</sup> jour par rapport aux puits témoins sans IL (Cf. Figure 3).

**Figure 3 : Evolution hors blessure du nombre noyaux marqué par le DAPI après 2 (F2), 7 (F7) et 12 jours (F12) de stimulation par chaque IL après la fermeture de la blessure (IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) en comparaison des puits contrôles blessés non stimulés ; \* $p < 0.05$**



Nous avons ensuite analysé ces mécanismes au sein de la blessure. Dans les puits témoins sans IL, nous avons observé une réponse typique à l'agression épithéliale avec un processus d'augmentation de nombre de cellules et de différenciation entre le jour 2 et le jour 12. En comparant le jour 2 au jour 12, nous avons constaté une augmentation significative du nombre de noyaux ( $270 \pm 81$  vs  $327 \pm 93$ ,  $p = 0,01$ ), de la proportion de cellules ciliées ( $2 \pm 2\%$  vs  $20 \pm 3\%$ ,  $p < 0,00001$ ), de la proportion de cellules caliciformes ( $2 \pm 2\%$  contre  $11 \pm 3\%$ ,  $p < 0,00001$ ) et une diminution du nombre de cellules basales ( $26 \pm 5\%$  vs  $10 \pm 3\%$ ,  $p < 0,00001$ ). Nous n'avons pas retrouvé d'effet des IL-5, IL9, IL-10 sur la différenciation cellulaire et le nombre de noyaux par rapport aux puits contrôles sans IL (cf Figure 4).

Seul l'IL-6, à un stade de réparation tardif (12 jours après la fermeture de la blessure) a montré une différence significative du ratio du nombre de noyaux entre les puits modulés par IL6 et les puits contrôles (0,98 vs 0,86;  $p=0,02$ ) suggérant un rôle dans la prolifération épithéliale (cf. Figure 4B). A un stade de réparation intermédiaire (7 jours après la fermeture), l'IL-6 pourrait agir également sur la différenciation épithéliale car il existait une diminution significative du ratio de cellules à mucus entre les puits modulés par l'IL-6 et les puits « contrôles » non modulés par ILs (0,6 vs 0,75;  $p=0,01$ ) (cf. Figure 4D).

### **Figure 4 : Effet des IL sur la différenciation cellulaire après blessure**

Figure 4A: Schéma d'immuno-marquage réalisé dans les trois tiers différents de chaque puit (CK14 dans le tiers supérieur, MUC5AC dans le tiers intermédiaire et ATA dans le tiers inférieur) et méthode d'analyse:

Les effets des ILs sur la différenciation dans les cultures HNEC après fermeture de la plaie (2 (F2), 7 (F7) et 12 (F12) jours après la fermeture de la plaie) ont été caractérisés par immunomarquage: chaque puits a été séparé en trois zones pour chaque marqueur d'immunomarquage: soit avec anticorps monoclonal de souris anti-cytokératine 14 (CellMarque 314M-14, 1/100) (photo 4A-2) en tant que marqueur de cellules basales, anticorps monoclonal de souris anti-mucine-5AC (Abcam ab3649, 1/200) (image 3A-3) un marqueur de cellules à mucus ou un anticorps monoclonal de souris anti-acétylé (Abcam ab24610, 1/500) (figure 4A-4) en tant que marqueur de cellules ciliées, avant d'être révélé par un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 de chèvre (souris) 1/500). Les noyaux ont été colorés par DAPI.

Afin d'évaluer l'effet des ILs sur la blessure et de s'affranchir de leur effet sur l'épithélium sain, nous avons mesuré le ratio entre le nombre de noyaux colorés par DAPI ou le pourcentage de cellules positives pour chaque immunomarquage (ATA, MUC5AC et CK14) sur deux zones blessées et le nombre de noyaux colorés ou cellules positives dans deux zones contrôles non blessées correspondantes du même puit.

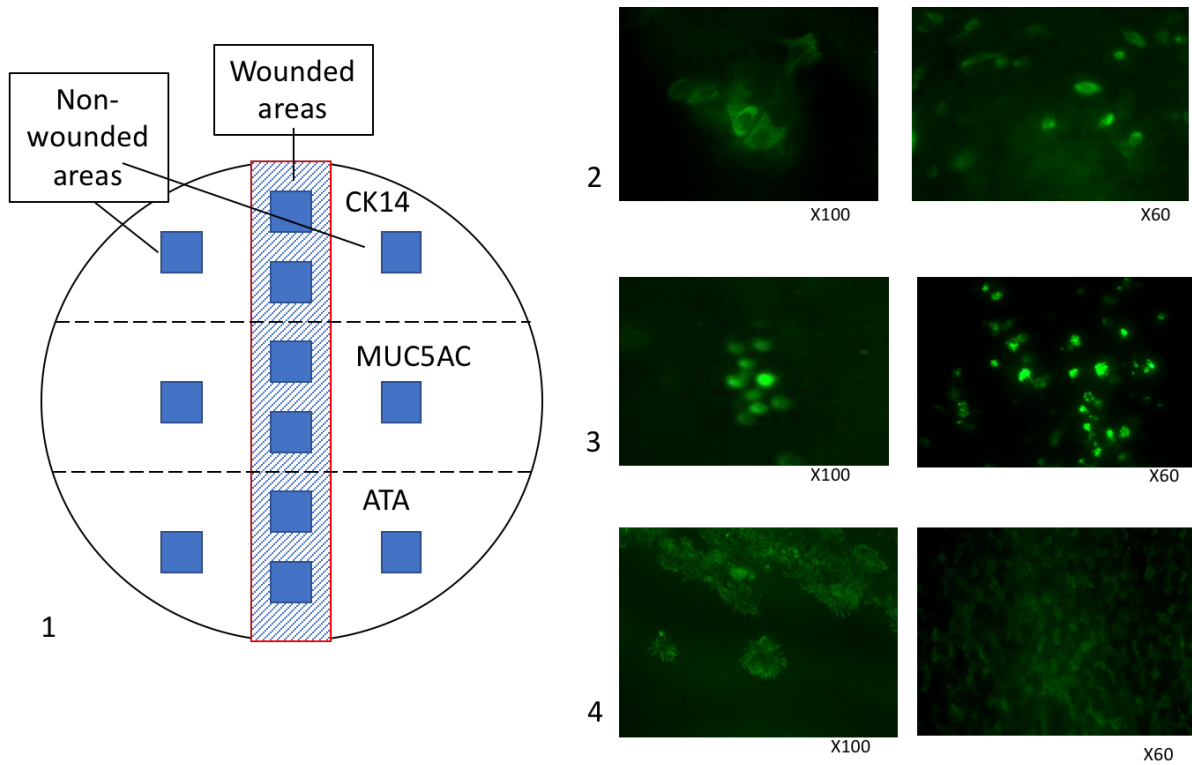
4B, 4C, 4D, 4E: Comparaison des ratios (pourcentage de cellules positives dans la zone blessée / pourcentage de cellules positives dans les zones de contrôle non blessées) après 2, 7 et 12 jours après la fermeture de la blessure entre les puits de culture modulés par chaque IL (IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) et non modulés (puits contrôles)

**4B:** Comparaison des rapports de noyaux (zones blessées / zones non blessées) entre les puits de culture avec IL et sans \*  $p < 0,05$

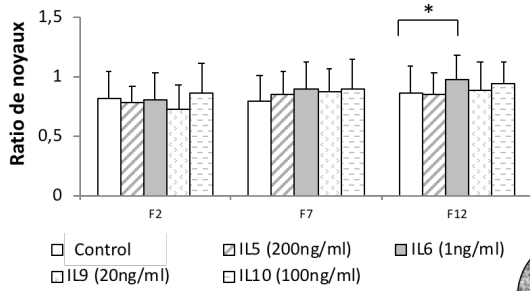
**4C:** Comparaison des ratios de cellules ciliées (zones blessées / zones non blessées) entre les puits de culture avec IL et sans \*  $p < 0,05$

**4D:** Comparaison des ratios de cellules caliciformes (zones blessées / zones non blessées) entre les puits de culture avec IL et sans \*  $p < 0,05$

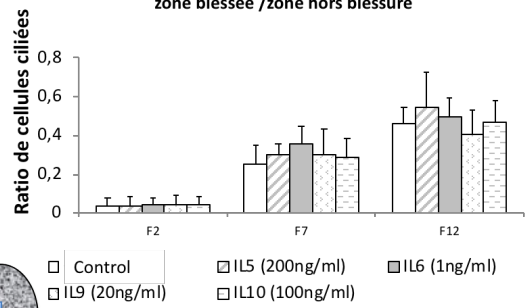
**4E:** Comparaison des ratios de cellules basales (zones blessées / zones non blessées) entre les puits de culture avec IL et sans \*  $p < 0,05$



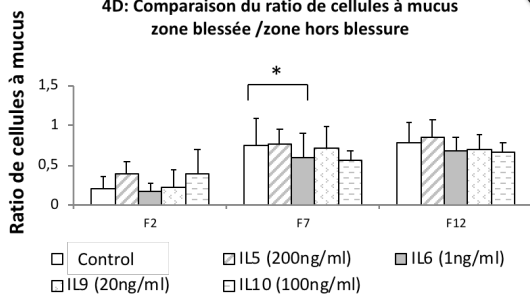
4B: Comparaison du ratio de noyaux zone blessée /zone hors blessure



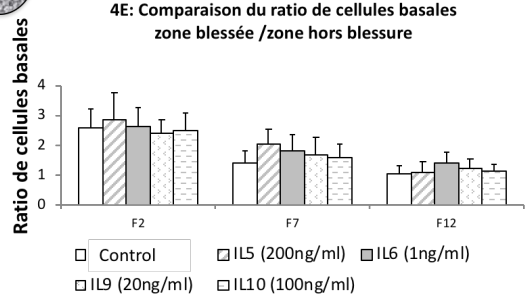
4C: Comparaison du ratio de cellules ciliées zone blessée /zone hors blessure



4D: Comparaison du ratio de cellules à mucus zone blessée /zone hors blessure



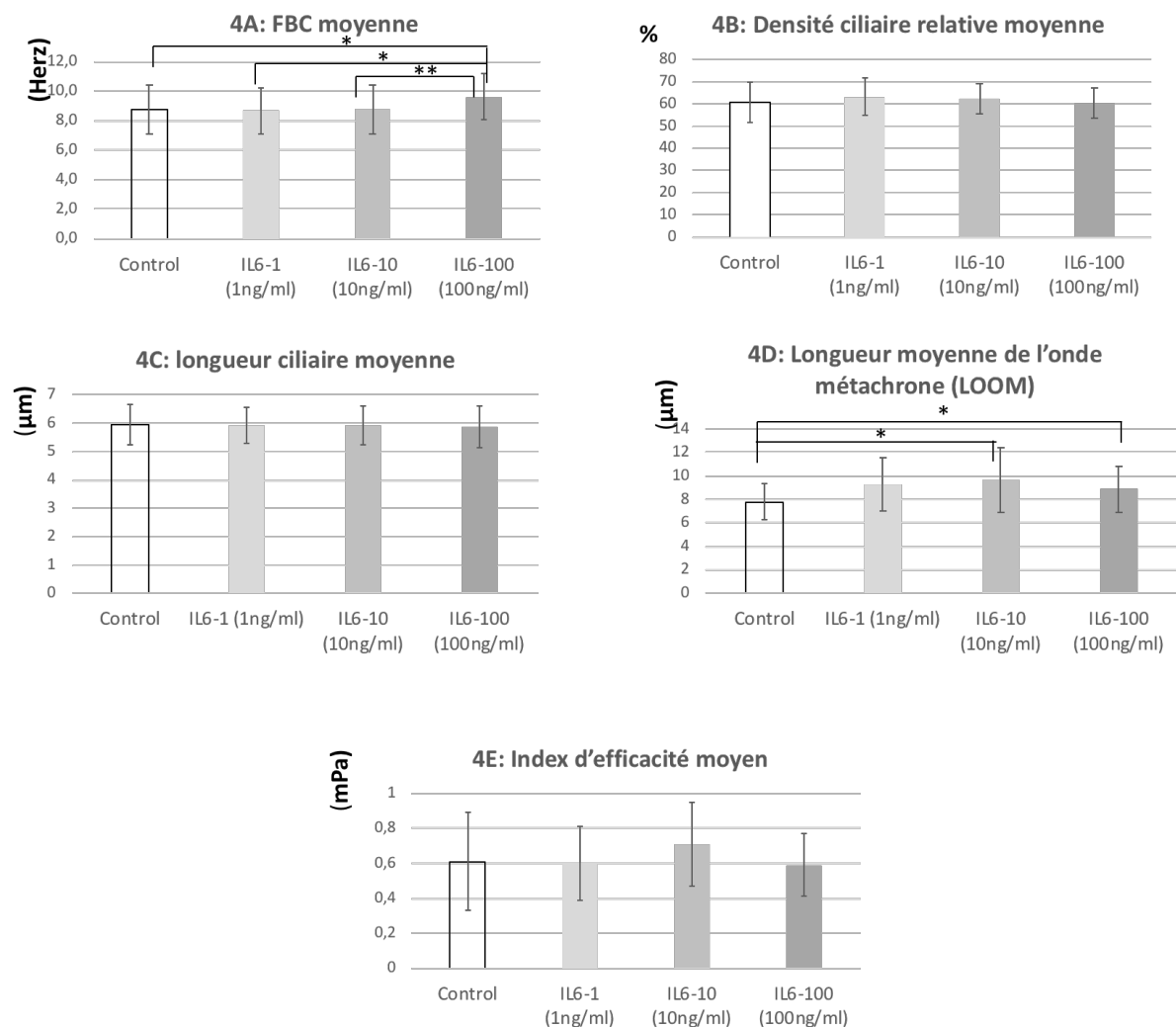
4E: Comparaison du ratio de cellules basales zone blessée /zone hors blessure



Comme nous avons mis en évidence le rôle prépondérant de l'IL-6 dans la réparation épithéliale, nous avons ensuite évalué son effet sur la fonction ciliaire. Ce travail a permis de mettre en évidence une augmentation de la FBC et de la longueur de l'onde métachrone, mais sans modification significative de la densité ciliaire, de la longueur des cils et de l'indice d'efficacité en réponse à la stimulation par IL-6 (Cf. Figure 5).

**Figure 5 : Etude de l'influence de l'IL-6 sur le battement ciliaire**

Comparaison des paramètres du battement ciliaire entre les brosse de cultures de CENH stimulées par l'IL-6 à des concentrations croissantes (IL6.1, IL6.10, IL6.100) (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml respectivement) et le groupe témoin (cultures non stimulées) après 21 jours de stimulation par IL-6 (n= 21 puits contrôles et n = 21 puits de IL6.100, n = 21 puits de IL6.10 et n = 21 puits de IL6.1) (analyse appariée): comparaison de la fréquence moyenne de battement ciliaire (FBC) (en Herz) (Figure 4A), de la densité ciliaire moyenne relative (Figure 4B), de la longueur moyenne des cils (Figure 4C), de la longueur d'onde moyenne de l'onde métachrone (LOOM) (en  $\mu\text{m}$ ) (Figure 4D), et calcul de l'index d'efficacité moyen du battement (en mPa) (Figure 4E)



## 5.2.4 Discussion

**Cette étude montre que, parmi les cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PNS- telles que l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-6 ou la cytokine régulatrice, l'IL-10, seule l'IL-6 a eu un effet sur la réparation épithéliale en accélérant significativement la fermeture de la blessure. Après la fermeture de la blessure, aucune des interleukines (IL-5, IL-9, IL-10) n'a modifié le processus de différenciation ou induit une augmentation du nombre de cellules dans la zone de blessure. Seule la présence d'IL-6 induisait une diminution de la différenciation des cellules à mucus à un stade intermédiaire, une augmentation du rapport des noyaux (zone blessée / zone hors blessure) à un stade avancé de la réparation. Enfin, l'IL-6 était capable de modifier la fonction ciliaire en augmentant la FBC et la longueur de l'onde métachrone.**

Dans ce travail, nous avons confirmé notre hypothèse de départ, c'est à dire l'absence d'influence de l'IL-5 sur la réparation épithéliale, comme le suggérait l'étude de Wise et al. (Wise, Den Beste et al. 2013). Par contre, dans l'épithélium non blessé, il existait une augmentation du nombre de noyaux : cela peut être du soit à une augmentation de la prolifération ou une inhibition de l'apoptose cellulaire sous IL-5. Il a été récemment montré dans la maladie d'Alzheimer que l'IL-5 bloquait l'apoptose de cellules neurales (Zhou, Li et al. 2017).

Nous n'avons pas trouvé d'effet de l'IL-9 et de l'IL-10 sur la réparation des blessures comme nous en avons fait l'hypothèse.

Il existe plusieurs limites de cette étude :

- Bien que les concentrations d'IL choisies l'aient été en fonction des données de la littérature, elles pourraient ne pas être appropriées pour inhiber ou accélérer la vitesse de fermeture. Nous n'avons d'ailleurs testé qu'une seule concentration. Il serait intéressant de refaire ces expériences avec une gamme logarithmique de concentrations pour chaque IL.
- Par ailleurs, ces expérimentations ne miment pas précisément l'environnement cytokinique complet présent *in vivo* mais a cherché à séparer les cytokines pour en dégager les effets propres. Une fois les effets individuels connus, il serait intéressant d'évaluer les interactions cytokiniques et leur effets conjugués ou opposés sur la réparation épithéliale. Par ailleurs le modèle utilisé ne comprend que des cellules épithéliales et exclu donc les cellules de l'environnement inflammatoire. Une étude publiée par Quiros et Al. (Quiros, Nishio et al. 2017) montre l'implication des macrophages, grande source d'IL-10 comme nécessaires à la réparation épithéliale avec une co-localisation des macrophages et de l'IL-10 dans les zones de blessure et l'inhibition de la réparation en cas d'absence de macrophages dans un modèle murin knock-out pour les CD11 (Quiros, Nishio et al. 2017).

- il existait une certaine variabilité de la taille de la blessure initiale inhérente à la méthode manuelle, bien que la différence entre les groupes ne soit pas significative.

Dans ce travail, nous avons par contre confirmé notre hypothèse de l'induction par l'IL-6 d'une réparation épithéliale accélérée de l'épithélium respiratoire nasal. Au niveau de la blessure, IL-6 augmenterait le nombre de noyaux à un stade tardif de la réparation (12 jours après la fermeture de la blessure) suggérant un effet sur la prolifération cellulaire au niveau de la blessure. De plus, IL-6 diminuerait significativement le nombre de cellules à mucus, suggérant un effet sur la différenciation cellulaire. Par contre, l'IL-6 n'aurait pas d'effet sur le nombre de noyaux dans les zones non blessées par rapport aux puits contrôles non stimulés avec une stabilité du nombre de noyaux dans le temps. L'IL-6 agirait donc peu sur l'épithélium « sain » mais pourrait orienter vers une réparation épithéliale accélérée mais anormale. Cet effet de l'IL-6 observé *in vitro* dans notre étude pourrait s'expliquer par l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire que nous avons décrits dans le chapitre 2.3.2 (« Dysrégulation de la réparation épithéliale dans la PNS et influence des cytokines »)

### **Quelles sont les perspectives suggérées par ces résultats ?**

La PNS peut être considérée comme une maladie multifactorielle résultant d'une réparation épithéliale anormale pouvant être modulée par l'IL-6. Ces résultats montrent une relation entre l'IL-6 et la cellule épithéliale, suggérant que l'IL-6 pourrait être impliquée dans la croissance des polypes nasaux. Cette information pourrait être utile dans le développement de nouvelles approches de recherche et thérapeutiques concernant le dysfonctionnement de l'épithélium dans la PNS.

Il serait intéressant d'aller plus loin dans la description des effets de l'IL-6 sur les fonctions de la cellule épithéliale dans notre modèle de culture :

- i) Confirmer et localiser la présence du récepteur à l'IL-6 à la partie apicale et/ou basale de la cellule épithéliale nasale humaine
- ii) Confirmer et caractériser ses effets sur la prolifération cellulaire
- iii) Caractériser ses effets sur les propriétés biomécaniques de la cellule: propriétés intracellulaires (rigidité du cytosquelette, perméabilité cellulaire) et interactions extracellulaires (forces d'adhésion cellules-cellules et cellule-matrice extra-cellulaire)

## 5.2.5 Article soumis

SOU MIS au Journal of Translational Medicine depuis le 03/11/2019

## Journal of Translational Medicine

Pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction  
–Manuscript Draft–

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Manuscript Number:           |   |
| Full Title:                  | Pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction  |
| Article Type:                | Research  |
| Section/Category:            | Personalized Medicine   |
| Funding Information:         |   |
| Abstract:                    | <p>Background: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is characterized by an alteration in airway epithelial cell functions including barrier function, wound repair mechanisms, mucociliary clearance. The mechanisms leading to epithelial cell dysfunction in nasal polyps (NPs) remain poorly understood. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in NPs, IL-6 could alter epithelial repair mechanisms and mucociliary clearance. The aim of this study was to evaluate the in vitro effects of IL-6 on epithelial repair mechanisms in a wound repair model and on ciliary beating in primary cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC).</p> <p>Methods: Primary cultures of HNEC taken from 38 patients during surgical procedures for CRSwNP were used in an in vitro model of wound healing. Effects of increasing concentrations of IL-6 (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) and other ILs (IL-5, IL-9, IL-10) on wound closure kinetics were compared to cultures without IL-modulation. After wound closure, the differentiation process was characterized under basal conditions and after IL supplementation using cytokeratin-14, MUC5AC, and <math>\beta</math>IV tubulin as immunomarkers of basal, mucus, and ciliated cells, respectively. The ciliated edges of primary cultures were analyzed on IL-6 modulation by digital high-speed video-microscopy to measure: ciliary beating frequency (CBF), ciliary length, relative ciliary density, metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index.</p> <p>Results: Our results showed that: i) IL-6 accelerated airway wound repair in vitro, with a dose-response effect whereas no effect was observed after other ILs-stimulation. After 24 hours, 79% of wounded wells with IL6-100 were fully repaired, vs 46% in the IL6-10 group, 28% in the IL6-1 group and 15% in the control group; ii) specific migration analyses of closed wound at late repair stage (Day 12) showed IL-6 had the highest migration compared with other ILs iii) The study of the IL-6 effect on ciliary function showed that CBF and metachronal wave increased but without significant modifications of ciliary density, length of cilia and efficiency index.</p> <p>Conclusion The up-regulated epithelial cell proliferation observed in polyps could be induced by IL-6 in the case of prior epithelial damage. IL-6 could be a major cytokine in NP physiopathology.</p> |
| Corresponding Author:        | Emilie Bequignon<br>Centre Hospitalier Intercommunal de Creteil<br>Creteil, FRANCE  |
| Corresponding Author E-Mail: | emilie.bequignon@gmail.com  |

**Pathogenesis of chronic rhinosinusitis with nasal polyps: role of IL-6 in airway epithelial cell dysfunction**

Emilie Béquignon<sup>1,2,3,4</sup> MD\*; David Mangin<sup>1,2,3,4</sup> MD\*; Justine Bécaud<sup>1,2,3,4</sup> MD; Jennifer Pasquier PhD<sup>5,6</sup>; Christelle Angely<sup>2,3,4</sup> PhD; Mathieu Bottier<sup>2,3,4</sup> PhD; Estelle Escudier<sup>7,8,9</sup> MD-PhD; Daniel Isabey<sup>2,3,4</sup> PhD ; Marcel Filoche<sup>2,3,4</sup> PhD; Bruno Louis<sup>2,3,4</sup> PhD\*\*; Jean-François Papon<sup>2,4,10,11</sup> MD-PhD\*\*; André Coste<sup>1,2,3,4</sup> MD-PhD\*\*

- 1.AP-HP, Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, Créteil, 94010, France;
- 2.INSERM, U955, Créteil, 94010, France;
- 3.Université Paris-Est, Faculté de Médecine, Créteil, F-94010, France;
- 4.CNRS, ERL 7000, Créteil, 94010, France;
- 5.Nice Breast Institute, 06000 Nice, France
- 6.Weill Cornell Medicine-Qatar, Stem Cell & Microenvironment Laboratory, Doha, State of Qatar
- 7.Inserm U933, Paris, France
- 8.Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
- 9.AP-HP Hôpital Armand-Trousseau, Service de génétique et d'embryologie médicale, Paris, France
- 10.AP-HP, Hôpital Bicêtre, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, Le Kremlin-Bicêtre, 94270, France
- 11.Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, F-94275, France

\*These authors have contributed equally to this work

\*\*These authors have contributed equally to this work

**Running head:** Role of IL6 in nasal polyposis

**Correspondence and requests for reprints should be addressed to:**

Dr Emilie Béquignon:       INSERM U955 Equipe 13  
  Faculte de Medecine  
  8 rue du General Sarrail  
  94010 Creteil Cedex, France  
  Phone : + 33 1 49 81 24 91  
  Fax : + 33 1 49 81 24 23  
  E-mail: [emilie.bequignon@gmail.com](mailto:emilie.bequignon@gmail.com)

### Abstract

**Background:** Chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) is characterized by an alteration in airway epithelial cell functions including barrier function, wound repair mechanisms, mucociliary clearance. The mechanisms leading to epithelial cell dysfunction in nasal polyps (NPs) remain poorly understood. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in NPs, IL-6 could alter epithelial repair mechanisms and mucociliary clearance. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of IL-6 on epithelial repair mechanisms in a wound repair model and on ciliary beating in primary cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC).

**Methods:** Primary cultures of HNEC taken from 38 patients during surgical procedures for CRSwNP were used in an *in vitro* model of wound healing. Effects of increasing concentrations of IL-6 (1 ng/mL, 10 ng/mL, and 100 ng/mL) and other ILs (IL-5, IL-9, IL-10) on wound closure kinetics were compared to cultures without IL-modulation. After wound closure, the differentiation process was characterized under basal conditions and after IL supplementation using cytokeratin-14, MUC5AC, and  $\beta_{IV}$  tubulin as immunomarkers of basal, mucus, and ciliated cells, respectively. The ciliated edges of primary cultures were analyzed on IL-6 modulation by digital high-speed video-microscopy to measure: ciliary beating frequency (CBF), ciliary length, relative ciliary density, metachronal wavelength and the ciliary beating efficiency index.

**Results:** Our results showed that: i) IL-6 accelerated airway wound repair *in vitro*, with a dose-response effect whereas no effect was observed after other ILs-stimulation. After 24 hours, 79% of wounded wells with IL6-100 were fully repaired, vs 46% in the IL6-10 group, 28% in the IL6-1 group and 15% in the control group; ii) specific migration analyses of closed wound at late repair stage (Day 12) showed IL-6 had the highest migration compared with other ILs iii) The study of the IL-6 effect on ciliary function showed that CBF and metachronal wave increased but without significant modifications of ciliary density, length of cilia and efficiency index.

**Conclusion** The up-regulated epithelial cell proliferation observed in polyps could be induced by IL-6 in the case of prior epithelial damage. IL-6 could be a major cytokine in NP physiopathology.

**Abbreviations:**

*ALI: air-liquid interface*

*CBF: ciliary beating frequency*

*CRSwNP: chronic rhinosinusitis with nasal polyps*

*HNEC: human nasal epithelial cells*

*IL: interleukin*

*NPs: nasal polyps*

### Introduction

Primary nasal polyposis, also called chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP), is a common disease that affects 4% of the population. Symptoms relate to growth of polyps within the sinonasal cavities and can include hyposmia, nasal congestion, discharge and facial pain [1].

An understanding of the biological mechanisms involved in CRSwNP may inform treatment and diagnostic decisions, but the epithelial and inflammatory processes leading to nasal polyp (NP) growth are currently poorly defined. CRSwNP is characterized by persistent mucosal inflammation which is a result of inappropriate or excessive immune response to foreign agents [2]. Respiratory epithelium in NPs exhibits morphological changes consistent with epithelial dysfunction, including basal cell proliferation, goblet cell hyperplasia and the loss of differentiation of ciliated cells [3-7]. A recent review [8] describes how dysfunction of the airway epithelium contributes to the pathogenesis of CRSwNP and suggests that mucociliary clearance [9] and maintenance barrier function [10] could be altered in NP epithelial cells. Furthermore, dysregulation of epithelial wound repair with an inability to obtain *ad integrum* repair of the nasal airway epithelium has been described in NPs [3, 11, 12].

In addition to epithelial cell dysfunction, a type 2 inflammatory pattern involving expression of interleukins (IL) IL-4, -5, and -13 and increased concentrations of IgE, has been reported in the NPs of 85% of patients with CRSwNP in western countries [13]. Evidence of high levels of IL-6 expression has already been reported in NPs [14, 15]. IL-6 plays an important role in the development and progression of inflammatory responses, autoimmune diseases, and cancers. IL-6 can induce tissue damage, inflammation and cell proliferation [16-18]. To date, no study has precisely described the role of IL-6 in CRSwNP, and particularly its effect on mucociliary clearance, although one study does describe the effect of IL-6 on the regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells [19]. More recently, high concentrations of IL-9 and IL-10 have been described in NPs but their influence on nasal airway epithelial cell dysfunction are unknown [20] [16]. Our hypothesis was that inflammatory cytokines in NPs, particularly IL-6, could be responsible for alteration of sinonasal epithelial cell functions (i.e. dysfunction of repair mechanisms and mucociliary clearance) thus creating favorable conditions for chronic inflammation and polyp growth.

We thus set out to investigate *in vitro* the relationship between nasal epithelial cell functions and ILs. We developed air-liquid interface (ALI) cultures of primary differentiated human nasal epithelial cells (HNEC) that can be used as an *in vitro* wound repair and ciliary beating evaluation model. Our results suggest new mechanisms of epithelial cell-IL relationships and may lead to the identification of novel therapeutic pathways that could improve treatment for patients with CRSwNP [8].

### Methods

In healthy conditions, after a mechanical wound, epithelium repair mechanisms involve cell migration, followed by a cell proliferation phase, epithelial junction and finally a differentiation phase of basal cells in ciliated cells [21]. The restoration of barrier integrity and mucociliary clearance after epithelial injury represent a key step in the defense capacity of the airway epithelium [11]. We aimed to evaluate these mechanisms of epithelial repair with and without IL modulation in cultures of HNEC from NPs.

#### *Primary Cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC)*

NPs were obtained from 11 patients with CRSwNP undergoing ethmoidectomy. All the patients had given informed consent and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01). HNECs were isolated from NPs as previously described [22]. Briefly, the NPs were immediately placed in DMEM/F-12 supplemented with antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2.5 g/ml amphotericin B, and 100 mg/ml gentamicin) and sent to the laboratory for processing. Enzymatic digestion [0.1% (wt/vol) pronase in culture medium] was performed for 16 h at 4°C. The HNECs ( $1 \times 10^6$  cells per well) were then plated in inserts (12-mm Transwell; Costar, MA) with 12-mm-diameter polycarbonate micro-pore membranes (pore size of 0.4  $\mu\text{m}$ ) coated with type IV collagen (Sigma), and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For the first 24 h, the cells were incubated with 1 ml of DMEM/F-12-antibiotics with 2% Ultrosor G in the lower chamber and DMEM/F-12-antibiotics with 10% FCS in the insert. After 24 h, the culture medium (Stemcell, Pneumacult -ALI medium) in the insert was removed to place the cells at the ALI. The medium in the lower chamber was then changed every day. The epithelial nature of the cultured cells has been already confirmed by flow cytometric analysis of cytokeratin immunofluorescent labeling showing 95% and 99% of positive cells on Days 3 and 7, respectively [23]. The HNECs reach a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21) with the ALI culture medium (Stemcell, Pneumacult -ALI medium) [24]. The ALI model of culture is a polarized model (i.e., apical towards the air and basal towards the medium) where HNECs are exposed to air, as in the nose. This ALI model of differentiated HNECs therefore closely mimics *in vivo* conditions, except that they are not in their natural environment, apart from the potential inflammatory process occurring in the nasal cavity [23]. It constitutes an excellent tool to study cellular and molecular mechanisms involving airway epithelial cells exposed to various stimuli [25, 26]. This model is therefore highly suitable for the study of IL effects on epithelial airway repair and ciliary beating.

### ***In vitro Wound Repair Model***

The *in vitro* wound repair assay was carried out according to a model of mechanical injury adapted from a previously described method on fully differentiated cultures of HNECs [27]. We introduced a controlled linear wound of 12 mm length X 1.4 mm by scraping the HNECs with a pipette tip, followed by extensive washing to remove cellular debris. To determine the repair rate, time-lapse images were taken at regular intervals with an inverted microscope (Zeiss, Axiovert200M, France) equipped with an x10 objective over a period of 48 h, depending on the time of wound closure (H18, H24, H42, H48 after wound healing). The wound areas were then quantified by image analysis software (*Image J.*). Wound closure was evaluated by the percentage of wound repair calculating the ratio between the wounded area at each time point and the initial wounded area. The reproducibility of the wound was evaluated by comparing the initial wound area of each tested condition.

### ***Effect of IL-6, IL-5, IL-9, IL-10 on wound closure.***

Closure in the presence of exogenous ILs was compared with closure without ILs (control) in a context of serum-free and cytokine-free medium. Immediately after wounding, the HNECs were exposed to *DMEM-HAM-F12-Penicillin-Streptomycin-Fungizone-Gentamycin-free medium* with either IL-6 (1ng/ml) or IL-5 (200ng/ml) or IL-9 (20ng/ml) or IL-10 (100ng/ml) or without IL. These concentrations were chosen according to previous studies that showed an IL effect on epithelial cells [16, 28-30].

The choice of ILs included in our study was made as follows. The TH2 cytokine IL-4 was not chosen as its role in nasal epithelial wound repair is already well described and it decreases wound closure *in vitro* [28]. IL-6 was selected because this cytokine has been shown to accelerate the wound closure rate in human biliary epithelial or corneal cell injury models and it could play a key role in dysregulation of repair mechanisms [31, 32]. IL-5 is one of the cytokines that characterizes the TH2 (eosinophilic) inflammatory pattern which increases recruitment and survival of eosinophils and its level of expression could be associated with severe recurrent forms of NPs [33, 34]. As a previous study showed no effect of IL-5 on epithelial repair, it was selected for this assay as a negative control hypothesis [28]. Inflammatory cell (i.e., Th2 cells, mast cells and eosinophils) secretion of IL-9 is also elevated in CRSwNP, particularly when associated with allergy and asthma [20, 35]. IL-9 participates in the expression of the IL-5 receptor and acts synergistically with IL-5 to reduce apoptosis of eosinophils in asthma [36, 37]. These features make this cytokine a potential candidate in the modulation of inflammatory response in patients with CRSwNP. However, its effects on epithelial cells are not well defined [20, 35]. IL-9 could induce changes in epithelial cell gene expression leading to goblet cell metaplasia and mucus overproduction [35, 38, 39]. We thus wanted to test its effect on epithelial repair. Finally, according to recent studies, IL-10, a potent anti-inflammatory cytokine, could also have a pivotal role in the pathogenesis of CRSwNP [16]. There is a need to investigate the role of IL-10 in the

pathogenesis of NP and potentially to verify the hypothesis that IL-10 could counteract the dysregulation of repair mechanisms.

Based on the epithelial wound time experiments, we identified the cytokine with the greatest discrepancy among the four individual IL exposure groups. Only IL-6 exposure resulted in faster wound closure rates than the controls. (These findings are detailed in the Results section). IL-6 was thus chosen to investigate a dose-response effect on HNEC repair. For this, we added IL-6 to the cultures at increasing concentrations (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) 1 h after wounding for 48 h (i.e., until the repair assay). Each IL-6 concentration was tested in triplicate for each culture from the same patient. Results are expressed as the residual denuded area covered after each interval: [(initial wound area- residual wound area)/ initial wound area] corresponding to the rate of repair (%).

### ***Effect of IL-6, IL-5, IL-9, IL-10 on differentiation process after wound closure.***

The effects of the ILs on differentiation in the HNEC cultures after wound closure (2, 7 and 12 days after wound closure) were characterized by immunolabeling. In this part of the study the culture wells were modulated from just after wound closure to 12 days after wound closure by each IL ((IL-6 (1ng/ml), IL-5 (200ng/ml), IL-9 (20ng/ml) or IL-10 (100ng/ml)), or not (control wells). The wells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS)<sup>++</sup> (i.e., PBS supplemented with 0.4 with: 9 mM MgCl<sub>2</sub> and 0. with: 9 mM CaCl<sub>2</sub>), incubated for 10 min with PBS<sup>++</sup> NH<sub>4</sub>Cl 5with: 0 mM and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min. After rinsing twice with PBS<sup>++</sup>, the cells were incubated either with mouse monoclonal anti-cytokeratin 14 (CellMarque 314M-14, 1/100) as a basal cell marker, mouse monoclonal anti-mucin-5AC (Abcam ab3649, 1/200) as a goblet cell marker, or mouse monoclonal anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin (Abcam ab24610, 1/500) as a ciliated cell marker, before being revealed by a secondary goat anti-mouse Alexa Fluor- 488 antibody (Molecular Probes 1/500). All the antibodies were incubated with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in PBS<sup>++</sup>. The cells were finally washed three times with PBS<sup>++</sup>, mounted in ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI (Cell Signaling #8961), and imaged on a Zeiss LSM 700 scanning laser confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Two negative controls were performed either by omitting the primary antibody or by using non-immune mouse serum. In order to evaluate the “wound” effect and overcome the IL effect on the healthy epithelium proliferation, we measured the ratio of the number of nuclei stained by DAPI or the percentage of cells positive for each immunolabeling (ATA, MUC5AC, and CK14) in two wounded areas on the number of nuclei for the DAPI in the corresponding two non-wounded control areas of the same well (as showed in diagram of figure 3A).

### ***Effect of IL-6 on ciliary beating***

We went on to evaluate the IL-6 effect on ciliary function. Cilia differentiation was evaluated in cultures of HNEC either exposed or not to IL-6 when monolayers of basal cells were confluent after 3 or 4 days of culture. IL-6 was added in the culture medium at different concentrations (1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml) during the differentiation phase of culture. On Day 21, culture brushing was performed and the cells were suspended in a survival medium (*DMEM-HAM-F12-Penicillin-Streptomycin-Fungizone-Gentamycin*) to immediately evaluate ciliary beating parameters: the ciliary beat frequency (CBF) (in Herz), the cilia length (in  $\mu\text{m}$ ), the relative ciliary density (in %), the metachronal wavelength (in  $\mu\text{m}$ ), and the ciliary beating efficiency index (in mPa). All experiments were performed in duplicate on the 11 independent cultures.

### ***Digital high-speed video-microscopy and evaluation of ciliary beating parameters***

All *in vitro* ciliary function analyses were performed at controlled room temperature (20–25°C) in the laboratory. We used an inverted microscope in brightfield conditions associated with a  $\times 40$  objective and a  $\times 100$  objective. 20  $\mu\text{L}$  of 4.5  $\mu\text{m}$  polystyrene microbeads at a concentration of 0.125%w/v were added to 80  $\mu\text{L}$  of survival medium containing beating ciliated cells in suspension and placed between a microscope slide and a cover slide. Cilia movements were recorded with a digital camera (PixelINK A741, Ottawa Canada) at a rate of 358 frames per second. Each movie was composed of 1,800 frames with a definition of  $256 \times 192$  pixels, each individual pixel being  $(0.32 \times 0.32) \mu\text{m}^2$  with a  $\times 40$  objective and  $(0.13 \times 0.13) \mu\text{m}^2$  with a  $\times 100$  objective. All areas containing intact undisrupted ciliated epithelial edges greater than 50  $\mu\text{m}$ , beating in the plane of the camera were recorded. The parameters – CBF, cilia length, the relative ciliary density, the metachronal wavelength, and the ciliary beating efficiency – were recorded and analyzed in the ciliated edges of 10 different cell clusters with the  $\times 40$  objective for all except for the cilia length that was measured with the  $\times 100$  objective.

All the parameters were studied using analysis software developed by our team from the Matlab platform. The CBF (in Hz) was obtained with the temporal analysis of the grey level by Fast Fourier Transform. The relative ciliary density was assessed by comparing the average grey level of the background with the grey level of the area containing cilia. Since ciliated areas are darker than the background, the higher the percentage, the higher the relative ciliary density. The metachronal wavelength (in  $\mu\text{m}$ ) was obtained by inferring the phase variation of the main beating frequency along the ciliated edge. This phase shift, which expresses the delay of one cilium in the cycle compared to the neighbouring cilia, creates a metachronal wave that participates in the movement of mucus. The length of the cilia (in  $\mu\text{m}$ ) was measured on the most rectilinear cilia for which the base, apical extremity and entire path were visible. Finally, microbead velocity was used as a marker of the flow generated by the

ciliary beating to evaluate the shear stress induced by cilia on the fluid (mean ciliary efficiency index (in mPa)). All parameters and measurement details have been previously published by our research team [40, 41].

### *Statistical analysis*

Statistics were performed with a statistical software package (Statistica v7.1; Stat Soft, France). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons of repair rate between IL-stimulated conditions and controls were performed with Kruskal -Wallis (unpaired data and quantitative variables). After observing the decrease in wound-closure area with a range of IL6-concentrations, we tested linear regression using the least-square method of estimation, which was shown to be appropriate. Comparison of proliferation (number of nuclei), differentiation (number of positive cells for each immunolabeling marker) between the IL groups and controls were performed with Kruskal -Wallis (unpaired data and quantitative variables).

Comparisons of mean quantitative parameters of beating between IL6 groups (at different concentrations) and controls were performed with Friedman ANOVA by Rank with Wilcoxon test as post-hoc test (paired data and quantitative variables). A p value  $\leq 0.05$  was considered as significant.

### **Results**

In CRSwNP pathogenesis, the initial mechanism in the formation of polyps could be a rupture of both the epithelial continuity and the basement membrane. A defective epithelial barrier has already been found in patients with CRSwNP with decreased tissue resistance and decreased expression of tight junction proteins [10]. Extrinsic factors could serve as environmental inflammatory triggers (inhaled irritants or particles, pneumo-allergens, commensal and pathogenic bacteria) which induce epithelial damage (barrier dysfunction) and inflammatory mechanisms [2, 3]. However, restoring the integrity of the epithelial barrier after injury is also a key element in the defence capabilities of the respiratory epithelium. Dysfunction of repair of the epithelial barrier has been implicated in the pathogenesis of NPs [3, 11, 12]. However, the mechanisms leading to epithelial cell dysfunction remain poorly understood. Our hypothesis was that among the inflammatory cytokines involved in NPs, IL-6 could alter epithelial repair mechanisms.

### ***In vitro* IL effect on wound closure**

We first evaluated the *in vitro* effect of the ILs on wound closure on 11 independent cultures corresponding to 102 wells which were wounded (IL-5:n=15, IL-6:n=17, IL-9 n=20, IL-10 n=14 and controls n=36) (Figure 1). IL concentrations were determined according to previous *in vitro* studies: IL-6 (1ng/ml), IL-5 (200ng/ml), IL-9 (20ng/ml) or IL-10 (100ng/ml). There was no statistical difference between initial wound areas according to each tested condition ( $p=0.11$ ). After 18 h, only the IL-6 group had a higher repair rate than the control group ( $71 \pm 22\%$  vs  $52 \pm 23\%$ ,  $p = 0.02$ ). Similarly, only the IL-6 group had a higher repair rate than the control group after 24 h ( $89 \pm 13\%$  vs  $71 \pm 20\%$ ,  $p = 0.03$ ). No significant effect on wound repair rate was observed for the other ILs tested (Figure 1).

The dose-response effect of IL-6 was evaluated on independent cultures ( $n=6$ ), corresponding to 166 wells (control wells  $n=48$ , IL6-1ng/ml  $n=29$ , IL6-10ng/ml  $n=22$  IL6-100ng/ml  $n=19$  wells). After 18 h, a significant increase in the mean wound repair rate was observed according to increasing concentrations of IL-6 compared to control group (IL6-1:  $75 \pm 20\%$ ; IL6-10:  $84 \pm 14\%$ ; IL6-100:  $91 \pm 9\%$ ; vs  $51 \pm 21\%$  in control group,  $p<0.0005$ ) (Figure 2). After 24 h, 79% of wounded wells with IL6-100 ( $n=15/19$ ) were fully repaired, vs 46% in the IL6-10 group ( $n=10/22$ ), 28% in the IL6-1 group ( $n=8/29$ ), and 15% in the control group ( $n=7/48$ ).

### ***In vitro* IL effect on differentiation after wound closure**

After a mechanical wound, epithelium repair mechanisms involve cell migration, followed by cell proliferation, and finally by ciliated and goblet differentiation of basal cells. Thus, in the second part of the study we evaluated the *in vitro* IL effect on cell proliferation (i.e., nuclei quantification) in the wound area, and the effect on cell differentiation (i.e., specific immunolabeling) at 2, 7 and 12 days after wound

closure. The effect of the ILs on wound closure was evaluated on 10 independent cultures corresponding to 118 wells (IL-5 n=9, IL-6 n=30, IL-9 n=23, IL-10 n=9 and control wells without IL n=35).

### ***Evaluation in non-wounded control areas***

No difference was observed between IL-stimulated cultures and control wells according to the number of nuclei, the proportion of ciliated cells, or goblet or basal cells whatever the duration of stimulation. We then compared the time-effect within each IL-group: in the IL-6, IL-9 and IL-10 stimulated groups, there was no significant difference between the three time points according to the number of nuclei, the proportion of ciliated cells, or goblet or basal cells. In the IL-5-stimulated group, we found a significant increase in the mean number of nuclei between Day 2 and Day 12 ( $481 \pm 59$  vs  $390 \pm 60$ ,  $p = 0.03$ ) (data not shown).

### ***Evaluation in wounded areas***

In the control wells without IL, a typical response to epithelial aggression was observed with a proliferation and differentiation process between Day 2 and Day 12. When comparing Day 2 to Day 12, we found a significant increase in the number of nuclei ( $270 \pm 81$  vs  $327 \pm 93$ ,  $p = 0.01$ ), in the proportion of ciliated cells ( $2 \pm 2\%$  vs  $20 \pm 3\%$ ,  $p < 0.00001$ ), in the proportion of goblet cells ( $2 \pm 2\%$  vs  $11 \pm 3\%$ ,  $p < 0.00001$ ) and a decrease in the number of basal cells ( $26 \pm 5\%$  vs  $10 \pm 3\%$ ,  $p < 0.00001$ ) (data not shown).

According to the initial hypothesis of an epithelial repair defect in NP formation, we specifically evaluated the effect of ILs on the proliferation and differentiation at the level of the epithelial wound-closed area between each IL-stimulated group and the control group without IL stimulation. To rule out the IL-proliferation effect on healthy tissue, we calculated the ratio of number of nuclei between the wound area at two sites in the same well and the healthy non-wounded control area at two sites (Figure 3A). We then calculated with the same method of analysis (described in Figure 3A) the ratio of ciliated cells, goblet cells and basal cells at Day 2 and Day 12.

A similar differentiation process was observed in culture wells modulated by each IL between Day 2 and Day 12 (increase in nuclei, ciliated cells, goblet cells and decrease in basal cells) (Figure 3). Only IL-6 stimulation affected the number of nuclei: there was a higher ratio of nuclei on Day 12 after wound closing ( $p < 0.05$ ) compared to the wounded control wells without IL. No IL effect was observed on the ratio of ciliated cells, goblet cells or basal cells compared to the wounded control wells without IL.

### ***Evaluation of ciliary beating function after in vitro IL-6 stimulation***

After restoration of barrier integrity after epithelial wounding, mucociliary clearance represents a key step in the defense capacity of the airway epithelium and could be altered in CRSwNP. Thus, we evaluated the ciliary function after *in vitro* IL-6 stimulation. A dose-response effect of IL-6 on ciliary

beating was evaluated on 11 independent cultures stimulated or not by IL-6 for 21 days of culture corresponding to 79 wells (control wells n=21, IL6-1ng/ml n=18, IL6-10 ng/ml n=19, IL6-100 ng/ml n=21 wells).

The mean CBF was 8.8 Hz in the control wells and did not significantly differ from that observed in the IL-6 groups (IL6-1: 8.7Hz, IL6-10: 8.8Hz and IL6-100: 9.6 Hz) (Figure 4A). However, for each culture, the paired analysis of each well with IL-6 at different concentrations with its control well showed a higher CBF in IL6-100 compared to the paired control well ( $p = 0.042$ ) and the paired IL6-1 and IL6-10 wells ( $p = 0.039$  and  $p = 0.004$ , respectively) (Figure 4A and 4F).

The mean metachronal wavelength was 7.8  $\mu\text{m}$  in control wells, 9.3  $\mu\text{m}$  for IL6-1, 9.7  $\mu\text{m}$  for IL6-10 and 8.9  $\mu\text{m}$  for IL6-100 (Figure 4D). In the same way, the paired analysis showed a significantly higher metachronal wavelength in the IL6-10 and 100 groups compared to the paired control wells ( $p = 0.007$  and  $p = 0.01$ , respectively) (Figure 4G).

The paired analysis for each of other parameters showed no significant difference in cilia length, relative ciliary density and ciliary efficiency index between the control group and those exposed to each IL-6 concentration for 21 days. (Figures 4B, C, E).

### Discussion

Among the cytokines involved in the pathophysiology of CRSwNP – such as IL-5, IL-9 and IL-6 or the regulatory cytokine, IL-10 – only IL-6 was found to have an effect on wound healing by significantly accelerating the wound closure rate. After wound closure, although none of the interleukins (IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) altered the differentiation process, the presence of IL-6 induced an increase in the ratio of nuclei (wounded area / non-wounded area) at late-stage repair (Day 12). IL-6 was also found to affect ciliary functions by increasing CBF and metachronal wavelength.

The mechanisms underlying the pathogenesis of CRSwNP remain poorly defined [34]. Various research groups have focused on exploring the roles of sinonasal epithelial cells, of the host immune system, and of pathogens (i.e., bacteria and fungi) [34]. In a new concept, whatever the initial factor of aggression (exposure to inhaled pathogens, antigens or particulates), injury of the nasal airway epithelial barrier triggers a chronic nasal inflammatory process leading to the development of CRSwNP [42]. After that, cytokines and the dysregulation of the host immune response may result in an abnormal epithelial remodeling process and to NP growth [14]. Novel therapies are required to improve disease management and thus avoid treatment by systemic corticosteroids and repeated sinus surgery [42]. According to the epithelial hypothesis it is necessary to understand the role of inflammatory factors on epithelial cells to identify the key mediators of the disease and consequently define new targets for emerging biological therapies.

In the present study, we confirmed our initial hypothesis, *i.e.* that the lack of IL-5 does not affect epithelial repair mechanisms as suggested in the literature [28]. On the other hand, IL-5 did increase the number of nuclei in non-wounded "healthy" epithelium due either to an increased epithelial cell proliferation or to an inhibition of epithelial cell apoptosis. It has recently been shown in Alzheimer's disease that IL-5 blocks the apoptosis of neural cells [30]. We also found that IL-9 did not affect goblet cell differentiation as we might have expected in view of its known role in metaplasia goblet cell induction. On the other hand, we confirmed our hypothesis that IL-6 has an effect on airway epithelial repair mechanisms: IL-6 induced an increased wound closure rate similar to the effect observed in human biliary epithelial or corneal cell injury models. [31, 32]. This study also showed quantitative up-regulation of cell proliferation with IL-6 in the case of prior epithelial damage compared with other IL-stimulated conditions.

While some authors [15, 34] suggest that IL-6 plays an important role in chronic inflammation in CRSwNP, its mechanism of action remains poorly understood. The role of IL-6 in NP pathophysiology is classically described as an adaptive immune response by inducing B-cell proliferation and activation and neutrophil recruitment [17]. However, we found that IL-6 could also be involved in other roles such as up-regulation of epithelial cell proliferation and partial ciliary beating control.

IL-6 is produced by various types of cell such as T-cells, B-cells, monocytes, fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, mesangial cells, adipocytes and some tumor cells [18]. In CRSwNP, the initial extrinsic factor of aggression such as fungi, bacteria and lipopolysaccharides (the main outer surface membrane component of Gram-negative bacteria) could explain the increase in IL-6 expression in NPs [43]. Up-regulation of IL-6 may be also explained by increased fibroblast activity dependent on an ongoing chronic local inflammation possibly initiated by an infection [14].

At a molecular level, IL-6 is known to increase vascular permeability and angiogenesis during the acute response phase following wound healing by inducing VEGF production [18]. It can induce the T-helper cell 17 (Th17) immune response by binding to a specific receptor, IL-6R, which triggers a cascade of signaling events that result in STAT3 activation and gene transcription culminating in Th17 differentiation and IL-17 production [44]. STAT3 also regulates the process of cell migration and is therefore important for wound healing. The STAT3-effect is in agreement with the *in vitro* effect of IL-6 in our study. Using IL-6-deficient mice model, a study reported that the IL-6 system was pivotally involved in epidermal permeability barrier repair via STAT3 [45]. In line with our results in a chronic inflammation model, IL6 has also been reported [46] to increase epithelial tumoral cell proliferation, migration and invasion in an ovarian cancer model. Moreover, they also showed that the pro-tumoral effects can be reversed by inhibiting IL-6 both *in vivo* and *in vitro* [47]. Along the same lines of the IL-6 effect in the cancer model, IL-6 could induce up-regulation of proliferation in CRSwNP in the case of “wounded” epithelium. IL-6 exerts its biological activities through two molecules: IL-6R – also known as IL-6R $\alpha$  – and gp130 – also known as IL-6R $\beta$  [18]. The intra-cytoplasmic domain of gp130 contains motifs that can activate both the JAK/STAT and the ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinase) signaling pathways. Activation of the JAK/STAT pathway induces, for instance, activation of NF $\kappa$ B which can block cell apoptosis, and which could explain the increase in epithelial cells in our HNEC model. Activation of the ERK1/2 pathway can induce the production of metalloproteases and tumor cell proliferation [18]. We have already described in our wound repair model that metalloproteases such as MMP-2 can induce acceleration of wound repair *in vitro* [27]. Thus, the IL-6 effect observed in our study could be explained by the up-regulation of metalloproteases.

Interestingly, IL-6 can also associate with the naturally occurring soluble IL-6R (sIL-6R). The IL-6/sIL-6R complex can thereby activate target cells which do not express the membrane bound IL-6R. Such

cells would not be able to respond to IL-6. This process has been called “trans-signaling” [48]. Since all human cells express gp130 on the cell surface, the IL-6/sIL-6R complex can activate nearly all body cells. In other chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease, peritonitis, rheumatoid arthritis, asthma as well as in colon cancer, IL-6 trans-signaling is critically involved in the maintenance of the disease state [17]. In an inflammatory colon cancer model, stimulation by the IL-6/sIL-6R complex induced intra-tumoral growth of epithelial cells [17]. Moreover, in all these animal models, the progression of the disease could be interrupted by specifically interfering with IL-6 trans-signaling using recombinant-soluble gp130Fc protein. Therefore, the *in vitro* IL-6 effect observed in our study could be explained by activation of its different cell signaling pathways and its working via the trans-signaling function. In conclusion, IL-6 trans-signaling could induce chronic proliferation of epithelial cells after wound healing of the epithelial barrier and growth of NPs.

Finally, mucociliary dysfunction could be a prominent pathophysiological feature of CRSwNP [8, 49, 50]; however, the precise mechanisms underlying mucociliary dysfunction are still unclear. A previous study demonstrated in the same *in vitro* primary model of cultures that IFN- $\gamma$  and IL-13 both significantly reduced ciliated cell differentiation and CBF in CRSwNP patients [51]. Our study showed an opposite effect of IL-6 which increased the CBF and the metachronal wave but without modifying the ciliary beating efficiency. Ciliary function is a dynamic process and can be modified by exogen stimuli in physiological conditions [52]. These variations observed under IL-6 modulation could correspond to an attempt to adapt ciliary function by increasing coordination and velocity of beating but without success. There is only one study to our knowledge that has studied the IL-6 effect on CBF and which showed an opposite effect with a decreased beat frequency [53]. It was an isolated study conducted on fallopian tube mucosa explants, thus limiting the comparison with the ciliary beating of an airway epithelium in contact with air. Our study therefore presents the first *in vitro* results of an IL-6 effect on the ciliary beating in human nasal epithelial ciliated cells.

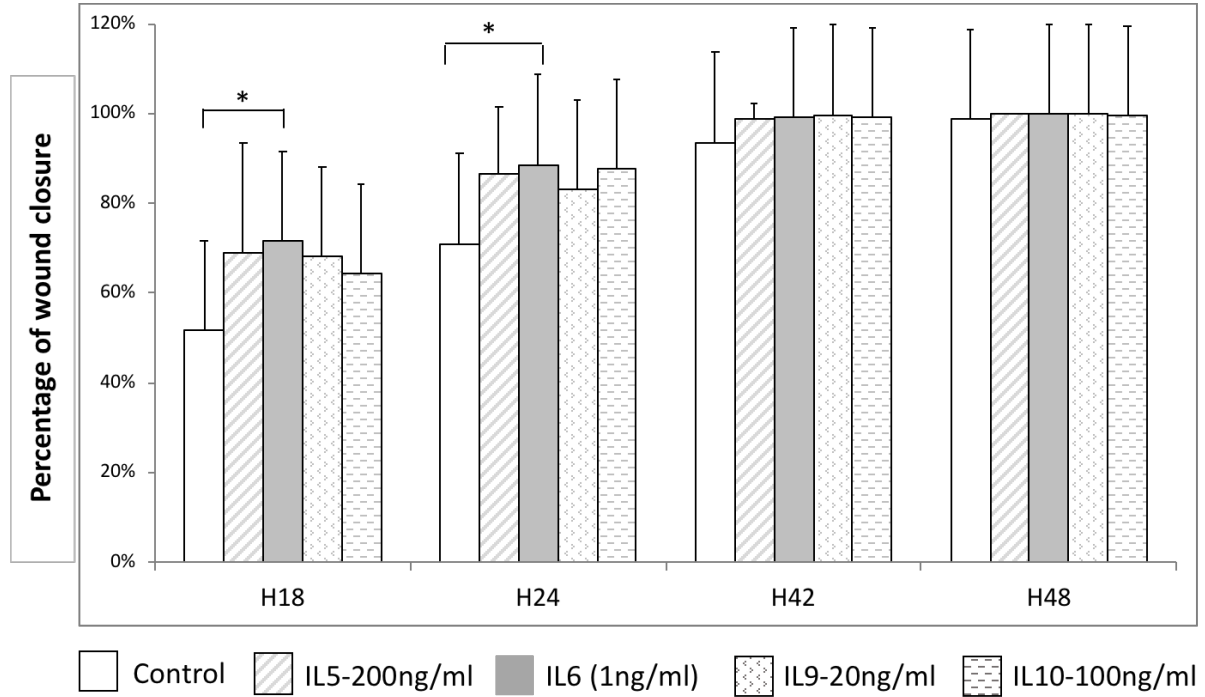
### **Conclusion**

In summary, CRSwNP can be regarded as a multifactorial disease resulting from abnormal epithelial repair that could be IL modulated. Here, primary HNEC cultures revealed a relationship between IL-6 and epithelial cells, suggesting that IL-6 could be involved in the growth of nasal polyps. Epithelial wound closure is significantly faster and CBF is significantly increased under IL-6 stimulation, which could induce an exaggerated epithelial response to external aggression and, in turn, promote polyp formation. This information could be useful in developing new research and therapeutic approaches regarding epithelium dysfunction in CRSwNP.

Figures

**Figure 1: Study of the effect of ILs on wound closure**

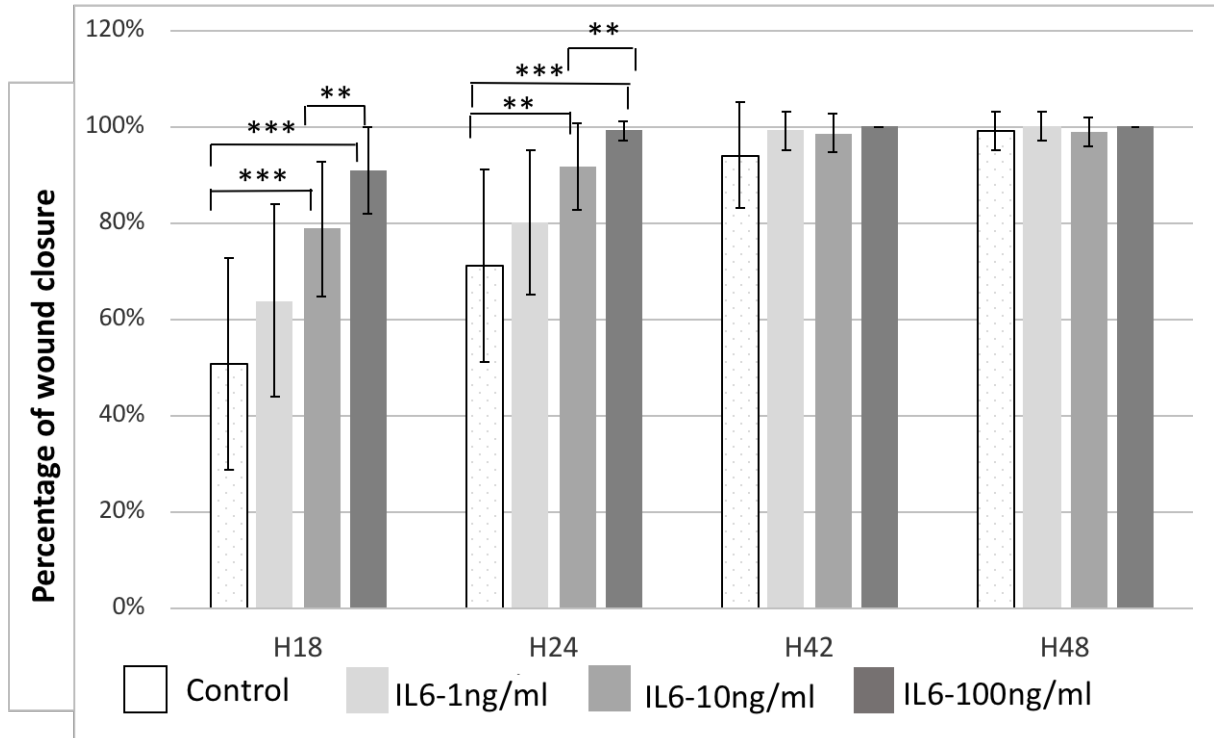
Comparison of the mean percentage of wound repair after wound healing of HNEC cultures (n=11 patients) at each regular interval between control wells and each IL tested (IL-5, IL-6, IL-9, IL-10). *\*=p value<0.05.*



**Figure 2: Study of IL6 dose-response effect on wound closure**

Comparison of the mean percentage of wound repair after wound healing of HNEC cultures (n=6 patients) at each regular interval between controls wells and each concentration of IL-6 tested: IL6-1, IL6-10; IL6-100 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, respectively)

\*= $p$  value<0.05; \*\*= $p$ <0.005; \*\*\*= $p$ <0.0005



**Figure 3: Study of the effect of ILs on the differentiation process after wound closure**

**3A-1: Diagram of well cutting and immunolabeling made in the three different thirds of wells (CK14 in the upper third, MUC5AC in the intermediate third and ATA in the lower third) and method of analysis:**

Effects of ILs on differentiation in HNEC cultures after wound closure (2 (F2), 7 (F7) and 12 (F12) days after wound closure) was characterized by immunolabeling: each well was separated in three areas for each immunolabeling marker: either with mouse monoclonal anti-cytokeratin 14 (CellMarque 314M-14, 1/100) (picture 3A-2) as a basal cell marker, mouse monoclonal anti-mucin-5AC (Abcam ab3649, 1/200) (picture 3A-3) as a goblet cell marker, or mouse monoclonal anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin (Abcam ab24610, 1/500) (picture 3A-4) as a ciliated cell marker, before being revealed by a secondary goat anti-mouse Alexa Fluor- 488 antibody (Molecular Probes 1/500). Nuclei were stained by DAPI.

In order to evaluate the “wound” effect and overcome the IL effect on healthy epithelium, we measured the ratio of the number of nuclei stained by DAPI or the percentage of cells positive for each immunolabeling (ATA, MUC5AC, and CK14) in two wounded areas on the number of nuclei for the DAPI or positive cells in the corresponding two non-wounded control areas of the same well.

**3B, 3C, 3D, 3E: Comparison of ratios (percentage of positive cells in wounded area / Percentage of positive cells in non-wounded control areas) after 2, 7 and 12 days after wound closure between culture wells modulated by each IL (IL-5, IL-6, IL-9, IL-10) and not (controls wells)**

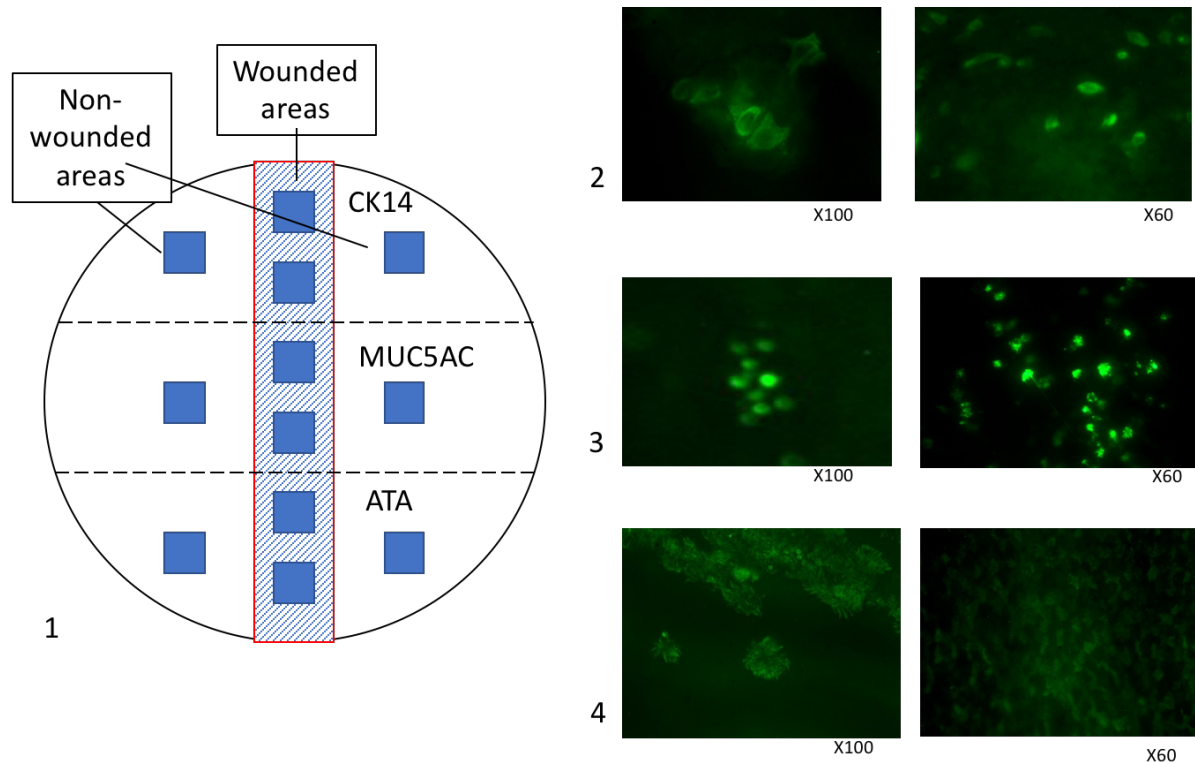
**3B:** Comparison of nuclei ratios (wounded areas/non-wounded areas) between culture wells with IL and without \*  $p < 0.05$

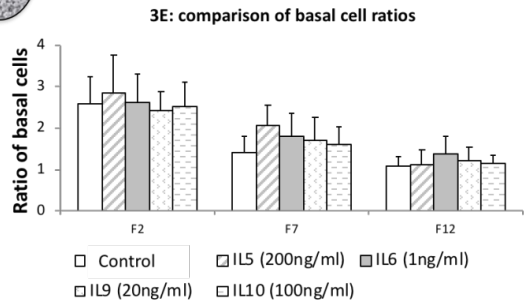
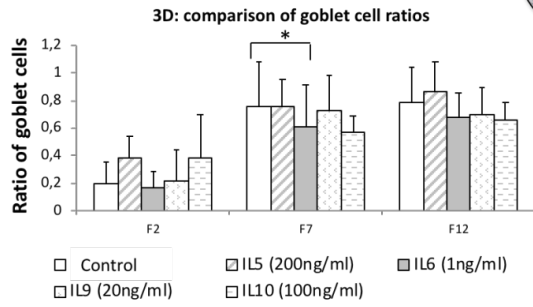
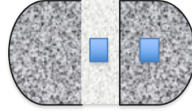
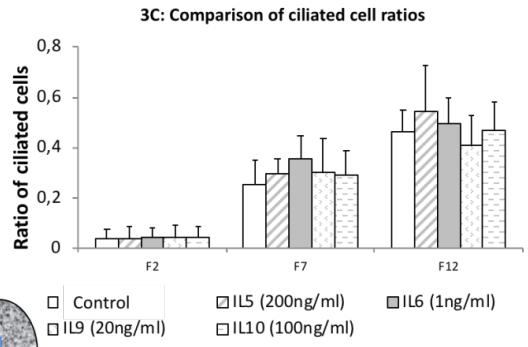
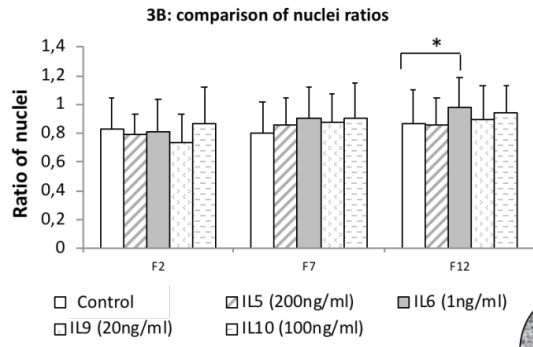
**3C:** Comparison of ciliated cell ratios (wounded areas/non-wounded areas) between culture wells with IL and without \*  $p < 0.05$

**3D:** Comparison of goblet cell ratios (wounded areas/non-wounded areas) between culture wells with IL and without \*  $p < 0.05$

**3E:** Comparison of basal cell ratios (wounded areas/non-wounded areas) between culture wells with IL and without \*  $p < 0.05$

**3A:**

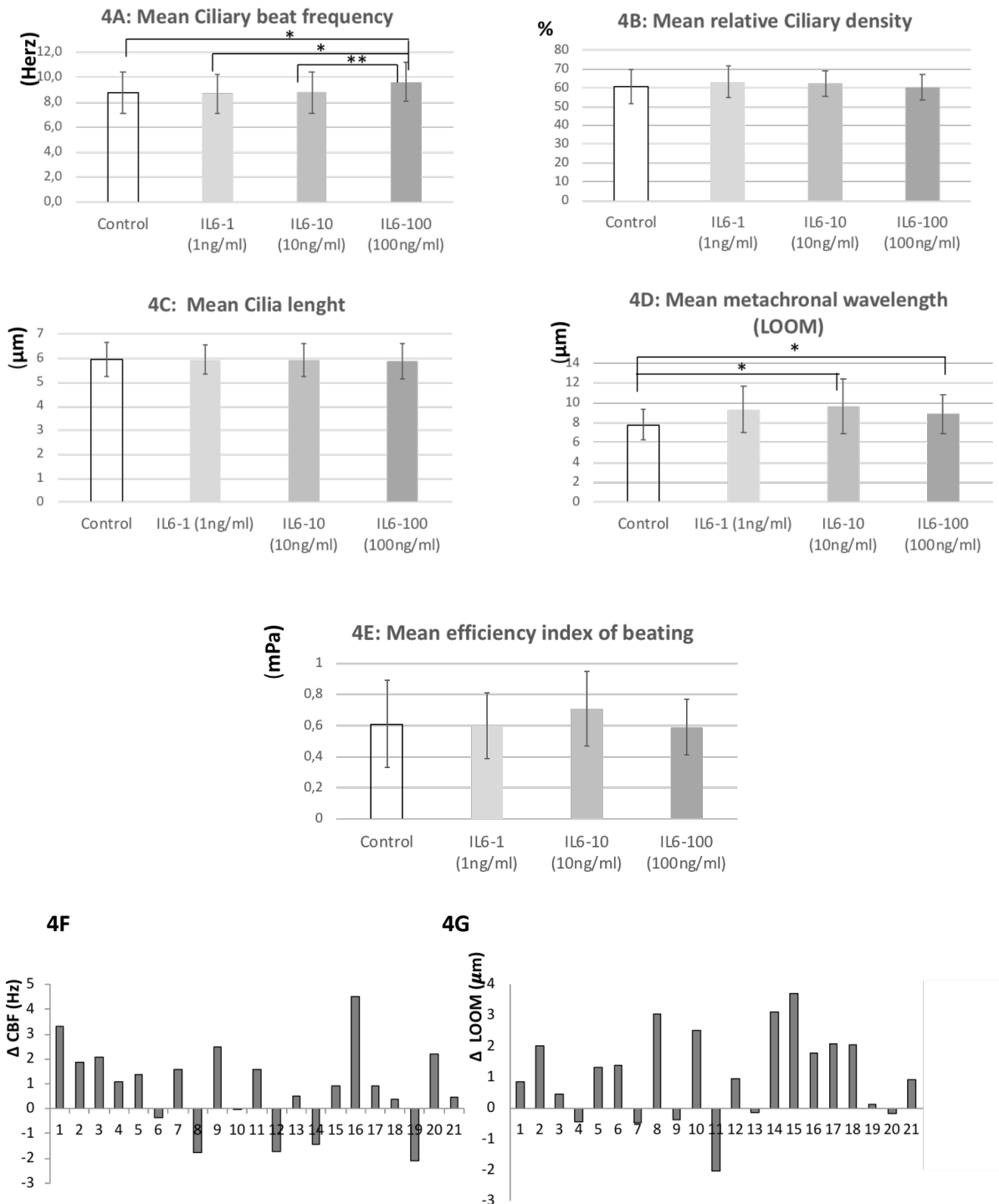




**Figure 4: Study of IL-6 effect on ciliary beating**

Comparison of ciliary beating parameters between IL-6 groups at increased concentrations (IL6-1, IL6-10, IL6-100) (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml respectively) and control group after 21 days of stimulation by IL-6 in culture medium of HNEC (n= 21 controls wells and n=21 wells with IL6 100 and n=21 wells with IL6 10 and n=21 wells with IL6.1) (paired analysis): comparison of mean ciliary beat frequency (CBF) (in Herz) (**Figure 4A**), mean relative ciliary density (**Figure 4B**), mean cilia length (**Figure 4C**), mean metachronal wavelength (LOOM) (in  $\mu\text{m}$ ) (**Figure 4D**), mean efficiency index of beating (in mPa) (**Figure 4E**).

**Figure 4F and 4G:** Focus of significant results of paired analysis: variation of ciliary beat frequency (CBF) between each well with IL-6 stimulation at 100 ng/ml and its respective control well (n=21) (**Figure 4F**) and focus on variation of metachronal wavelength (LOOM) between each well with IL-6 stimulation at 100 ng/ml and its respective control well (n=21) (**Figure 4G**)



**Funding:** This work was supported in part by a student research grant overseen by la Société Française d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie Cervico-Faciale (SFORL) (Dr Becaud) and le Collège *Français* d'ORL et de Chirurgie Cervico-faciale (Dr Mangin)

### Bibliography

1. Sharma R, Lakhani R, Rimmer J, Hopkins C. Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(11):CD006990.
2. Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol Suppl*. 2012;23:3 p preceding table of contents, 1-298.
3. Wladislawosky-Waserman P, Kern EB, Holley KE, Eisenbrey AB, Gleich GJ. Epithelial damage in nasal polyps. *Clin Allergy*. 1984;14(3):241-7.
4. Coste A, Rateau JG, Bernaudin JF, Peynegre R, Escudier E. Nasal polyposis pathogenesis: a flow cytometric and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation. *Acta Otolaryngol*. 1996;116(5):755-61.
5. Coste A, Rateau JG, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Gilain L, Poron F, et al. Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;122(4):432-6.
6. Coste A, Wang QP, Roudot-Thoraval F, Chapelin C, Bedbeder P, Poron F, et al. Epithelial cell proliferation in nasal polyps could be up-regulated by platelet-derived growth factor. *Laryngoscope*. 1996;106(5 Pt 1):578-83.
7. Pothoven KL, Norton JE, Hulse KE, Suh LA, Carter RG, Rocci E, et al. Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(3):737-46 e4.
8. Wynne M, Atkinson C, Schlosser RJ, Mulligan JK. Contribution of Epithelial Cell Dysfunction to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Am J Rhinol Allergy*. 2019:1945892419868588.
9. Chen B, Shaari J, Claire SE, Palmer JN, Chiu AG, Kennedy DW, et al. Altered sinonasal ciliary dynamics in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol*. 2006;20(3):325-9.
10. Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(5):1087-96 e10.
11. Herard AL, Zahm JM, Pierrot D, Hinnrasky J, Fuchey C, Puchelle E. Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15(5):624-32.
12. Lazard DS, Pruliere-Escabasse V, Papon JF, Escudier E, Coste A. [Injury and epithelial wound healing: a pathophysiologic hypothesis for nasal and sinus polyposis]. *Presse Med*. 2007;36(7-8):1104-8.
13. Bachert C, Gevaert P, Hellings P. Biotherapeutics in Chronic Rhinosinusitis with and without Nasal Polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2017;5(6):1512-6.
14. Danielsen A, Tynning T, Brokstad KA, Olofsson J, Davidsson A. Interleukin 5, IL6, IL12, IFN-gamma, RANTES and Fractalkine in human nasal polyps, turbinate mucosa and serum. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006;263(3):282-9.
15. Peters AT, Kato A, Zhang N, Conley DB, Suh L, Tancowny B, et al. Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2):397-403 e10.
16. Xu J, Han R, Kim DW, Mo JH, Jin Y, Rha KS, et al. Role of Interleukin-10 on Nasal Polypogenesis in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161013.
17. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol*. 2006;63(5):321-9.
18. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122(4):143-59.

19. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(35):E3641-9.
20. Lin H, Lin D, Xiong XS, Dai XX, Lin T. Expression and regulation of interleukin-9 in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2015;29(1):e18-23.
21. Grainge CL, Davies DE. Epithelial injury and repair in airways diseases. *Chest*. 2013;144(6):1906-12.
22. Coste A, Brugel L, Maitre B, Bouszat S, Papon JF, Wingerstmann L, et al. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur Respir J*. 2000;15(2):367-72.
23. Papon JF, Coste A, Gendron MC, Cordonnier C, Wingerstmann L, Peynegre R, et al. HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope*. 2002;112(11):2067-75.
24. Cao H, Ouyang H, Grasmann H, Bartlett C, Du K, Duan R, et al. Transducing Airway Basal Cells with a Helper-Dependent Adenoviral Vector for Lung Gene Therapy. *Hum Gene Ther*. 2018;29(6):643-52.
25. Secondo LE, Liu NJ, Lewinski NA. Methodological considerations when conducting in vitro, air-liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Crit Rev Toxicol*. 2017;47(3):225-62.
26. Li X. In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicol In Vitro*. 2016;36:105-13.
27. Lechapt-Zalcman E, Pruliere-Escabasse V, Advenier D, Galiacy S, Charriere-Bertrand C, Coste A, et al. Transforming growth factor-beta1 increases airway wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):L1277-82.
28. Wise SK, Den Beste KA, Hoddeson EK, Parkos CA, Nusrat A. Sinonasal epithelial wound resealing in an in vitro model: inhibition of wound closure with IL-4 exposure. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(6):439-49.
29. Cho SH, Kim DW, Lee SH, Kolliputi N, Hong SJ, Suh L, et al. Age-related increased prevalence of asthma and nasal polyps in chronic rhinosinusitis and its association with altered IL-6 trans-signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(5):601-6.
30. Zhou Y, Li C, Li D, Zheng Y, Wang J. IL-5 blocks apoptosis and tau hyperphosphorylation induced by Abeta25-35 peptide in PC12 cells. *J Physiol Biochem*. 2017;73(2):259-66.
31. Jiang GX, Cao LP, Kang PC, Zhong XY, Lin TY, Cui YF. Interleukin6 induces epithelialmesenchymal transition in human intrahepatic biliary epithelial cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(2):1563-9.
32. Arranz-Valsero I, Soriano-Romani L, Garcia-Posadas L, Lopez-Garcia A, Diebold Y. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay. *Exp Eye Res*. 2014;125:183-92.
33. Huriyati E, Darwin E, Yanwirasti Y, Wahid I. Association of Inflammation Mediator in Mucosal and Tissue of Chronic Rhinosinusitis with Recurrent Nasal Polyp. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(10):1635-40.
34. Stevens WW, Schleimer RP, Kern RC. Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2016;4(4):565-72.
35. Olcott CM, Han JK, Cunningham TD, Franzese CB. Interleukin-9 and interleukin-17C in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(8):841-7.
36. Shimbara A, Christodoulopoulos P, Soussi-Gounni A, Olivenstein R, Nakamura Y, Levitt RC, et al. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(1 Pt 1):108-15.
37. Gounni AS, Gregory B, Nutku E, Aris F, Latifa K, Minshall E, et al. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood*. 2000;96(6):2163-71.
38. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol*. 2011;186(6):3283-8.

39. Parker JC, Thavagnanam S, Skibinski G, Lyons J, Bell J, Heaney LG, et al. Chronic IL9 and IL-13 exposure leads to an altered differentiation of ciliated cells in a well-differentiated paediatric bronchial epithelial cell model. *PLoS One*. 2013;8(5):e61023.
40. Bottier M, Blanchon S, Pelle G, Bequignon E, Isabey D, Coste A, et al. A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part I, experimental analysis. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(7):e1005605.
41. Bottier M, Pena Fernandez M, Pelle G, Isabey D, Louis B, Grotberg JB, et al. A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part II, modeling. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(7):e1005552.
42. Kariyawasam HH. Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: insights into mechanisms of disease from emerging biological therapies. *Expert Rev Clin Immunol*. 2019;15(1):59-71.
43. Liu X, Yin S, Chen Y, Wu Y, Zheng W, Dong H, et al. LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NFkappaB, STAT3 or AP1 activation. *Mol Med Rep*. 2018;17(4):5484-91.
44. Mucida D, Salek-Ardakani S. Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(5):997-1003.
45. Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Neumann C, Trautwein C, Rose-John S, et al. The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):124-31.
46. Touboul C, Lis R, Al Farsi H, Raynaud CM, Warfa M, Althawadi H, et al. Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6 secretion in an amniochorionic membrane based 3D model. *J Transl Med*. 2013;11:28.
47. Pasquier J, Gosset M, Geyl C, Hoarau-Vechot J, Chevrot A, Pocard M, et al. CCL2/CCL5 secreted by the stroma induce IL-6/PYK2 dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):47.
48. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*. 1994;300 ( Pt 2):281-90.
49. Kozlov VS, Shilenkov VV, Azatian AS, Kramnoi AI. [Mucociliary transport and motility of the ciliary system of the nasal mucosa in patients with chronic polypous rhinosinusitis]. *Vestn Otorinolaringol*. 2008(2):10-3.
50. Slater A, Smallman LA, Logan AC, Drake-Lee AB. Mucociliary function in patients with nasal polyps. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996;21(4):343-7.
51. Jiao J, Duan S, Meng N, Li Y, Fan E, Zhang L. Role of IFN-gamma, IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Clin Exp Allergy*. 2016;46(3):449-60.
52. Wanner A. Clinical perspectives: role of the airway circulation in drug therapy. *J Aerosol Med*. 1996;9(1):19-23.
53. Papatasiou A, Djahanbakhch O, Saridogan E, Lyons RA. The effect of interleukin-6 on ciliary beat frequency in the human fallopian tube. *Fertil Steril*. 2008;90(2):391-4.

### 5.3. Expression du FcRn et transcytose d'anticorps monoclonal via le FcRn dans la cellule épithéliale : prérequis pour une nouvelle voie d'administration des biothérapies par voie nasale dans la PNS

#### 5.3.1 Contexte et objectif du travail

Les anticorps monoclonaux sont des thérapies prometteuses pour traiter les maladies inflammatoires chroniques des voies respiratoires (asthme et PNS). Il paraît intéressant d'augmenter l'efficacité de l'ensemble de ces anticorps monoclonaux par l'exploration de nouvelles voies d'administration, notamment locales, afin d'améliorer leur action thérapeutique. A côté de la voie parentérale classiquement utilisée pour les anticorps monoclonaux, la voie sous cutanée a été développée pour certains anticorps (Aue, Lindorfer et al. 2010, Bittner, Richter et al. 2012) et en particuliers pour la majorité de ceux testés dans la PNS (Omalizumab, Mepolizumab, Benralizumab, Dupilimab). La recherche pharmacologique s'est concentrée ces dernières années sur les moyens d'augmenter la biodisponibilité de ces thérapies ciblées. Parmi ces moyens, certaines études récentes ont souligné l'importance du rôle du FcRn ou Recepteur néonatal pour le Fragment constant (Fc) des IgG dans la régulation de l'homéostasie des IgG sériques chez l'adulte (Junghans and Anderson 1996, Ghetie, Popov et al. 1997, Wani, Haynes et al. 2006). Le FcRn a été mis en évidence en 1964 par Brambell (Brambell, Hemmings et al. 1964) et cloné dans les années 80 (Simister and Mostov 1989). Il s'agit d'un hétérodimère protéique composé d'une chaîne  $\alpha$  appartenant à la famille des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH1) et de la  $\beta 2$  microglobuline (Simister and Mostov 1989) (cf. Figure 32).



**Figure 32 : Structure cristalline d'un FcRn de rat**

Le FcRn est une molécule hétérodimérique consistant en une chaîne lourde avec les trois domaines extracellulaires  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  (indiqués en vert) qui sont associés de manière non covalente à la  $\beta 2$ -microglobuline sous forme de chaîne légère (orange). Les résidus d'acides aminés glycosylés sur le FcRn de rat, responsables de la liaison de l'IgG au fragment constant (Fc) : acide glutamique [Glu] 115, [Glu] 116, tryptophane [Trp] 131, acide aspartique [Asp] 130 et isoleucine [Ile] 1, et celui responsable de la liaison de l'albumine au FcRn (histidine [His] 166) se présentent sous la forme de billes sphériques rouges.

D'après (Andersen & Sandlie, 2009) Elsevier © (2009)

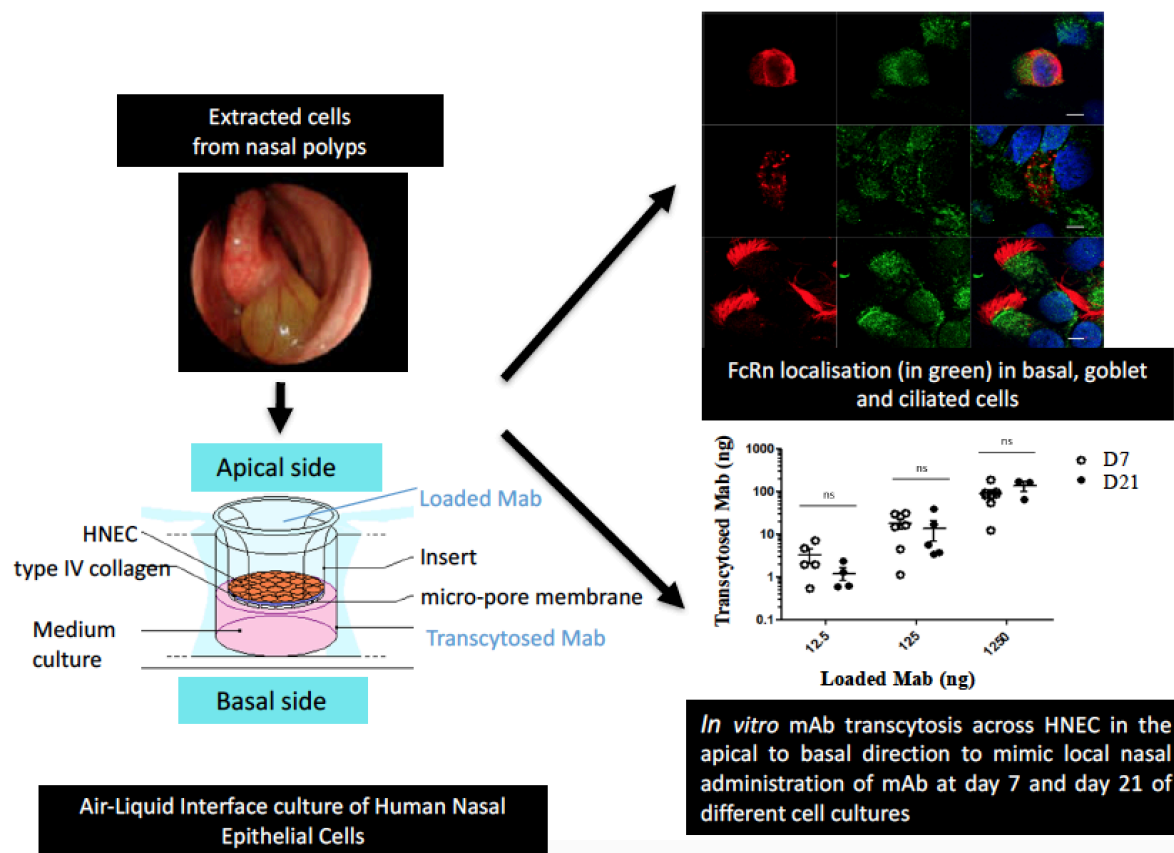
Le FcRn a été initialement étudié en tant que transporteur d'IgG maternelle vers le fœtus, présent dans le placenta et chez le fœtus. Les chercheurs ont découvert par la suite que le FcRn était exprimé, à l'âge adulte, dans une grande variété d'organes tels que les poumons, la peau, les muscles, les reins, le foie et le placenta (Latvala, Jacobsen et al. 2017). La présence de ce récepteur a été détectée dans de nombreux types cellulaires (en particulier les cellules épithéliales, endothéliales et cellules sanguines) (Latvala, Jacobsen et al. 2017). Concernant son rôle précis, le FcRn permet, entre autres, la transcytose et le recyclage d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique. L'interaction du FcRn avec ses deux ligands l'albumine et l'IgG est dépendante du pH (Raghavan, Bonagura et al. 1995, Chaudhury, Brooks et al. 2006). La liaison des IgG et de l'albumine au FcRn s'établit à pH acide, protège les deux ligands du catabolisme de dégradation intracellulaire et prolonge ainsi leur demi-vie (Chaudhury, Brooks et al. 2006) (Jones and Waldmann 1972, Datta-Mannan, Witcher et al. 2007, Oganessian, Damschroder et al. 2014). Chez les souris et les singes, l'administration d'anticorps monoclonaux au niveau des voies respiratoires inférieures s'est révélée être un développement prometteur pour le traitement des maladies respiratoires inflammatoires (Spiekermann, Finn et al. 2002, Bitonti, Dumont et al. 2004, Dumont, Bitonti et al. 2005, Guilleminault, Azzopardi et al. 2014). Dans la lignée de ces études pulmonaires, Heidl et al. ont démontré l'expression *ex vivo* de FcRn dans la muqueuse nasale du cornet inférieur (tissu fixé) (Heidl, Ellinger et al. 2016). Samson et al. ont discuté d'un éventuel transport de l'anticorps monoclonal induit par le FcRn à travers la muqueuse nasale porcine (Samson, Garcia de la Calera et al. 2012) À ce jour, aucune étude n'avait évalué spécifiquement, *in vitro*, la fonction potentielle du FcRn dans la transcytose des IgG par l'épithélium des voies respiratoires nasales humaines. Ainsi le travail de cette thèse était de confirmer *in vitro* l'expression du FcRn au sein de l'épithélium respiratoire nasal chez l'homme et de mettre en évidence la transcytose d'anticorps thérapeutiques à travers l'épithélium respiratoire nasal par l'intermédiaire du FcRn, pré-requis nécessaire à la diffusion locale des biothérapies.

### 5.3.2 Méthodes

L'expression du FcRn a été étudiée dans des cultures primaires de CENH en ALI. L'expression du FcRn a été caractérisée par RT-PCR quantitative, Western Blot et immunomarquage à un stade précoce de culture (J7) mais également à un stade de culture bien différencié (J21). La capacité des CENH à supporter la transcytose des anticorps monoclonaux via le FcRn a été évaluée par un test de transcytose de l'Infliximab à deux temps de culture différents (J7 et J21) et dans deux sens de transport de l'anticorps thérapeutique (du sens apical vers basal et du sens basal vers apical). Une incubation de 4 heures de l'anticorps thérapeutique a été réalisée dans les cultures avec des concentrations croissantes (échelle logarithmique) pour évaluer l'effet dose-réponse. La concentration d'anticorps thérapeutique a été mesurée par test ELISA (lecture en densité optique). Le test de transcytose est présenté en annexe 4.

### 5.3.3 Résultats

Dans ce travail, nous avons démontré l'expression de l'ARNm et de la protéine FcRn dans les cultures de CENH à un stade précoce de culture (J7) mais également à un stade de culture bien différencié (J21). Nous avons rapporté également une forte expression du FcRn dans le cytoplasme des cellules ciliées, des cellules à mucus et des cellules basales par immunohistochimie avec un taux plus élevé de protéines de FcRn dans les cultures bien différenciées. Nous avons également prouvé *in vitro* la transcytose transépithéliale d'un anticorps monoclonal thérapeutique IgG1 avec un effet dose-réponse dans le sens de transport apical vers basal mimant l'effet de l'administration locale d'un anticorps thérapeutique par voie nasale. Ces résultats sont résumés dans ce graphique :



### 5.3.4 Discussion

Dans ce travail de thèse, réalisé en collaboration étroite avec le Dr Valérie Gouilleux-Gruart du laboratoire d'immunologie du CHRU de Tours (UMR CNRS 7292), j'ai rapporté l'expression *in vitro* du FcRn dans notre modèle différencié de culture primaire de CENH issues de polypes et démontré que l'expression du FcRn dépend du degré de différenciation cellulaire. J'ai démontré dans notre modèle un passage transépithélial d'anticorps monoclonal type d'IgG thérapeutique avec une courbe de réponse dépendante de la dose. C'est la première fois que l'expression du FcRn

**et la transcytose d'anticorps monoclonal sont démontrées dans un modèle d'épithélium respiratoire nasal humain *in vitro*. Cette étude qui fait « la preuve du concept » est une condition préalable à l'étude de l'administration nasale d'anticorps monoclonaux dépendante du FcRn.**

### **L'épithélium nasal peut-il être un support pour transcytose d'anticorps monoclonal FcRn dépendante ?**

Le protocole de transcytose utilisé dans cette étude a déjà été décrit et validé dans différentes lignées de cellules épithéliales rénales (IMCD et MDCK) et des lignées de cellules épithéliales de côlon humain (T84 et CaCo-2) selon les mêmes protocoles expérimentaux (Foss, Grevys et al. 2016, Ternant, Arnoult et al. 2016) mais il n'a jamais été étudié dans des cultures primaires de cellules épithéliales respiratoires humaines, en particulier de cellules épithéliales nasales. Dans cette étude, nous avons démontré, pour la première fois, qu'une transcytose d'anticorps monoclonal thérapeutique était possible par le biais d'un modèle *in vitro* d'épithélium nasal polarisé, et élément intéressant, cette transcytose était possible même en présence de mucus. En comparaison à la transcytose *in vitro* dans des lignées de cellules épithéliales coliques (T84) (Foss, Grevys et al. 2016), la transcytose des anticorps monoclonaux dans le sens de transport apical vers basal nécessitait des concentrations plus élevées dans notre travail. Cela pourrait s'expliquer par la présence de mucus à la surface apicale des CENH dans notre modèle de culture, élément dont il faudrait tenir compte pour une utilisation *in vivo*. Par ailleurs, nous avons effectué nos expériences à pH acide car la capacité du FcRn à protéger les IgG du catabolisme intracellulaire et à les transporter à travers les cellules est le résultat d'une interaction spécifique dépendante du pH avec la partie Fc des IgG à pH acide. Le FcRn lie les IgG, intériorisées par pinocytose, dans les endosomes acides, les recycle à la surface des cellules, et les libère à pH neutre. À pH acide dans notre modèle, nous avons observé un transport de l'anticorps monoclonal dépendant de la dose. Le pH de la muqueuse nasale est d'environ 5,5–6,5 (England, Homer et al. 1999) et pourrait donc représenter de façon fiable un organe supplémentaire pour la délivrance non invasive d'agents thérapeutiques.

L'étude de Foss et al. (Foss, Grevys et al. 2016), démontrait déjà un transport transcellulaire spécifique d'IgG induit par le FcRn à travers des cellules T84 polarisées en utilisant un anticorps monoclonal IgG1 humain et avait montré le blocage de la transcytose de l'anticorps monoclonal en utilisant un variant portant des mutations au cœur de l'interaction FcRn, abolissant la liaison de l'anticorps monoclonal au FcRn. Dans notre étude, nous n'avons pas prouvé directement que la transcytose est médiée par le FcRn comme l'ont déjà montré Foss et al., mais nos résultats sont cohérents avec ce mécanisme. Nous avons déduit que la transcytose s'était produite après la détection d'anticorps dans la chambre opposée. Afin de prouver le rôle actif du FcRn, le développement récent d'Efgartigimod (ARGX-113), un fragment Fc dérivé de hIgG1 modifié avec la technologie ABDEG afin de bloquer le recyclage des anticorps par liaison à FcRn, pourrait être utilisé dans des expériences ultérieures (Ulrichs, Guglietta et al. 2018).

### **Quelles sont les perspectives thérapeutiques suggérées par ces résultats ?**

Dans une perspective thérapeutique, ce travail de thèse est une étude préliminaire mais constitue une base solide pour le développement d'une nouvelle voie d'administration des anticorps monoclonaux type IgG: la voie nasale FcRn dépendante.

L'Infliximab a été choisi comme modèle d'anticorps monoclonal thérapeutique dans ce travail de thèse en raison de l'expertise du laboratoire d'immunologie de Tours en matière de transcytose dans des cellules MDCKII transfectées avec le FcRn humain (Ternant, Arnoult et al. 2016). D'autres expériences sont nécessaires pour étudier cette nouvelle voie locale avec les biothérapies qui pourraient avoir une place dans le traitement de la PNS.

Pour aller plus loin encore, Foss proposait déjà dans ses travaux la délivrance efficace de molécules thérapeutiques via FcRn par la **création de molécules de fusion contenant un Fc capable de reconnaître le FcRn, associé à une autre molécule thérapeutique différente** d'une IgG au niveau de tous les sites muqueux contenant un environnement acide (Foss, Grevys et al. 2016). Le nez est donc l'organe idéal pour la diffusion de ces molécules de fusion. Des études récentes montrent le projet de création d'une molécule de fusion pour permettre l'administration ciblée de glucocorticoïdes. Un nouveau lieu pyrophosphate-ester a été découvert pour permettre cette délivrance ciblée de glucocorticoïdes (Stevens, Schleimer et al. 2016). En conclusion, de nouveaux formats d'anticorps monoclonaux tels que les molécules de fusion de Fc anticorps-médicament couplés à des glucocorticoïdes (Ternant, Arnoult et al. 2016) pourraient également être testés pour augmenter l'efficacité d'un traitement standard bien établi dans la PNS ainsi que pour d'autres maladies respiratoires inflammatoires telles que la rhinite allergique, ou même dans l'asthme.

## 5.3.5 Article publié

L'article a été accepté pour publication dans *l'International Journal of Molecular Sciences* le 12 mars 2019



Article

## FcRn-Dependent Transcytosis of Monoclonal Antibody in Human Nasal Epithelial Cells In Vitro: A Prerequisite for a New Delivery Route for Therapy?

Emilie Bequignon<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Christine Dhommée<sup>5</sup>, Christelle Angely<sup>2,3,4</sup>, Lucie Thomas<sup>6</sup>, Mathieu Bottier<sup>2,3,4</sup>, Estelle Escudier<sup>6,7,8</sup>, Daniel Isabey<sup>2,3,4</sup>, André Coste<sup>1,2,3,4</sup>, Bruno Louis<sup>2,3,4</sup>, Jean-François Papon<sup>2,4,9,10,†</sup> and Valérie Gouilleux-Gruart<sup>5,11,†</sup>

<sup>1</sup> AP-HP, Hôpital Henri Mondor et Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil, service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, 94010 Créteil, France; andre.coste@chicreteil.fr

<sup>2</sup> INSERM, U955, 94010 Créteil, France; christelleangely77@gmail.com (C.A.); bottier@wustl.edu (M.B.); daniel.isabey@inserm.fr (D.I.); bruno.louis@inserm.fr (B.L.); jean-francois.papon@aphp.fr (J.-F.P.)

<sup>3</sup> Université Paris-Est, Faculté de Médecine, F-94010 Créteil, France

<sup>4</sup> CNRS, ERL 7240, 94010 Créteil, France

<sup>5</sup> Université de Tours, EA 7501 GICC, F-37032 Tours, France; christine.dhommee@univ-tours.fr (C.D.); valerie.gouilleux@univ-tours.fr (V.G.-G.)

<sup>6</sup> Inserm U933, 75012 Paris, France; lucie.thomas@inserm.fr (L.T.); (estelle.escudier@inserm.fr (E.E.)

<sup>7</sup> Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine 75005 Paris, France

<sup>8</sup> AP-HP Hôpital Armand-Trousseau, Service de génétique et d'embryologie médicale, 75012 Paris, France

<sup>9</sup> AP-HP, Hôpital Bicêtre, Service d'Oto-Rhino-Laryngologie et de Chirurgie cervico-faciale, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>10</sup> Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>11</sup> CHRU de TOURS, Laboratoire d'Immunologie, F-37032 Tours, France

\* Correspondence: [emilie.bequignon@inserm.fr](mailto:emilie.bequignon@inserm.fr); Tel.: +33-1-49-81-24-91; Fax: +33-1-49-81-24-23

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 18 January 2019; Accepted: 12 March 2019; Published: date

**Abstract:** Monoclonal antibodies (mAbs) are promising therapies to treat airway chronic inflammatory disease (asthma or nasal polyps). To date, no study has specifically assessed, in vitro, the potential function of neonatal Fc receptor (FcRn) in IgG transcytosis through the human nasal airway epithelium. The objective of this study was to report the in vitro expression and function of FcRn in nasal human epithelium. FcRn expression was studied in an air–liquid interface (ALI) primary culture model of human nasal epithelial cells (HNEC) from polyps. FcRn expression was characterized by quantitative RT-PCR, western blot, and immunolabeling. The ability of HNECs to support mAb transcytosis via FcRn was assessed by transcytosis assay. This study demonstrates the expression of FcRn mRNA and protein in HNEC. We report a high expression of FcRn in the cytosol of ciliated, mucus, and basal cells by immunohistochemistry with a higher level of FcRn proteins in differentiated HNEC. We also proved in vitro transepithelial delivery of an IgG1 therapeutic mAb with a dose–response curve. This is the first time that FcRn expression and mAb transcytosis has been shown in a model of human nasal respiratory epithelium in vitro. This study is a prerequisite for FcRn-dependent nasal administration of mAbs.

**Keywords:** neonatal Fc receptor; chronic rhinosinusitis with nasal polyps; transcytosis; human nasal epithelial cells; monoclonal antibodies

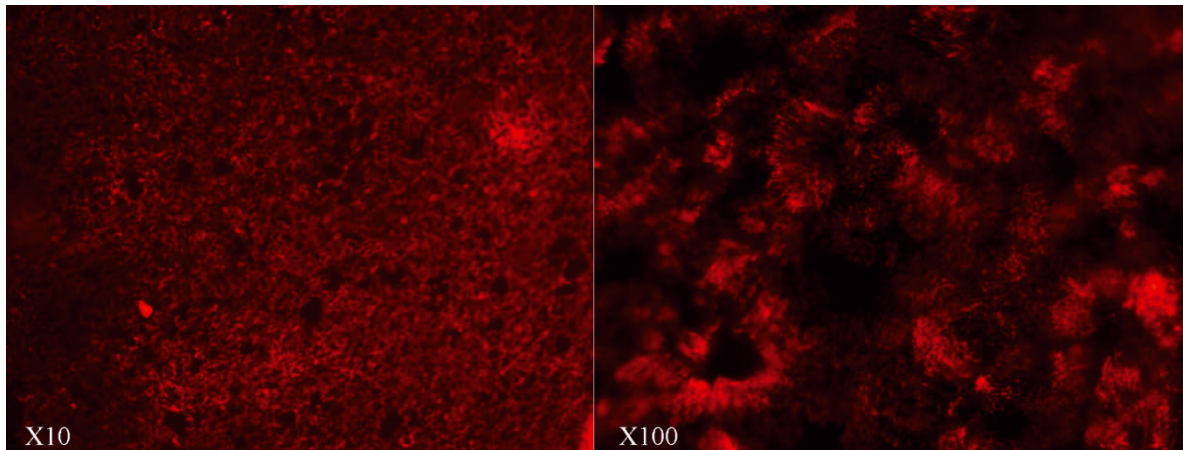
## 1. Introduction

FcRn, or neonatal receptor for the Fc portion of IgG, was first identified in 1964 by Brambell [1]. It belongs to major histocompatibility complex (MHC) class I heterodimeric receptor family and consists of a type I transmembrane heavy chain that non-covalently associates with the soluble light chain,  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m)[2]. In humans, FcRn was initially studied as a transporter of maternal IgG to the fetus. In adults, FcRn is also expressed in a wide variety of organs such as the lung, nose, skin, muscle, kidney, liver, and placenta. FcRn expression is detected in many cell types such as epithelial, endothelial, and hematopoietic cells [3]. In adults, studies have underlined the importance of FcRn in the regulation of serum IgG homeostasis [4–6]. The interaction of FcRn with its two ligands, IgG and albumin, is pH-dependent [7,8]. The binding of IgG and albumin to FcRn at acidic pH protects them from intracellular catabolism and thus prolongs the ligand half-life [7,9–12]. The FcRn recycling pathway is now well described. FcRn is responsible for IgG diversion from lysosomal degradation by an endosomal cellular recycling pathway after FcRn interaction [13]. IgG is taken into the cell by pinocytosis and processed within endosomes at a low pH environment that triggers the binding to FcRn. The routing of the endosomes transports IgG-FcRn complexes either by a transcytosis or recycling route dependent on the cell polarization [14]. A wide range of monoclonal antibodies (mAbs) have recently been developed to treat various cancers and inflammatory, autoimmune, allergic, or infectious diseases [15–17]. To further improve the use of this family of biopharmaceuticals, many parameters are currently being studied—choice of the target, FcRn-dependent and independent pharmacokinetics, and route of administration. While mAbs are usually administered intravenously, some are used subcutaneously [18,19]. Parenteral administration represents a limitation to their therapeutic use and has led to the development of other routes of administration. In mice and monkeys, the delivery of mAbs through the lower airways (aerosols were administered directly into the lungs through an endotracheal tube under general anesthesia) has been shown to be a promising development in the treatment of inflammatory respiratory diseases [20–23]. In line with these lung studies, Heidl et al. demonstrated the *ex vivo* expression of FcRn in nasal mucosa of inferior turbinate (fixed tissue) [24], and Samson et al. discussed FcRn-mediated transport through porcine nasal mucosa [25]. To date, no study has specifically assessed, *in vitro*, the potential function of FcRn in IgG transcytosis through the human nasal airway epithelium. The nasal route could be of great interest to pathologies affecting the upper airways, particularly for the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). The prevalence of CRSwNP ranges from 2% to 4% [26] and this disease is associated in 30% of patients with asthma and aspirin-exacerbated respiratory disease, a condition known as Samter’s triad [27]. In a recent review, Bachert reported a type 2 inflammatory pattern (involving expression of IL-4, -5, and -13 and increased concentrations of IgE) in 85% of patients with CRSwNP in western countries [28]. Some of these biomarkers are potential targets for innovative therapeutic approaches of CRSwNP, including mAbs directed against IgE (omalizumab), IL-5 (mepolizumab and reslizumab), and IL-4/IL-13 (dupilumab) [28–30]. MABs have been tested subcutaneously or intravenously in proof-of-concept studies in patients with CRSwNP with or without asthma, and have demonstrated potential properties in reducing the volume of nasal polyps [28]. In the light of the results obtained in the lower airways, we hypothesized that nasal administration could be an interesting noninvasive alternative to the intravenous route to improve local mAb distribution and/or efficacy for treating CRSwNP. The objective was to evaluate the *in vitro* expression and function of FcRn in nasal epithelial cells. In the first part of this study, we evaluated the *in vitro* expression of FcRn in an air-liquid interface (ALI) model of primary culture of human nasal epithelial cells (HNEC) by quantitative RT-PCR, western blot, and immunolabeling. In the second part of the study, we evaluated the ability of HNEC to support mAb transcytosis.

## 2. Results

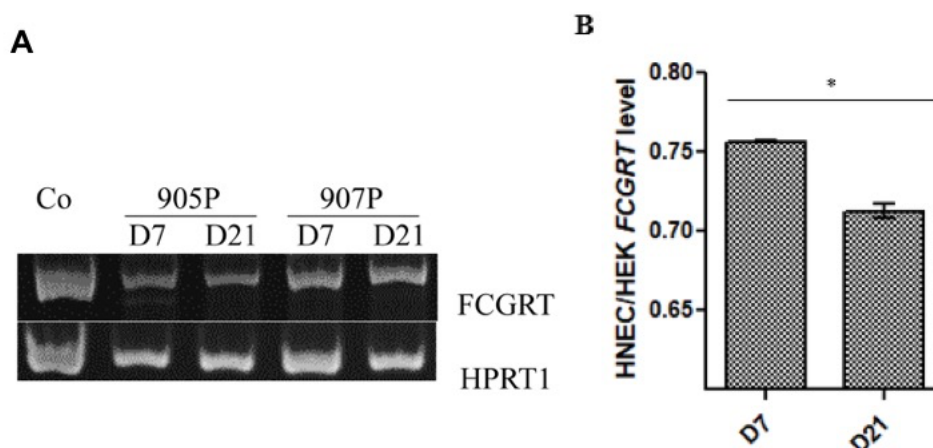
### 2.1. Expression of FcRn in Human Nasal Epithelial Cells (HNECs)

To investigate the possible use of the nasal route for mAb administration, we first evaluated FcRn expression in the HNEC culture, a well-described primary ALI model for nasal epithelium studies. The experiments were performed at the end of the first week (Day 7), when the cells were not yet differentiated, and at the beginning of the fourth week (Day 21) when the ciliated cells were fully differentiated (Figure 1).



**Figure 1.** In vitro differentiation of human nasal epithelial cell in air-liquid interface culture. Immunostaining in transwell inserts after three weeks of culture (Day 21) using the anti- $\beta$ IV tubulin monoclonal antibody (1/500) (Abcam ab-11315). Cilia of a differentiated epithelium are shown in red. (Confocal images:  $\times 10$  (left image) and  $\times 100$  (right image)): ciliated structures were clearly detected on the apical surface of the cells.

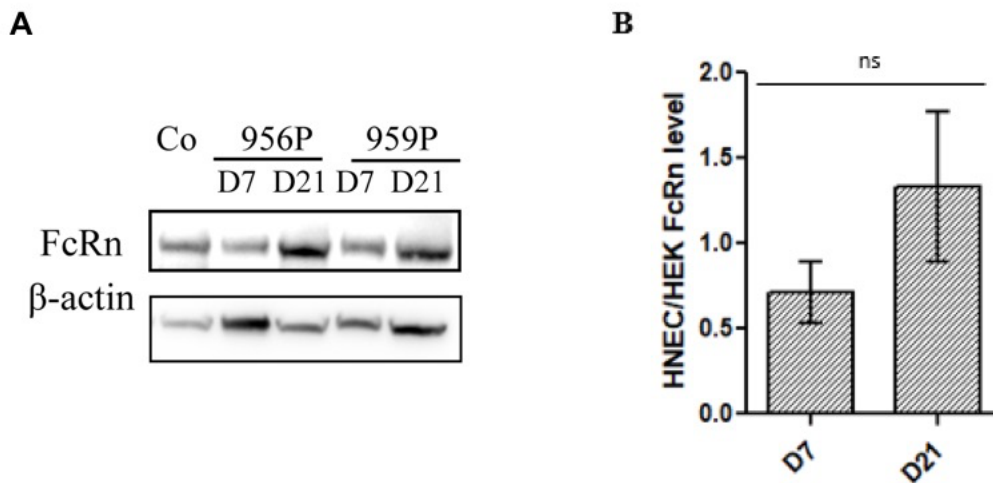
RT-PCR performed in three primary cultures of HNECs showed an amplification of FcRn in the HNECs on both culture time day 7 and on day 21 (Figure 2A). Quantitative PCR showed that *FCGRT* mRNA levels isolated from two patient cells cultured for 21 days were significantly higher on day 7 compared to day 21 in two cell cultures (Figure 2B).



**Figure 2.** FCGRT mRNA expression in air-liquid interface culture of human nasal epithelial cells. RT-PCR with HPRT1 used as housekeeping gene (A) and qRT-PCR (B) showing amplification of FCGRT mRNA isolated from five different cultures (905P, 907P, and 895P for PCR and 954P and 956P for quantitative PCR) of human nasal epithelial cells (HNEC) on day 7 (D7) and day 21 (D21). HEK 293 was

included as positive control (Co). FcRn expression in HNEC were then reported to the expression level of HEK control cell line. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

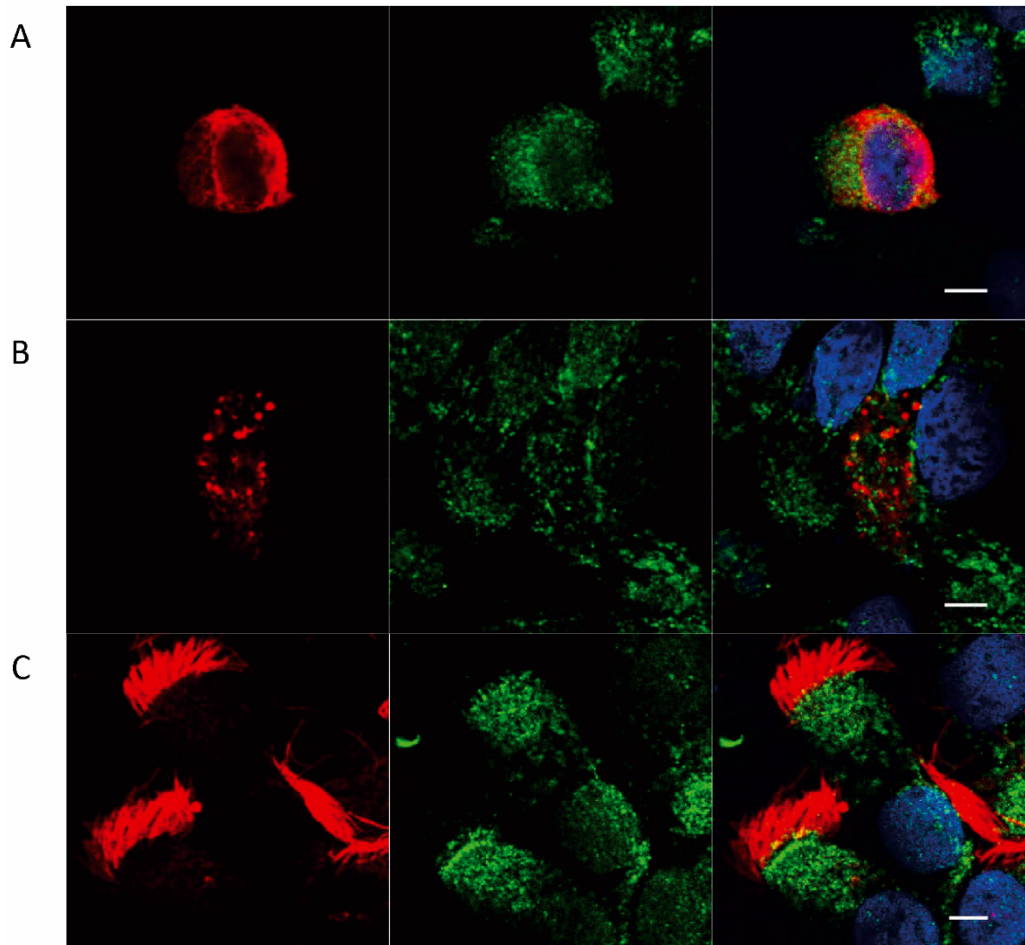
This statement is different to what is observed for FcRn protein expression by western blot. As detected by western blot, FcRn protein was expressed in the HNECs on both day 7 and day 21 culture times in all cultures but with a heterogeneity according to different cultures (no significant difference,  $n = 5$  cultures). (Figure 3). Our findings revealed the presence of a large amount of FcRn protein in the fully differentiated cells compared to our positive control cell line (HEK 293) ( $\times 1.3$  higher than in the HEK 293 control cell line) (Figure 3B). The discrepancies detected between mRNA and protein levels might be explained by their variable stability according to the different cell types and to the cellular differentiation status of the basal cells, goblet cells and ciliated cells.



**Figure 3.** Neonatal Fc receptor (FcRn) protein expression in air-liquid interface culture of human nasal epithelial cells. (A) Western Blot analysis of FcRn expression using anti-FcRn antibody (1/500, Santa Cruz Biotechnology, sc-271745) in HNEC on day 7 (D7) and day 21 (D21) in two out of five representative different cultures (956P and 959P). HEK 293 cell extract was included as positive control (Co).  $\beta$ -actin was used as control for equal protein loading. (B) FcRn expression was normalized on  $\beta$ -actin. FcRn expression in the five cultures of HNEC were then reported to the expression level of HEK control cell line. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ .

## 2.2. Localization of FcRn in HNEC

We further studied the expression of FcRn by immunohistochemistry according to each cell type. We chose cytokeratin 14 staining to identify basal cells as it is one of the most intensely expressed proteins by this cell type [31]. MUC5AC staining was chosen to identify goblet cells as it is the first mucin expressed during *in vitro* mucus differentiation. Finally, acetylated  $\alpha$ -tubulin was selected as a marker of microtubules in ciliated cells. Using these markers, we showed that FcRn is expressed in all epithelial cell types (Figure 4)—homogeneous distribution in the cytosol of basal and goblet cells, and no visible FcRn localization in the mucus vesicles. FcRn was predominantly localized in the apical part of the cytosol at the base of cilia and on the basolateral surface of ciliated cells.

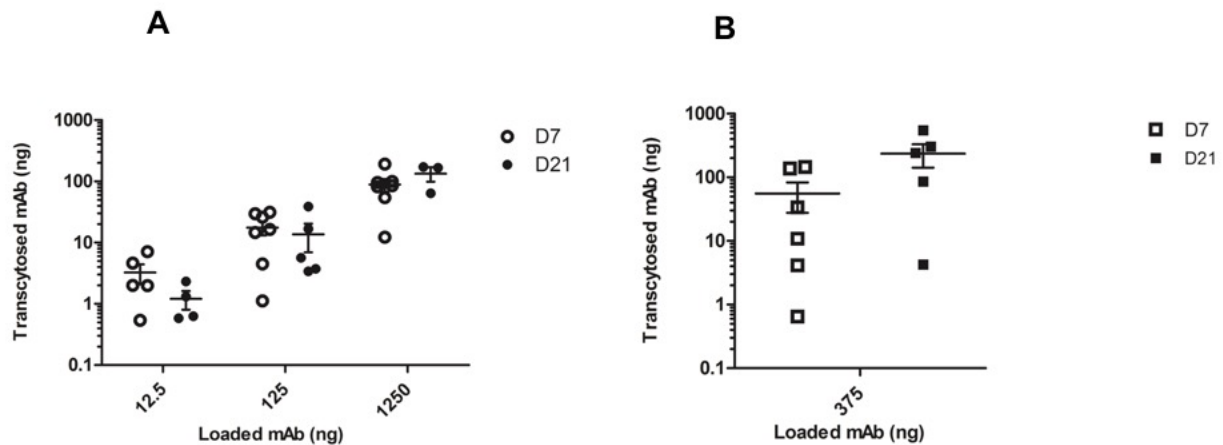


**Figure 4.** FcRn localization in air–liquid interface culture of human nasal epithelial cells on day 21. Cells were co-immunolabeled for FcRn (green) and (A) a basal cell marker, cytokeratin-14 (red), or (B) a goblet cell marker, mucin-5AC (red), or (C) a ciliated cell marker, acetylated  $\alpha$ -tubulin (red); and imaged by confocal microscopy. White scale bars represent 5  $\mu$ m.

### 2.3. *In Vitro* mAb Transcytosis in HNEC ALI Cultures

Once we had demonstrated FcRn expression in our HNEC culture model, we studied the possible transport of IgG mAbs across these polarized cells obtained from seven cultures. The results were expressed as absolute mAb quantities (12.5 to 1250 ng range) to compare apical-to-basal and basal-to-apical transcytosis that require different volumes of mAb solution (see methods section). We also compared mAb transfer according to the degree of HNEC differentiation at day 7 and day 21 (Figure 5). There was no significant difference between transepithelial electrical resistance (TEER) measurement before and after transcytosis assay (data not shown) and in all wells of experiments, no cellular toxicity was observed after a 4-h incubation period at 37 °C with infliximab.

The apical to basal experiment demonstrated effective mAb transfer across the HNECs. MAb transcytosis was detected on both day 7 and day 21 (no significant difference). The absolute quantities of transcytosed mAbs increased with mAb concentration loaded on the apical side with a mean of 3.25, 17.64, and 88.67 ng transcytosed mAb for 12.5, 125, and 1250 ng loaded mAb, respectively, on day 7 (Figure 5A). A basal-to-apical experiment was also performed with 375 ng of mAb in the well confirming mAb transcytosis toward the insert (Figure 5B). We calculated that three times more absolute mAb was required in the apical-to-basal direction compared to the basal-to-apical direction, in order to obtain an equivalent quantity of transcytosed mAbs in both directions.



**Figure 5.** Monoclonal antibody (mAb) transcytosis through air-liquid interface culture of human nasal epithelial cells at day 7 and day 21 of different cell cultures ( $n = 7$ ) (954P, 955P, 956P, 959P, 994P, 997P, and 1002P). Transcytosis was tested in (A) apical-to-basal transport (on day 7—solid circles; on day 21—open circles) or (B) basolateral-to-apical transport (on day 7—solid squares; day 21—open squares). Results are expressed in absolute quantity of mAb in each compartment. Bars represent means  $\pm$  SEM of the different experiments.

Only cultures with a TEER value  $>400 \Omega \text{ cm}^2$  on day 7 and TEER values of  $\sim 600\text{--}800 \Omega \text{ cm}^2$  on day 21 were selected. Values between T0 and 24 h later were not significantly different independently of differentiation status of culture ( $p > 0.4$ ). The mean values of TEER on day 21 were  $691 \pm 64 \Omega \text{ cm}^2$  before and  $704 \pm 33 \Omega \text{ cm}^2$  after experiments. We had already published in vitro electrophysiological modifications in our ALI model of HNEC induced by *aspergillus fumigatus*. There was no difference after recovery for 24 h in ALI culture conditions, returning to values of T0 TEER in fungal filtrates and control wells [32]. According to another study of Lin et al. [33] ALI culture of human bronchial epithelial cell monolayers can be used as an in vitro model for airway drug transport studies when TEER values were higher than  $500 \Omega \text{ cm}^2$ . In their ALI model, when cultures are well differentiated, TEER values reached a relative stability over 6 days (around  $600 \Omega \text{ cm}^2$ ). In the literature, TEER values reflecting substantial barrier functions are typically  $>400 \Omega \text{ cm}^2$ , with pneumacult-ALI medium [34]. In our ALI model with pneumacult-ALI medium, we already characterized TEER values and we observed a stability of values during one week with pneumacult-ALI medium.

### 3. Discussion

Monoclonal antibodies (mAbs) have become an important therapeutic option for several diseases. Innovations in antibody engineering have aimed at improving the pharmacokinetic properties of mAbs. The importance of FcRn in the pharmacokinetics of monoclonal antibodies is now well established [35]. In FcRn-knockout mice, mAbs have shown a plasma/serum half-life of only a few days, which demonstrates the importance of FcRn in their pharmacokinetics [36]. After nonspecific endocytosis into cell, if IgG binds to FcRn in the endosome, the IgG-FcRn complex can be recycled back to the cell membrane with a release of antibody from endosome to plasma or transcytosis to opposite side.

Our primary ALI model of differentiated HNECs is very close to in vivo conditions [37]. It is, thus, a good tool for studying cellular and molecular mechanisms involving airway epithelial cells in many pathologies, and for evaluating toxic or pharmacological agents [38,39]. As nasal epithelium is constantly exposed to air, the ALI system is a polarized model (i.e., apical towards the air and basal towards the medium) that closely mimics the microenvironment and maintains the homeostasis of HNECs as in vivo. It can therefore be said that the model is highly suitable for the study of FcRn expression and mAb transcytosis to test our hypothesis.

In our study we were able to specify the expression of FcRn at the level of the nasal epithelium, at the level of each epithelial cell type, and we were able to highlight the efficiency of mAb transcytosis.

A number of studies have already shown FcRn expression in human epithelial cells, such as in the female genital tract, the lung, the intestinal tract, and in healthy nasal mucosa [20,24,40–42]. Altogether, our cultures of HNECs from NP confirm FcRn expression *in vitro* at both mRNA and protein levels. The discrepancies detected between mRNA and protein levels might be explained by their variable stability according to the various epithelial cell types and to the cellular differentiation status. Another hypothesis could be variable transcription and translation levels in each cell type. In the western blot assay, there was a difference in the density of beta-actin. Particularly, it appears that beta-actin expression, as determined by western blot, was different depending the differentiation state of HNEC. If beta-actin expression changes as HNEC reaches stable differentiated state, then beta-actin expression may not be a suitable normalizing protein control. It could also explain discrepancies between protein and mRNA.

Similar FcRn cytoplasmic distribution has been described in human differentiated bronchial epithelial Calu-3 cell lines [43]. The apical localization of FcRn has previously been described in epithelial cells lining the rat intestine [44].

MAB IgG transcytosis has already been described across different epithelial cell lines (e.g., transfected rat kidney inner medullary collecting duct (IMCD), Madine–Darby canine kidney (MDCK), human colon epithelial cell lines T84, and CaCo-2) according the same experimental protocol [42,45] but it has never been studied in primary human epithelial cells cultures, especially nasal cells. In the same line, the IgG/FcRn or Fc-fused proteins/FcRn transport system is functional in several organs and tissues, such as the lung and intestine [23,46], but it has never been studied in the nasal mucosa.

In this study, we demonstrated, for the first time, that IgG transcytosis of mAbs is possible through an *in vitro* model of nasal epithelium, even in the presence of mucus. Infliximab was chosen as a mAb model due to our expertise in infliximab transcytosis in MDCKII cells transfected with human FcRn [45]. We tested a dose–response effect of mAb transcytosis in the apical-to-basal direction to mimic local administration of mAb in ALI cultures. The basolateral-to-apical transport was tested only in order to confirm data of literature about bidirectional transport of mAbs in other type of epithelial line cells. Basal-to-apical transport was found to be more efficient than apical-to-basal transport. This is in line with previous observations [42,47,48]. Indeed, compared to Foss’ *in vitro* cellular transport assay based on colon epithelial cell lines (T84) [42], we found that apical-to-basal mAb transcytosis required higher mAb concentrations. This could be explained by the presence of mucus on the apical surface in our model of HNEC ALI cultures which may represent a barrier for a mAb-based delivery system. In Foss’ study [42], they already demonstrated specific FcRn-mediated transcellular transport of IgG across polarized T84 cells grown on transwell using monoclonal human IgG1 Ab and a variant with mutations at the core of the FcRn interaction abrogating Ab binding to FcRn. In our study, we have not proved that transcytosis is Fc-mediated, but our results are consistent with that mechanism. In order to prove the rule of FcRn, the recent development of Efgartigimod (ARGX-113), a hIgG1-derived Fc fragment modified with ABDEG technology to block antibody recycling through FcRn binding, could be used in further experiments [49].

We performed our experiments at acidic pH since the ability of FcRn to protect IgG from intracellular catabolism and to transport them across the cells is the result of a specific pH-dependent interaction with the Fc portion of IgG at acidic pH. FcRn binds internalized IgG through pinocytosis in acidic endosomes, recycled it to the cell surface, and released it at neutral pH. At acidic pH, we observed a dose-dependent apical-to-basal transport of mAb. According to Foss, a rational design of Fc-engineered polymeric Fc-fusion molecules together with administration at mucosal sites containing an acidic environment may be an attractive approach for the efficient delivery of therapeutic molecules via FcRn [42]. A recent review underlines that a major process improving the pharmacokinetic properties of mAbs is FcRn-mediated recycling from endosome to plasma, which can be modulated by increased FcRn binding at acidic pH [35]. The nasal mucosa pH is of approximately 5.5–6.5 [50] and could thus represent an additional organ for the non-invasive delivery of therapeutic agents. Furthermore, nasal proteolytic activity is lower than in the intestine and the epithelium is naturally permeable to small peptides and proteins.

## 4. Methods

### 4.1. Primary Cultures of Human Nasal Epithelial Cells (HNEC)

HNECs were isolated from nasal polyps as previously described [51]. NPs were obtained from 20 patients with CRSwNP during ethmoidectomy. All the patients had given informed consent and the study was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01). Briefly, the NPs were immediately placed in DMEM/F-12 supplemented with antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 2.5 g/mL amphotericin B, and 100 mg/mL gentamicin) and transported to the laboratory for processing. Enzymatic digestion [0.1% (wt/vol) pronase in culture medium] was performed for 16 h at 4 °C. The HNECs ( $1 \times 10^6$  cells per well) were then plated in inserts (12-mm Transwell; Costar, MA, USA) with 12-mm-diameter polycarbonate micro-pore membranes (pore size of 0.4  $\mu$ m) coated with type IV collagen (Sigma, Darmstadt, Germany) and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. For the first 24 h, the cells were incubated with 1 mL of DMEM/F-12-antibiotics with 2% Ultrosor G in the lower chamber and DMEM/F-12-antibiotics with 10% FCS in the insert. After 24 h, the culture medium (Stemcell, Pneumacult-ALI medium) in the insert was removed to place the cells at the ALI. The medium in the lower chamber was then changed every other day. The epithelial nature of the cultured cells has been already confirmed by flow cytometric analysis of cytokeratin immunofluorescent labeling showing 95% and 99% of positive cells on days 3 and 7, respectively [37]. The epithelial nature of the cultured cells has previously been well-demonstrated, leading to the use of primary culture of HNEC for several experiments aiming to study molecule expression [51–53]. The HNECs reached a stable differentiated state with the detection of ciliated, secretory, and basal cells during the third week of culture (Day 21) by using the ALI culture medium (Stemcell, Pneumacult -ALI medium) [54].

### 4.2. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from primary cultures of HNECs at two culture times (day 7 and day 21) using the commercially available reagent QIAGEN kit. Human embryonic kidney cells (HEK-293) were used as positive control (ATCC, CRL-1573). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays were performed using an RT kit Promega GO Script Reverse Transcription Detection System (Promega, ref A5000). Quantitative-PCR was carried out on the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Bâle, Swiss). The level of *FCGRT* mRNA was normalized to the geometric mean of mRNAs of three reference genes: TATA-binding protein (*TBP*), 18S, and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*). *FCGRT* expressions in HNEC were then reported to the expression level of HEK control cell line. Gene-specific primer pairs were designed according to published mRNA sequences. The sequences of the primers used in this study were: *FCGRT* F 5'-CCCTGGCTTTTCCGTGCTT-3'; R 5'-TGACGATTTCCACCACGAG-3'; *HPRT1* F 5'-CAT TATGCTGAGGATTTGGAAGG-3'; R 5'-CTTGAGCAC ACAGAGGGCTACA-3'; *TBP* F 5'-TGTATCCACAG TGAATCTTGGT TG-3'; R 5'-GGTTCGTGGCTCTCT TATCCTC-3'. Polymerase chain reaction was performed with PCR kit Promega GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase M7805. PCR reactions were carried out using 2 with: 0 ng cDNA as a template, 0.2  $\mu$ M each of forward and reverse primer, and 1 $\times$  SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc, Kusatsu, Japan.). Each reaction was performed in triplicate. The thermal protocol consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 30 s followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 5 s and primer annealing and extension at 60 °C for 20 s. Fluorescence was read at 60 °C during the annealing and extension step with an additional step (heating at 82 °C for 15 s) to record the fluorescence.

### 4.3. Western Blot

Primary Cultures of HNEC were homogenized in 200  $\mu$ L RIPA buffer (5 with: 0 mM Tris-HCl pH7.4, 15 with: 0 mM NaCl, with: 1 mM EDTA, 1% Na-desoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% NP-40) containing protease inhibitors. Insoluble material was removed by centrifugation at 12,000 $\times$  g for 10 min at 4 °C. Protein concentrations were determined using Bradford protein assay

(Sigma-Aldrich, B6916, Darmstadt, Germany). Lysates of the HNEC cultures (20  $\mu$ g) were separated on a NUPAGE 4–12% Bis-Tris gel (Life Technologies, Carlsbad, United States) and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in PBS and then incubated with mouse anti-FcRn Ab (1/500) (Santa Cruz Biotechnology, sc-271745). Anti- $\beta$ -actin (1/5000) (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778, Dallas, United States) was used as a loading control antibody. After incubation with anti-mouse conjugated-HRP antibody, the membranes were developed using an enhanced chemiluminescence western blotting detection reagent (GE Healthcare, Chicago, United States). HEK 293 cell lysates were included as positive control. Densitometry of the bands was quantified using ImageJ. FcRn expression was normalized on  $\beta$ -actin and HNEC were then reported to the expression level of HEK control cell line.

#### 4.4. Immunohistochemical Analysis

FcRn localization in HNEC cultures was characterized by immunolabeling using anti-FcRn (1/100) (Novus Biologicals cat. number NBP1-89128). Epithelial cells were collected by scraping the surface of the cell layers and cytocentrifuging them onto glass slides (700 rpm). They were then air dried and directly coimmunostained as described below. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, washed three times with PBS ++ (i.e., PBS supplemented with 0.4 with: 9 mM MgCl<sub>2</sub> and 0. with: 9 mM CaCl<sub>2</sub>), incubated for 10 min with PBS++ NH<sub>4</sub>Cl 5 with: 0 mM and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min. After rinsing twice with PBS++, the cells were incubated with rabbit polyclonal anti-FcRn antibody (Novus Biologicals cat. number NBP1-89128) (1 h) followed by an incubation with a goat anti-rabbit Alexa Fluor- 488 antibody (Invitrogen A11070) (1 h). They were then incubated either with mouse monoclonal anti-cytokeratin 14 (CellMarque 314M-14, 1/300) as a basal cell marker, mouse monoclonal anti-mucin-5AC (Abcam ab3649, 1/400) as a goblet cell marker, or mouse monoclonal anti-acetylated  $\alpha$ -tubulin (Abcam ab24610, 1/700) as a ciliated cell marker, before being revealed by a secondary goat anti-mouse Alexa Fluor- 594 antibody (Invitrogen A11032). All the antibodies were incubated with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in PBS++. The cells were finally washed three times with PBS++, mounted in ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade Reagent with DAPI (Cell Signaling #8961), and imaged on a Zeiss LSM 700 scanning laser confocal microscope (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Two negative controls were performed either by omitting the primary antibody or by using non-immune mouse serum.

#### 4.5. Transcytosis Assay

We transposed a transcytosis protocol developed in human FcRn-transfected MDCKII cells using infliximab [45]. Infliximab was chosen as a mAb model due to our expertise in infliximab transcytosis in MDCKII cells transfected with human FcRn. The basal and apical sides of the inserts were washed twice with HBSS. Transepithelial electrical resistance (TEER) was monitored the day before the experiment using a MILLICELL-ERS-2 V-ohm meter (MILLIPORE) with a TEER value of ~600–800  $\Omega$ ·cm<sup>2</sup> to check the electrophysiological properties of the ALI cell cultures. In the literature, TEER values reflecting substantial barrier function are typically >400  $\Omega$  cm<sup>2</sup>, with Pneumacult-ALI medium [34]. Transcytosis experiments were performed either in the apical-to-basal direction or in the basal-to-apical direction. In the apical-to-basal transcytosis protocol, HBSS was buffered to pH 6.0 by the addition of MES buffer (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in the upper chamber where the mAb was added, and to pH 7.4 by addition of HEPES buffer (Eurobio ingen, Les Ulis, France) in the lower chamber. After 30 min of incubation in these conditions, the volume of infliximab solution, added in the upper chamber, was 250  $\mu$ L HBSS-MES (pH 6) for the apical-to-basal transcytosis. In the basal-to-apical transcytosis experiments, 750  $\mu$ L of infliximab solution, was added in the lower chamber (pH 6). After a 4 h incubation period at 37 °C, as previously described [42], the medium was harvested (from either the basal or apical chamber, according to the experiment) to measure the infliximab concentration, using a validated ELISA assay [55]. Foss et al. [42] already reported in vitro experiments of transcytosis based

on the human epithelial cell line T84. In this *in vitro* study, samples at 0, 1, 2, and 4 h were collected from the opposite side of the monolayer. The authors had already determined a time response effect with an optimal transcytosis time observed at 4 h. Therefore, we set the transcytosis time in our own experiments at 4 h. A dose–response curve was obtained by testing infliximab at concentrations of 50 µg/mL, 500 µg/mL, and 5000 µg/mL (representing 12.5, 125, and 1250 ng absolute values added in the upper chamber of well, respectively) in the apical-to-basal transcytosis experiments. In the basal-to-apical transcytosis experiments, the absolute value of 375 ng of infliximab (added in the lower chamber) was tested to confirm findings from previous studies. These ranges of concentrations were chosen according to previous studies [42]. Each mAb concentration was tested in triplicate. The experiments were performed in poorly differentiated (day 7) and fully differentiated (day 21) cultures to evaluate if the functionality of FcRn in HNEC was dependent on the cellular differentiation status. After each transcytosis experiment, we assessed cellular toxicity using both the TEER measurement for monolayer permeability and trypan blue exclusion for cellular viability.

#### 4.6. Statistical Analysis

The Mann-Whitney test was used to compare the quantitative values of FcRn expression (evaluated by qRT-PCR and western blot) and the absolute quantities of transcytosed mAbs between experiments performed on day 7 and on day 21. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 (Inc., La Jolla, San Diego, CA, USA) software package. The alpha risk was set at 5%. The level of significance is indicated in the figures as \* for a  $p \leq 0.05$ , ns: non-significant.

#### 4.7. Ethics Approval and Consent to Participate

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the local ethics committee (CPP IDF X 2016-01-01).

### 5. Conclusions

In this study, we report *in vitro* FcRn expression in HNEC in a differentiated model of ALI primary culture and demonstrate that FcRn expression is dependent on the degree of cell differentiation. Our major finding is that we demonstrate in our model a transepithelial passage of therapeutic IgG mAb with a dose-dependent response curve. This is the first time that FcRn expression and mAb transcytosis has been shown in a primary culture of human nasal cells from NP. From a drug-delivery perspective, this study is a prerequisite for FcRn-dependent nasal administration of therapeutic mAbs. Further experiments are required to study this new local pathway with innovative mAb treatments for CRSwNP (i.e., omalizumab, mepolizumab, reslizumab, and dupilumab). In addition, new mAb formats such as antibody-drug conjugates coupled to glucocorticoids [56] could also be tested to increase the effectiveness of an established treatment standard for CRSwNP as well as for other nasal diseases such as allergic rhinitis which affects 400 million people throughout the world.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.B., E.E., D.I., A.C., J.-F.P., and V.G.-G.; data curation, E.B., C.D., C.A., and L.T.; formal analysis, E.B., C.D., C.A., L.T., M.B., J.-F.P., and V.G.-G.; methodology, E.B., C.D., L.T., M.B., E.E., A.C., B.L., J.-F.P., and V.G.-G.; project administration, A.C., B.L., J.-F.P., and V.G.-G.; resources, V.G.-G.; software, C.D., B.L., and V.G.-G.; supervision, B.L., J.-F.P., and V.G.-G.; validation, B.L., J.-F.P., and V.G.-G.; visualization, J.F.P., V.G.-G.; writing—original draft, E.B., E.E., A.C., B.L., J.-F.P., and V.G.-G.; writing—review and editing, E.B., E.E., A.C., J.-F.P., C.D. and V.G.-G.

**Funding:** This work was supported in part by a public grant overseen by the French National Research Agency as part of the “Investissements d’Avenir” program (reference: ANR-10-LABX-53-01).

**Acknowledgments:** We thank and Patricia Zadigue for technical assistance. We thank M. Garfa-Traoré at Imagine Institute Cell Imaging Platform for assistance in confocal microscopy. We thank Felicity Neilson for linguistic revision.

Conflicts of Interest: None of the authors have any conflict of interest in connection to this study.

## Abbreviations:

|        |  |
|--------|--|
| FcRn   | neonatal Fc receptor   |
| HNEC   | Human Nasal Epithelial Cells   |
| NP     | Nasal polyps   |
| CRSwNP | Chronic rhinosinusitis with nasal polyps                                   |
| mAbs   | Monoclonal antibodies  |
| ALI    | air-liquid interface   |
| TEER   | Transepithelial electrical resistance                                      |
| β2m    | β2-microglobulin   |
| PBS++  | PBS supplemented with 0.49mM MgCl <sub>2</sub> and 0.9mM CaCl <sub>2</sub> |

## References

1. Brambell, F.W.; Hemmings, W.A.; Morris, I.G. A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism. *Nature* **1964**, *203*, 1352–1354.
2. Simister, N.E.; Mostov, K.E. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* **1989**, *337*, 184–187, doi:10.1038/337184a0.
3. Latvala, S.; Jacobsen, B.; Otteneder, M.B.; Herrmann, A.; Kronenberg, S. Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **2017**, *65*, 321–333, doi:10.1369/0022155417705095.
4. Ghetie, V.; Popov, S.; Borvak, J.; Radu, C.; Matesoi, D.; Medesan, C.; Ober, R.J.; Ward, E.S. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 637–640, doi:10.1038/nbt0797-637.
5. Junghans, R.P.; Anderson, C.L. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5512–5516.
6. Wani, M.A.; Haynes, L.D.; Kim, J.; Bronson, C.L.; Chaudhury, C.; Mohanty, S.; Waldmann, T.A.; Robinson, J.M.; Anderson, C.L. Familial hypercatabolic hypoproteinemia caused by deficiency of the neonatal Fc receptor, FcRn, due to a mutant beta2-microglobulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5084–5089, doi:10.1073/pnas.0600548103.
7. Raghavan, M.; Bonagura, V.R.; Morrison, S.L.; Bjorkman, P.J. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry* **1995**, *34*, 14649–14657.
8. Chaudhury, C.; Brooks, C.L.; Carter, D.C.; Robinson, J.M.; Anderson, C.L. Albumin binding to FcRn: Distinct from the FcRn-IgG interaction. *Biochemistry* **2006**, *45*, 4983–4990, doi:10.1021/bi052628y.
9. Datta-Mannan, A.; Witcher, D.R.; Tang, Y.; Watkins, J.; Wroblewski, V.J. Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1709–1717, doi:10.1074/jbc.M607161200.
10. Jones, E.A.; Waldmann, T.A. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* **1972**, *51*, 2916–2927, doi:10.1172/JCI107116.
11. Oganessian, V.; Damschroder, M.M.; Cook, K.E.; Li, Q.; Gao, C.; Wu, H.; Dall'Acqua, W.F. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 7812–7824, doi:10.1074/jbc.M113.537563.
12. Anderson, C.L.; Chaudhury, C.; Kim, J.; Bronson, C.L.; Wani, M.A.; Mohanty, S. Perspective-- FcRn transports albumin: Relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol.* **2006**, *27*, 343–348, doi:10.1016/j.it.2006.05.004.
13. Roopenian, D.C.; Christianson, G.J.; Sproule, T.J.; Brown, A.C.; Akilesh, S.; Jung, N.; Petkova, S.; Avanesian, L.; Choi, E.Y.; Shaffer, D.J.; et al. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3528–3533.
14. Ward, E.S.; Zhou, J.; Ghetie, V.; Ober, R.J. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int. Immunol.* **2003**, *15*, 187–195.

15. Lobo, E.D.; Hansen, R.J.; Balthasar, J.P. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 2645–2668, doi:10.1002/jps.20178.
16. Nissim, A.; Chernajovsky, Y. Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, 1doi:10.1007/978-3-540-73259-4\_1.
17. Reichert, J.M.; Rosensweig, C.J.; Faden, L.B.; Dewitz, M.C. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1073–1078, doi:10.1038/nbt0905-1073.
18. Aue, G.; Lindorfer, M.A.; Beum, P.V.; Pawluczko, A.W.; Vire, B.; Hughes, T.; Taylor, R.P.; Wiestner, A. Fractionated subcutaneous rituximab is well-tolerated and preserves CD20 expression on tumor cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* **2010**, *95*, 329–332, doi:10.3324/haematol.2009.012484.
19. Kagan, L.; Mager, D.E. Mechanisms of subcutaneous absorption of rituximab in rats. *Drug Metab. Dispos.* **2013**, *41*, 248–255, doi:10.1124/dmd.112.048496.
20. Spiekermann, G.M.; Finn, P.W.; Ward, E.S.; Dumont, J.; Dickinson, B.L.; Blumberg, R.S.; Lencer, W.I. Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: Functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 303–310.
21. Guilleminault, L.; Azzopardi, N.; Arnoult, C.; Sobilo, J.; Herve, V.; Montharu, J.; Guillon, A.; Andres, C.; Herault, O.; Le Pape, A.; et al. Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system. *J. Control. Release* **2014**, *196*, 344–354, doi:10.1016/j.jconrel.2014.10.003.
22. Bitonti, A.J.; Dumont, J.A.; Low, S.C.; Peters, R.T.; Kropp, K.E.; Palombella, V.J.; Stattel, J.M.; Lu, Y.; Tan, C.A.; Song, J.J.; et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9763–9768, doi:10.1073/pnas.0403235101.
23. Dumont, J.A.; Bitonti, A.J.; Clark, D.; Evans, S.; Pickford, M.; Newman, S.P. Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway. *J. Aerosol Med.* **2005**, *18*, 294–303, doi:10.1089/jam.2005.18.294.
24. Heidl, S.; Ellinger, I.; Niederberger, V.; Walzl, E.E.; Fuchs, R. Localization of the human neonatal Fc receptor (FcRn) in human nasal epithelium. *Protoplasma* **2016**, *253*, 1557–1564, doi:10.1007/s00709-015-0918-y.
25. Samson, G.; Garcia de la Calera, A.; Dupuis-Girod, S.; Faure, F.; Decullier, E.; Paintaud, G.; Vignault, C.; Scoazec, J.Y.; Pivot, C.; Plauchu, H.; et al. Ex vivo study of bevacizumab transport through porcine nasal mucosa. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 465–469, doi:10.1016/j.ejpb.2011.11.004.
26. Fokkens, W.J.; Lund, V.J.; Mullol, J.; Bachert, C.; Alobid, I.; Baroody, F.; Cohen, N.; Cervin, A.; Douglas, R.; Gevaert, P.; et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. *Rhinol. Suppl.* **2012**, *23*, 3 p preceding table of contents, 1-298.
27. Settipane, G.A. Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc.* **1996**, *17*, 231–236.
28. Bachert, C.; Gevaert, P.; Hellings, P. Biotherapeutics in Chronic Rhinosinusitis with and without Nasal Polyps. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2017**, doi:10.1016/j.jaip.2017.04.024.
29. Willson, T.J.; Naclerio, R.M.; Lee, S.E. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Nasal Polyps. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **2017**, *37*, 357–367, doi:10.1016/j.iac.2017.01.008.
30. Chiarella, S.E.; Sy, H.; Peters, A.T. Monoclonal antibody therapy in sinonasal disease. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2017**, *31*, 93–95, doi:10.2500/ajra.2017.31.4412.
31. Lazard, D.S.; Moore, A.; Hupertan, V.; Martin, C.; Escabasse, V.; Dreyfus, P.; Burgel, P.R.; Amselem, S.; Escudier, E.; Coste, A. Muco-ciliary differentiation of nasal epithelial cells is decreased after wound healing in vitro. *Allergy* **2009**, *64*, 1136–1143, doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02003.x.
32. Botterel, F.; Cordonnier, C.; Barbier, V.; Wingerstmann, L.; Liance, M.; Coste, A.; Escudier, E.; Bretagne, S. *Aspergillus fumigatus* causes in vitro electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells. *Histol. Histopathol.* **2002**, *17*, 1095–1101, doi:10.14670/HH-17.1095.
33. Lin, H.; Li, H.; Cho, H.J.; Bian, S.; Roh, H.J.; Lee, M.K.; Kim, J.S.; Chung, S.J.; Shim, C.K.; Kim, D.D. Air-liquid interface (ALI) culture of human bronchial epithelial cell monolayers as an in vitro model for airway drug transport studies. *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 341–350, doi:10.1002/jps.20803.
34. Prince, O.A.; Krunkosky, T.M.; Sheppard, E.S.; Krause, D.C. Modelling persistent *Mycoplasma pneumoniae* infection of human airway epithelium. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, doi:10.1111/cmi.12810.

35. Haraya, K.; Tachibana, T.; Igawa, T. Improvement of pharmacokinetic properties of therapeutic antibodies by antibody engineering. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2018**, 10.1016/j.dmpk.2018.10.003, doi:10.1016/j.dmpk.2018.10.003.
36. Roopenian, D.C.; Christianson, G.J.; Proetzel, G.; Sproule, T.J. Human FcRn Transgenic Mice for Pharmacokinetic Evaluation of Therapeutic Antibodies. *Methods Mol. Biol.* **2016**, 1438, 103–114, doi:10.1007/978-1-4939-3661-8\_6.
37. Papon, J.F.; Coste, A.; Gendron, M.C.; Cordonnier, C.; Wingerstmann, L.; Peynegre, R.; Escudier, E. HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps. *Laryngoscope* **2002**, 112, 2067–2075, doi:10.1097/00005537-200211000-00030.
38. Secondo, L.E.; Liu, N.J.; Lewinski, N.A. Methodological considerations when conducting in vitro, air-liquid interface exposures to engineered nanoparticle aerosols. *Crit. Rev. Toxicol.* **2017**, 47, 225–262, doi:10.1080/10408444.2016.1223015.
39. Li, X. In vitro toxicity testing of cigarette smoke based on the air-liquid interface exposure: A review. *Toxicol. In Vitro* **2016**, 36, 105–113, doi:10.1016/j.tiv.2016.07.019.
40. Israel, E.J.; Taylor, S.; Wu, Z.; Mizoguchi, E.; Blumberg, R.S.; Bhan, A.; Simister, N.E. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* **1997**, 92, 69–74.
41. Li, Z.; Palaniyandi, S.; Zeng, R.; Tuo, W.; Roopenian, D.C.; Zhu, X. Transfer of IgG in the female genital tract by MHC class I-related neonatal Fc receptor (FcRn) confers protective immunity to vaginal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 4388–4393, doi:10.1073/pnas.1012861108.
42. Foss, S.; Grevys, A.; Sand, K.M.; Bern, M.; Blundell, P.; Michaelsen, T.E.; Pleass, R.J.; Sandlie, I.; Andersen, J.T. Enhanced FcRn-dependent transepithelial delivery of IgG by Fc-engineering and polymerization. *J. Control. Release* **2016**, 223, 42–52, doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.033.
43. Vllasaliu, D.; Alexander, C.; Garnett, M.; Eaton, M.; Stolnik, S. Fc-mediated transport of nanoparticles across airway epithelial cell layers. *J. Control. Release* **2012**, 158, 479–486, doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.009.
44. Tian, Z.; Sutton, B.J.; Zhang, X. Distribution of rat neonatal Fc receptor in the principal organs of neonatal and pubertal rats. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2013**, 10.3109/10799893.2013.865745, doi:10.3109/10799893.2013.865745.
45. Ternant, D.; Arnoult, C.; Pugniere, M.; Dhomme, C.; Drocourt, D.; Perouzel, E.; Passot, C.; Baroukh, N.; Mulleman, D.; Tiraby, G.; et al. IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding. *J. Immunol.* **2016**, 196, 607–613, doi:10.4049/jimmunol.1501780.
46. Sockolosky, J.T.; Szoka, F.C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 91, 109–124, doi:10.1016/j.addr.2015.02.005.
47. Claypool, S.M.; Dickinson, B.L.; Wagner, J.S.; Johansen, F.E.; Venu, N.; Borawski, J.A.; Lencer, W.I.; Blumberg, R.S. Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcγ-receptor. *Mol. Biol. Cell* **2004**, 15, 1746–1759, doi:10.1091/mbc.E03-11-0832.
48. Dickinson, B.L.; Badizadegan, K.; Wu, Z.; Ahouse, J.C.; Zhu, X.; Simister, N.E.; Blumberg, R.S.; Lencer, W.I. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J. Clin. Investig.* **1999**, 104, 903–911, doi:10.1172/JCI6968.
49. Ulrichs, P.; Guglietta, A.; Dreier, T.; van Bragt, T.; Hanssens, V.; Hofman, E.; Vankerckhoven, B.; Verheesen, P.; Ongenaes, N.; Lykhopiy, V.; et al. Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. *J. Clin. Investig.* **2018**, 128, 4372–4386, doi:10.1172/JCI97911.
50. England, R.J.; Homer, J.J.; Knight, L.C.; Ell, S.R. Nasal pH measurement: A reliable and repeatable parameter. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **1999**, 24, 67–68.
51. Coste, A.; Brugel, L.; Maitre, B.; Boussat, S.; Papon, J.F.; Wingerstmann, L.; Peynegre, R.; Escudier, E. Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor. *Eur. Respir. J.* **2000**, 15, 367–372.
52. Forero, A.; Fenstermacher, K.; Wohlgemuth, N.; Nishida, A.; Carter, V.; Smith, E.A.; Peng, X.; Hayes, M.; Francis, D.; Treanor, J.; et al. Evaluation of the innate immune responses to influenza and live-attenuated influenza vaccine infection in primary differentiated human nasal epithelial cells. *Vaccine* **2017**, 35, 6112–6121, doi:10.1016/j.vaccine.2017.09.058.
53. Ramanathan, M., Jr.; Lee, W.K.; Dubin, M.G.; Lin, S.; Spannhake, E.W.; Lane, A.P. Sinonasal epithelial cell expression of toll-like receptor 9 is decreased in chronic rhinosinusitis with polyps. *Am. J. Rhinol.* **2007**, 21, 110–116.

54. Cao, H.; Ouyang, H.; Grasemann, H.; Bartlett, C.; Du, K.; Duan, R.; Shi, F.; Estrada, M.; Seigel, K.E.; Coates, A.L.; et al. Transducing Airway Basal Cells with a Helper-Dependent Adenoviral Vector for Lung Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* **2018**, *29*, 643–652, doi:10.1089/hum.2017.201.
55. Ternant, D.; Mulleman, D.; Degenne, D.; Willot, S.; Guillaumin, J.M.; Watier, H.; Goupille, P.; Paintaud, G. An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther. Drug Monit.* **2006**, *28*, 169–174, doi:10.1097/01.ftd.0000189901.08684.4b.
56. Kern, J.C.; Cancilla, M.; Dooney, D.; Kwasnjuk, K.; Zhang, R.; Beaumont, M.; Figueroa, I.; Hsieh, S.; Liang, L.; Tomazela, D.; et al. Discovery of Pyrophosphate Diesters as Tunable, Soluble, and Bioorthogonal Linkers for Site-Specific Antibody-Drug Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1430–1445, doi:10.1021/jacs.5b12547.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

---

## Synthèse et discussion générale

---

## 6. Synthèse et discussion générale

---

Les objectifs de cette thèse étaient de tenter de répondre à trois questions sur la physiopathologie de la PNS et d'en dégager des pistes thérapeutiques :

- Existe-t-il *ex vivo* une altération de l'efficacité du battement ciliaire dans la polypose nasosinusienne pouvant entretenir le processus inflammatoire et diminuer l'efficacité de la barrière épithéliale contre les agressions extérieures ?
- Quelle est l'influence *in vitro* des cytokines en particuliers l'IL-6 sur les processus de réparation épithéliale après blessure en particulier la migration cellulaire, la prolifération et différenciation cellulaire épithéliale et le battement ciliaire ?
- Quelle est l'expression et la fonction *in vitro* du FcRn, le Récepteur néonatal pour le Fragment Constant (Fc) des Immunoglobulines de type IgG comme support de la diffusion locale des biothérapies ?

i) Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence une altération de l'efficacité du battement ciliaire dans la PNS grâce à un nouvel outil de suivi de microbilles le long de la bordure ciliée par vidéomicroscopie à haute vitesse. Cette étude a constitué la première application clinique de cet outil. La baisse d'efficacité du battement ciliaire était associée à une fréquence de battement conservée et à une diminution de 50% de la longueur de l'onde métachrone traduisant une altération de la coordination du battement. La PNS serait donc probablement une maladie acquise de l'épuration muco-ciliaire, soulignant l'intérêt déjà démontré en clinique des irrigations nasales au sérum salé. Ces résultats soulèvent, parmi plusieurs hypothèses, le rôle du microenvironnement inflammatoire et donc des cytokines. L'exposition des cellules épithéliales à une cytokine déjà impliquée dans la physiopathologie de la PNS, l'IL-6, a provoqué une accélération de la fréquence du battement ciliaire et de l'augmentation de la longueur d'onde de l'onde métachrone mais sans amélioration objective de l'index d'efficacité du battement.

ii) Dans la physiopathologie de la PNS, le mécanisme initial de la formation de polypes pourrait être une rupture de la continuité épithéliale et de la membrane basale avec déclenchement d'un processus inflammatoire qui va ensuite s'auto-entretenir. Par ailleurs, le microenvironnement inflammatoire dans les polypes produit localement des facteurs d'agression pour l'épithélium. Certaines des dysfonctions épithéliales semblent favorisées par les facteurs inflammatoires présents dans la PNS. Le rôle spécifique de chaque interleukine dans la dysrégulation épithéliale est cependant encore mal caractérisé. L'IL-6, en particulier, est une cytokine dont l'implication est très bien décrite dans les processus de tumorigénèse. Contrairement aux théories séparant les 2 types de réponse inflammatoire (Th1 versus Th2), l'IL-6 ne serait pas seulement impliquée dans la réponse inflammatoire de type Th1 mais

également participerait à la réponse Th2 qui reste prédominante dans la PNS dans la population caucasienne. Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle de l'IL-6 dans la réparation d'une blessure épithéliale. L'IL-6 accélérerait de manière significative la vitesse de fermeture d'une blessure épithéliale *in vitro*. Après la fermeture de la blessure, l'IL-6 entraînait une augmentation du nombre de noyaux à un stade tardif de la réparation, suggérant un mécanisme de prolifération cellulaire. A contrario, d'autres cytokines impliquées dans la physiopathologie de la PNS (IL-5, IL-9, IL-10) n'ont eu aucun effet sur la réparation épithéliale. Ces travaux suggèrent un rôle important de l'IL-6 dans la physiopathologie de la PNS. Le potentiel rôle majeur de l'IL-6 a été souligné ces dernières années dans la physiopathologie de l'asthme. Cependant, le mécanisme moléculaire exact de l'implication de l'IL-6 dans la pathogenèse de l'asthme reste largement inconnu et la principale source cellulaire d'IL-6 pathogène n'a pas encore été définie (Gubernatorova, Gorshkova et al. 2018).

iii) Les thérapies monoclonales émergentes dans la PNS étant très prometteuses, nous avons voulu mener, dans la troisième partie de ma thèse, une étude sur le potentiel des cellules épithéliales à « transporter » un anticorps monoclonal thérapeutique. Mes travaux ont pu mettre en évidence l'expression et la probable fonctionnalité du FcRn au niveau de la cellule épithéliale, comme support de la diffusion locale des biothérapies. L'intérêt potentiel des biothérapies véhiculées via le FcRn est de pouvoir cibler la cellule épithéliale dont nous venons de voir le rôle important dans la physiopathologie de la PNS. Le FcRn a un impact important sur la biodistribution et l'extension de la demi-vie des agents thérapeutiques. Mes travaux ont permis de confirmer l'expression de l'ARNm et de la protéine du FcRn au niveau de l'épithélium nasal humain et ont surtout montré la possibilité de transcytose d'une IgG thérapeutique à travers la cellule épithéliale nasale polarisée de versant apical vers le pôle baso-latéral. Ces résultats constituent le pré-requis pour l'éventuelle administration locale des thérapies monoclonales dans la PNS. Au-delà des progrès que cela pourrait constituer dans la thérapeutique de la PNS, l'administration des thérapies monoclonales pour d'autres maladies inflammatoires, auto-immunes ou cancéreuses pourrait être réalisée par voie nasale plutôt que les voies d'administration actuellement usitées sous-cutanées et intraveineuses qui restent contraignantes.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une communication dans un congrès international (congrès européen de l'European Rhinologic Society) et d'une communication au congrès national de la Société Française d'ORL. Un article est publié, les deux autres sont soumis à des revues internationales indexées.

---

## Conclusion et perspectives

---

## 7. Conclusion et perspectives

---

En conclusion, nous avons pu voir à travers la littérature l'implication majeure de la cellule épithéliale dans la physiopathologie de la PNS, elle nous semble confirmée à travers les travaux présentés dans cette Thèse. Les thérapies actuelles et futures ciblent, avant tout, et à juste titre les cellules de l'inflammation, au premier rang desquelles le polynucléaire éosinophile. L'épithélium ne doit cependant pas être négligé, à la fois comme cible thérapeutique, mais aussi comme barrière, pouvant favoriser le transport de molécules thérapeutiques administrées par voie nasale.

**Ces travaux laissent envisager des développements futurs dans la thématique abordée dans cette Thèse :**

- i) Poursuite de la caractérisation des dysrégulations épithéliales liées à la réparation après blessure et de la caractérisation des propriétés biomécaniques intracellulaires (rigidité du cytosquelette, perméabilité cellulaire) et enfin des interactions extracellulaires (forces d'adhésion cellules-cellules et cellule-matrice extra-cellulaire)
- ii) Poursuite de la caractérisation de l'effet de l'IL-6 et des autres ILs (dont IL-9 et IL-10) sur la cellule épithéliale dans la PNS
- iii) Développement d'un nouvel outil de mesure de l'efficacité du battement ciliaire *ex-vivo* (moins chronophage que le suivi de billes) utilisant la contrainte de cisaillement mesurée à l'aide de nanobâtonnets fluorescents dont l'orientation dans un fluide est proportionnelle au shear stress induit par le cil. (Projet financé par la FRM en cours de développement et en coopération avec l'équipe de Chimie de l'école Polytechnique)
- iiii) Projet de recherche translationnelle sur les biothérapies par voie locale dans la PNS utilisant le FcRn

---

# Annexes

---

## 8. Annexes

### Annexe 1 : Protocole de mise en culture de cellules épithéliales nasales humaines

Le matériel recueilli au bloc opératoire issu des déchets per-opératoires est placé dans un milieu de transport composé de DMEM/HAM-F12 (Invitrogen, Cergy-pontoise, France) + antibiotiques *Pénicilline-Streptomycine-Fungizone-Gentamycine* (PSFG) à 4°C et transporté dans les plus brefs délais au laboratoire pour mise en culture immédiate selon le protocole suivant :

Les CENH sont d'abord purifiées à partir de fragments de muqueuse nasale par une dissociation enzymatique spécifique (pronase, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)

- Laver (X3) les déchets per-opératoires dans du PBS, DTT 5 mM, PSGF (pénicilline 100 U/ml, streptomycine 100 mg/ml, gentamycine 100 mg/ml, fungizone 2,5 µg/ml. **Digestion par la pronase** : Eliminer le tampon de lavage et incuber (4°C, sur la nuit) dans une solution de PBS-PSGF, pronase 0.1%
- Récupérer les CENH par filtration (passoire) des déchets per opératoires digérés puis centrifuger (7 min, 800 g)
- Reprendre le culot cellulaire dans une solution de trypsine-EDTA 0,25 % (3 min, 37°C)
- Centrifuger (7 min, 800 g) puis reprendre le culot cellulaire dans une solution de DMEM/F12-PSGF, sérum de veau fœtal (SVF) 5 %

Puis les CENH sont mises en culture dans un système permettant la mise en interface air/liquide afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques (Figure 1). Le système de culture des CENH est composé de filtres de 1 cm<sup>2</sup> de diamètre (pores de 0,24µm) montés sur des inserts (Transwell® ou Snapwell®, Corning Costar, Amsterdam, Pays-Bas), placés chacun dans un puits aménagé sur une plaque de 12 puits. Ces filtres sont recouverts d'une fine couche de collagène de type IV (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), un des constituant de la membrane basale, permettant l'adhérence sélective des CENH.

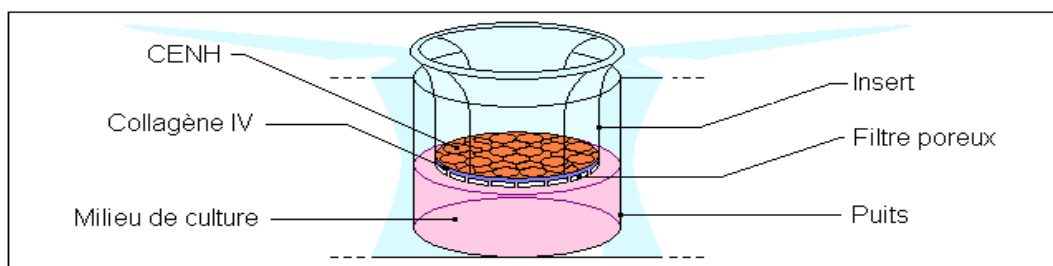


Figure 1 : Système de culture en interface air/liquide

Suite du protocole de mise en culture :

- **Ensemencement** : Compter les cellules et ensemercer les CENH dans l'insert à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/insert ( $1 \text{ cm}^2$ )
- Ajouter 1ml de DMEM/F12-PSGF, Ultrosor G (UG, Pall Life Sciences, Saint-Germain-en-Laye, France) 2% sous l'insert et placer dans l'incubateur ( $\text{CO}_2$  5%, 37°C) pendant 24 h
- **Mise en interface air/liquide** : Au bout de 24h, retirer le milieu de culture dans l'insert (face apicale des CENH) puis laver doucement les inserts (X4) par des aller/retour avec une pipette (sans toucher le fond de l'insert) avec 1 ml de PBS-PSGF
- Changer le milieu DMEM/F12-PSGF, UG 2% quotidiennement jusqu'à utilisation des cellules

L'UG 2% a été remplacé dans les travaux de cette thèse par le Pneumacult-ALI (Stemcell) + PSGF dès la confluence des cellules obtenues et le milieu est ensuite changé tous les 2 jours.

La qualité des cultures est contrôlée par observations morphologiques au microscope et par la mesure régulière de la résistance et de la différence de potentiel trans-épithéliale au moyen d'un micro voltmètre (World Precision Instruments, Astonbury, UK).

## Annexe 2 : Techniques de mesure des paramètres d'analyse du battement ciliaire

Le brossage de la muqueuse nasale permet de prélever des cellules épithéliales nasales. Il est réalisé principalement au niveau du tiers moyen du cornet inférieur et plus rarement au niveau du cornet moyen (Figure 1). Les patients présentant une PNS ont eu deux brossages, le premier au niveau du cornet inférieur et le deuxième sur des polypes. La technique de brossage a respecté le protocole rédigé par le centre de référence des maladies respiratoires rares (RespiRare). Les cellules épithéliales nasales, sont mises en suspension dans un milieu de transport (*DMEM-HAM-F12-Pénicilline-Streptomycine-Fungizone-Gentamycine*) puis l'échantillon est acheminé au laboratoire et analysé dans les 6 heures à température ambiante.

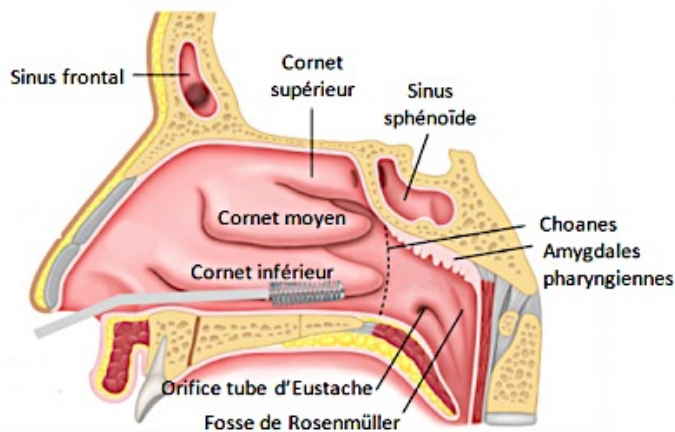


Figure 1 Brossage ciliaire

### *Analyse en vidéomicroscopie à haute vitesse*

#### Matériel

L'analyse des brossages est réalisé à l'aide d'un matériel de vidéomicroscopie à haute vitesse qui se compose d'un microscope inversé Axiovert 200M (Carl Zeiss) associé à un objectif x40 (Carl Zeiss) ou x100 donnant respectivement un facteur de grossissement de l'ordre de 480 et 1200 et d'une caméra haute vitesse PL-A471 (PixeLink) qui filme en niveau de gris (8 bits) permettant l'acquisition d'images avec une résolution de 256\*192 pixel à la vitesse de 358 images par seconde. Au final, chaque pixel correspond à un carré de 0,33  $\mu\text{m}$  de côté au grossissement X40 et de 0,13  $\mu\text{m}$  au grossissement x100. Les analyses sont réalisées dans une pièce avec air conditionné permettant de maintenir une température ambiante entre 20 et 25°C.

### Protocole expérimental pour l'enregistrement des films

- On prélève 80µL de la solution contenant les cellules épithéliales nasales à laquelle on ajoute 20µL de solution contenant des microbilles de polystyrène puis l'ensemble est déposé sur une lamelle de verre permettant l'observation au microscope.
- L'analyse des différentes caractéristiques du battement ciliaire et l'analyse de la contrainte de cisaillement par suivi de billes de polystyrène sont faites à partir de films réalisés sur des bordures de cils mobiles et battant de profil dans le plan de la caméra. Pour chaque brossage au minimum 3 bordures différentes sont filmées avec en moyenne 10 films par bordure.

### Analyse qualitative et quantitative du battement ciliaire

Les paramètres utilisés pour caractériser le battement ciliaire sont les suivants : le score semi-quantitatif d'évaluation de la mobilité ciliaire des amas cellulaires, la fréquence du battement ciliaire (FBC), la densité ciliaire, la longueur des cils, la longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM) et l'index d'efficacité par mesure de la contrainte de cisaillement. Ces paramètres sont étudiés grâce à un logiciel d'analyse semi-automatique StreamDV développé par l'équipe de recherche à partir de la plateforme Matlab.

### 1ère étape : Techniques d'évaluation des brossages en microscopie optique au grossissement X40

- Évaluation de la présence d'amas cellulaires ciliés ou non ciliés

Le premier temps de l'analyse consiste à évaluer la présence ou l'absence d'amas cellulaires sur la lame observée, puis en cas de présence d'amas cellulaires, à décrire si ceux-ci sont ciliés ou non.

- Évaluation de la présence de cils mobiles

Le deuxième temps de l'analyse consiste à décrire si les cils à la surface des amas cellulaires ciliés sont mobiles ou non, lorsque ceux-ci sont mobiles nous réalisons la mesure du score d'évaluation de la mobilité ciliaire.

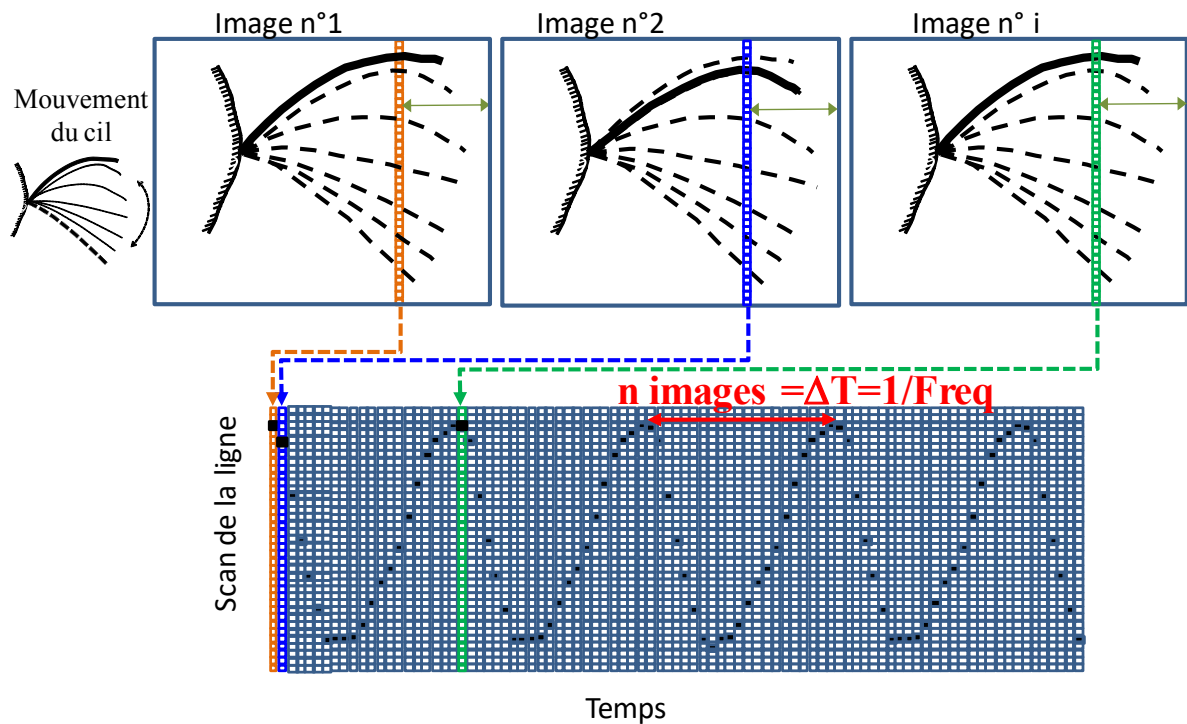
- Score de mobilité ciliaire utilisant une évaluation visuelle semi-quantitative

Il est évalué sur les 10 premiers amas cellulaires ciliés rencontrés sur la lame. Si les amas possèdent des bordures dont l'ensemble des cils sont battants, la cotation est de 10, des bordures où coexistent des cils battants et des cils immobiles, la cotation est de 5 ou des bordures où les cils sont tous immobiles, la cotation est 0. La somme des cotations des 10 premiers amas observés permet d'établir un score semi-quantitatif d'évaluation visuelle de la mobilité ciliaire ayant pour maximum 100.

### 2ème étape : Techniques d'évaluation des paramètres du battement ciliaire

- Mesure de la fréquence (grossissement X40)
  - o Par Kymographie

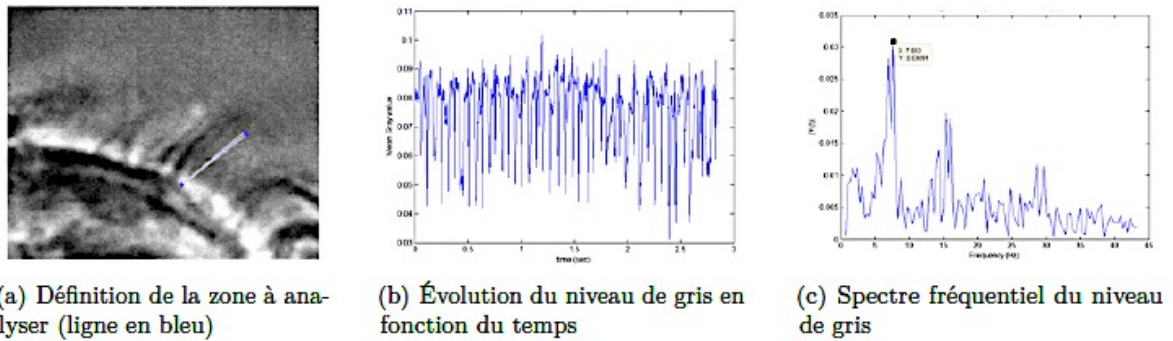
La kymographie consiste à définir une ligne de pixels sur la première image du film et à suivre l'évolution de cette ligne au cours du temps image après image. Pour cela on accole à la ligne de la première image les lignes de la seconde image, de la 3ème image, etc. et ce jusqu'à la dernière image. L'image composée de l'ensemble des lignes présente alors une succession de vagues dont la périodicité est l'inverse de la fréquence du battement. (Figure 2)



**Figure 2. Kymographie : principe**

- Par la transformée de Fourier

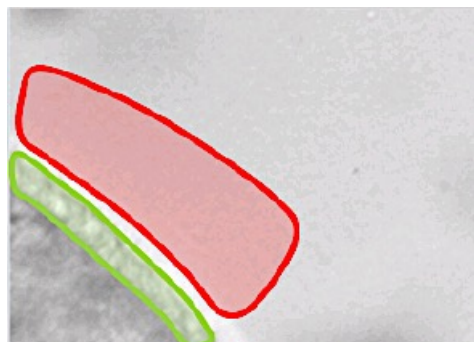
L'analyse en niveau de gris consiste à calculer sur chaque image le niveau de gris d'une ligne de pixels arbitrairement choisie. Lorsqu'il y a un mouvement, le niveau de gris moyen de la ligne de pixels évolue au cours du temps. Une simple transformée rapide de Fourier (FFT) de ce niveau de gris permet d'obtenir le spectre fréquentiel correspondant. La fréquence fondamentale de ce spectre correspond à la FBC en Hertz. (Figure 3)



**Figure 3. Analyse du niveau de gris par transformée rapide de Fourier**

- Mesure de la densité relative de cils (grossissement X40)

La densité relative de cils est évaluée en comparant le niveau de gris moyen du fond de l'image avec le niveau de gris de la zone contenant les cils. Sur une image issue d'un film, les cils apparaissent plus foncés que le fond. La densité relative de cils peut être approximée par le ratio entre le nombre de pixels appartenant à la bordure ciliée plus foncée que la moyenne du niveau de gris du fond. Ainsi le résultat est exprimé en pourcentage d'espace de la bordure ciliée dont le niveau de gris est inférieur<sup>1</sup> à la moyenne du niveau de gris du fond. De ce fait, plus le pourcentage est élevé plus la densité est importante. (Figure 4)



**Figure 4. Principe de la densité relative de cils**

La zone verte correspond à la zone ciliée et la zone rouge à la zone de fond

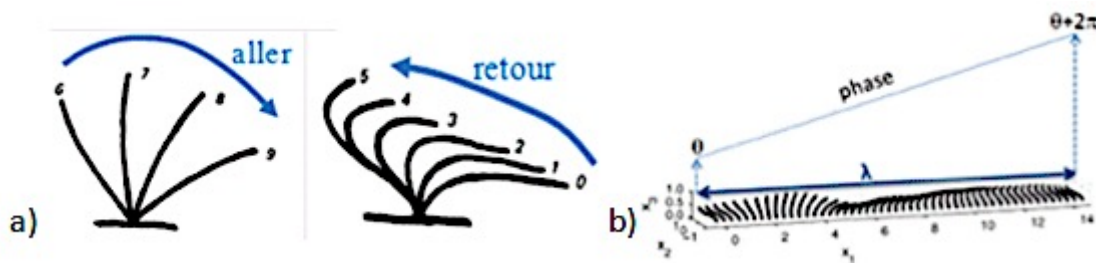
- Mesure de la longueur des cils au microscope (grossissement X100)

L'analyse de la longueur des cils est effectuée sur des cils les plus rectilignes possibles, dont la base, l'extrémité apicale et l'ensemble du trajet sont visibles.

- Mesure de la longueur d'onde de l'onde métachrone (grossissement x40)

<sup>1</sup> Sur nos images les couleurs sont codées en 256bits avec comme convention : 0 pour un pixel noir et 255 pour un pixel blanc. Plus l'image est foncée à l'œil et plus la valeur du code couleur est faible.

Le battement des cils d'une cellule est synchronisé avec l'ensemble des cils avoisinants de cette même cellule mais aussi avec ceux des cellules voisines avec un décalage de phase qui s'accroît linéairement avec la distance. Le décalage de phase exprime ici le retard (et ou l'avance) d'un cil dans le cycle par rapport à un cil voisin. Ceci crée une onde métachrone qui participe au déplacement du mucus. La longueur d'onde de l'onde métachrone (LOOM) définit la périodicité en distance du battement ciliaire. Cette distance n'est pas forcément directement liée à la FBC ni à la vitesse de propagation de l'onde. La longueur est déterminé en mesurant, via la transformé rapide de Fourier, la variation de la phase du niveau de gris sur 100 lignes parallèles entre elles et perpendiculaires à la bordure ciliée. L'analyse de ce critère a surtout été développée sur des modèles animaux mais notre équipe a publié les premières valeurs de LOOM de cellules épithéliales nasales d'origine humaine en 2017, les équations et la méthode d'analyse de ce critère sont développés dans la publication de Bottier *et al.* (Figure 5)



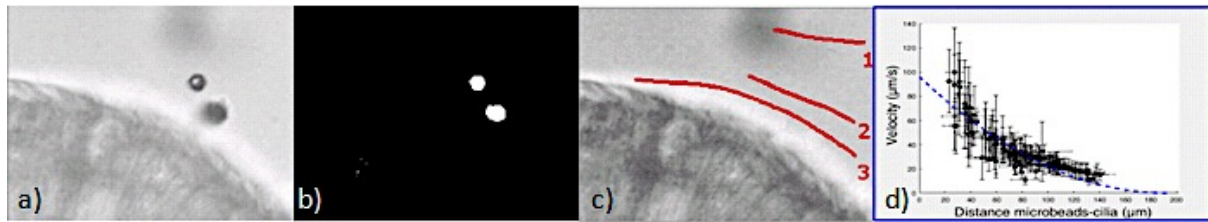
**Figure 5. Battement ciliaire et longueur d'onde de l'onde métachrone**

- a) schématisation 2D du mouvement ciliaire asymétrique, modifié d'après Sanderson and Sleight  
 b) schématisation de l'onde métachrone, d'après Fulford and Blake,  $\lambda$  est la longueur d'onde,  $\theta$  est la phase du battement ciliaire en  $x=0$ . Cette phase croît linéairement pour atteindre  $\theta+2\pi$  en  $x = \lambda$

### 3<sup>ème</sup> étape : Technique d'évaluation de l'efficacité du battement ciliaire par mesure de la contrainte de cisaillement

Des microbilles de polystyrène de  $4,5 \mu\text{m}$  de diamètre (Polybead© Microspheres, Polysciences, Inc.) ajoutées dans le milieu contenant les cellules ciliées sont des marqueurs de l'écoulement généré par le battement ciliaire. La trajectoire de chaque bille est obtenue par lecture automatique du film par le logiciel qui reconnaît chaque bille. Il est possible de valider manuellement les trajectoires dessinées par le logiciel. L'intérêt de l'analyse numérique est de pouvoir sélectionner des billes d'intérêt ou au contraire d'effacer des trajectoires qui paraissent aberrantes. L'analyse du profil des vitesses en fonction de la distance à la bordure ciliée (exemple en figure 6d) permet de calculer la contrainte exercée par les cils sur le fluide. Cette contrainte (force par unité de surface) caractérise le transfert de force des cils vers le fluide. Elle peut donc être vue comme un index d'efficacité du battement pour le déplacement du fluide. L'estimation de cet index est basée sur une modélisation 2D (modèle mathématique) de

l'écoulement induit par les cils développée au laboratoire qui a été validée par l'expérience. L'ensemble du rationnel scientifique à ce travail est développé dans les publications de Bottier et al.



**Figure 6. Suivi de microbilles et index d'efficacité par le suivi de billes**

- a) image de billes avant traitement b) image de billes après traitement c) trajectoires type des billes en fonction de leur distance à la bordure d) graphique de la vitesse des billes en fonction de leur distance à la bordure

## Annexe 3 : comité de protection des personnes Ile de France X

### COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES ILE DE FRANCE X

HOPITAL ROBERT BALLANGER  
Boulevard Robert Ballanger - Bâtiment n° 8 (3<sup>ème</sup> étage) - 93602 Aulnay-sous-bois cedex  
Tél. : 01 49 36 73 57 - E-mail : cpp.iledefrance10@ch-aulnay.fr  
Président : Pr. Philippe CASASSUS

Recommandé avec AR  
N° 1A 118 134 1708 4

**Madame Emilie BEQUIGNON**  
**Service d'ORL et de chirurgie cervico-**  
**faciale**  
**HOPITAL HENRI MONDOR**  
**51 Av. du M<sup>al</sup> de Lattre de Tassigny**  
**94010 CRETEIL cedex**

Aulnay sous bois, le 25 janvier 2016

Nos réf. : Demande d'avis n° 2016-01-01

Chère Madame,

Le Comité de Protection des Personnes Ile-de-France X a été saisi par vous-même d'une demande d'avis sur un projet d'étude intitulé :

**« Etude pour évaluer l'influence d'agressions bactériennes et de facteurs inflammatoires sur l'épithélium respiratoire à partir du matériel considéré comme déchet opératoire au cours des interventions pour sinusite chronique avec ou sans polypes. »**

dont le directeur de thèse est le Pr. André Coste (Hôpital Henri Mondor, Créteil).

Le Comité réuni en session plénière ce lundi 25 janvier 2016 a examiné votre demande sur ce projet d'étude n'émettant pas d'objection quant à sa réalisation et qu'il considère comme purement observationnelle, au regard des documents suivants :

- Courrier de soumission ..... du 04/01/2016
- Résumé de l'étude ..... v. du 04/01/2016
- Note d'information patient pour l'utilisation des prélèvements de tissu nasa non utilisés (déchets opératoires) à des fins de recherche (Hôpital Intercommunal de Créteil - CHIC) .  
..... v. du 04/01/2016
- Note d'information patient pour l'utilisation des prélèvements de tissu nasa non utilisés (déchets opératoires) à des fins de recherche (Hôpital Kremlin bicêtre - AP-HP) .....  
..... v. du 04/01/2016
- CV de Mme Emilie Bequignon ..... -

#### Ont participé à la délibération les membres du Comité suivants

- ☒ Recherche biomédicale : Monsieur Philippe CASASSUS (\*) ..... titulaire  
Monsieur Jean-Luc DURAND ..... titulaire  
Monsieur Pierre DEBLOIS ..... titulaire
- ☒ Médecin généraliste : Madame Elisabeth HENON ..... titulaire
- ☒ Pharmacien : Monsieur Thomas LIAUTAUD ..... titulaire
- ☒ Psychologue : Monsieur Luc BAUMARD ..... titulaire
- ☒ Personne qualifiée en raison de sa compétence à l'égard des questions éthiques :  
Monsieur Daniel FAUCHER ..... titulaire
- ☒ Personne qualifiée en raison de sa compétence à l'égard des questions juridiques:  
Madame Diana SAIZ NAVARRO ..... suppléante
- ☒ Représentants des associations agréées de malades ou d'usagers du système de santé :  
Madame Marie-Claude FEINSTEIN ..... titulaire  
Monsieur Philippe MAUGIS ..... suppléant

**COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES ILE DE FRANCE X**

HOPITAL ROBERT BALLANGER

Boulevard Robert Ballanger - Bâtiment n° 8 (3<sup>ème</sup> étage) - 93602 Aulnay-sous-bois cedex

Tél. : 01 49 36 73 57 - E-mail : cpp.iledefrance10@ch-aulnay.fr

Président : Pr. Philippe CASASSUS

***Ont assisté au débat sans participation les suppléants suivants***

|                                |   |                                  |            |
|--------------------------------|---|----------------------------------|------------|
| ☒ <u>Recherche biomédicale</u> | : | Madame Renée MARFAING .....      | suppléante |
| ☒ <u>Médecin généraliste</u>   | : | Monsieur Jean-Luc FONTENOY ..... | suppléant  |
| ☒ <u>Pharmacien</u>            | : | Madame Patricia LEROUX.....      | suppléante |
| ☒ <u>Psychologue</u>           | : | Madame Monique KAEPELIN.....     | suppléante |

(\*) : épidémiologiste / biostatisticien

Je vous prie de croire, Chère Madame, en l'expression de mes salutations les meilleures.



Le Président,  
Pr. Philippe CASASSUS

[ CET AVIS COMPORTE DEUX PAGES ]

---

---

*Au cas où il apparaîtrait nécessaire de présenter ultérieurement à notre Comité **une demande de modifications à l'étude**, nous vous prions de nous adresser la **nouvelle version des documents proposés, en indiquant de façon facilement visible les modifications apportées (version avec modifications apparentes et version finale)**.*

---

---

## **Annexe 4 : Protocole de transcytose d'un anticorps monoclonal au travers d'une culture de cellules épithéliales épithéliales nasales humaines exprimant le FcRn**

Nous avons transposé un protocole de transcytose développé dans des cellules MDCKII humaines transfectées avec FcRn en utilisant l'Infliximab (Ternant, Arnoult et al. 2016). L'infliximab a été choisi comme modèle d'anticorps thérapeutique en raison de l'expertise du laboratoire d'immunologie de tours en matière de transcytose par Infliximab dans les cellules épithéliales rénales canines MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells) transfectées avec le FcRn humain.

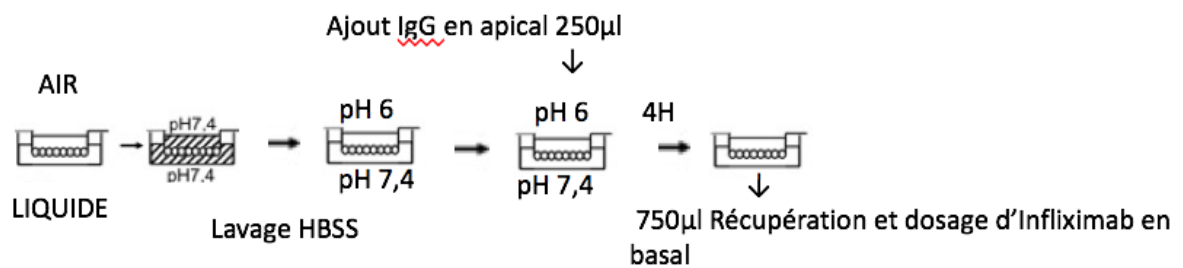
La veille de l'expérience, la résistance électrique transépithéliale (TEER) est contrôlée à l'aide d'un Voltmètre MILLICELL-ERS-2 (MILLIPORE) avec une valeur TEER de  $\sim 600\text{--}800 \Omega.\text{cm}^2$  pour vérifier les propriétés électrophysiologiques des cultures de CENH en ALI. La confluence et l'absence de trous dans la culture sont vérifiées au microscope.

Le jour de l'expérience de transcytose, le milieu de culture est aspiré sous l'insert. Les cellules sont lavées deux fois par ajout de 500 $\mu\text{L}$  de HBSS additionné d'HEPES 1% ((Eurobio ingen, Les Ulis, France) pour maintenir le pH à 7,4 dans l'insert (compartiment apical) et 1 mL de ce même tampon en dessous de l'insert (compartiment basal). Les cellules sont incubées 20 minutes à 37°C pour équilibrer le système.

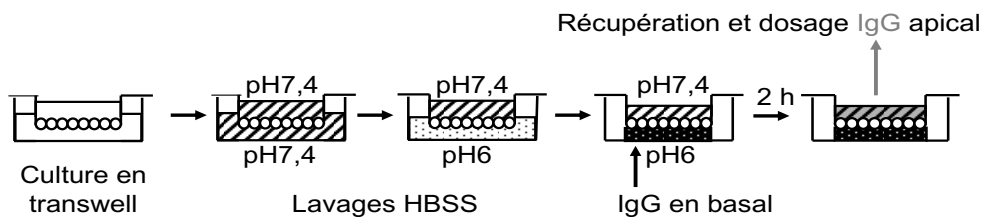
Les expériences de transcytose sont réalisées soit dans la direction apicale vers basale, soit dans la direction basale vers apicale. Dans le protocole de transcytose du sens apical vers basal, une fois la solution de lavage retirée par aspiration, au-dessus de l'insert (surface apicale des cellules), 250 $\mu\text{L}$  d'HBSS/MES 1% (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) pH=6 sont ajoutés (le pH acide permet la fixation de la partie Fc des anticorps au FcRn). 750  $\mu\text{L}$  d'HBSS/ HEPES 1% sont ajoutés (pH=7,4 permettant la dissociation FcRn/Fc et permettant la libération de l'Ac. à l'autre pôle de la cellule) sous l'insert dans le compartiment basal. Après 4 heures d'incubation à 37 ° C, 250 $\mu\text{L}$  de surnageant au-dessus et 750  $\mu\text{L}$  au-dessous de l'insert sont récupérés et stockés à -20°C en attendant le dosage de l'Infliximab par la méthode ELISA. Dans les expériences de transcytose du sens basal vers apical, 750  $\mu\text{L}$  de solution d'Infliximab ont été ajoutés dans la compartiment basal (pH=6). Foss et al. ont déjà rapporté des expériences de transcytose *in vitro* basées sur la lignée cellulaire épithéliale humaine T84 (Foss, Grevys et al. 2016). Dans cette étude *in vitro*, des échantillons prélevés à 0, 1, 2 et 4 h ont été prélevés du côté opposé de la monocouche. Les auteurs avaient déjà déterminé un effet différentiel de la réponse dans le temps avec un temps de transcytose optimal observé à 4 h. Par conséquent, nous avons fixé le temps de transcytose dans nos propres expériences à 4 h. Une courbe dose-réponse a été obtenue en testant l'infliximab à des concentrations de 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$  et 5000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (correspondant respectivement aux valeurs absolues de 12,5, 125 et 1250 ng ajoutées dans la chambre supérieure du puits) dans les expériences de transcytose dans le sens apical vers le compartiment basal. Dans les expériences de transcytose du sens basal vers le côté apical, la valeur absolue de 375 ng d'infliximab

(ajoutée dans le compartiment basal) a été testée pour confirmer les conclusions d'études précédentes. Ces gammes de concentrations ont été choisies selon les études précédentes de la littérature. Chaque concentration d'anticorps a été testée en triplicate. Les expériences ont été réalisées dans des cultures peu différenciées (jour 7) et bien différenciées (jour 21) afin d'évaluer si la fonctionnalité de FcRn dans les CENH était dépendante du statut de différenciation cellulaire. Après chaque expérience de transcytose, la toxicité cellulaire est évaluée en utilisant à la fois la mesure du TEER pour la perméabilité de la monocouche et le test au bleu trypan pour la viabilité cellulaire.

Test de transcytose dans le sens apical vers basal :



Test de transcytose dans le sens basal vers apical :



---

# Bibliographie

---

## 9. Bibliographie

- Adamson, A. S., K. Collins, A. Laurence and J. J. O'Shea (2009). "The Current STATus of lymphocyte signaling: new roles for old players." *Curr Opin Immunol* **21**(2): 161-166.
- Akdis, C. A. and K. Blaser (2001). "Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression." *Immunology* **103**(2): 131-136.
- Alobid, I., E. Anton, M. Armengot, J. Chao, C. Colas, A. del Cuvillo, I. Davila, M. T. Dordal, C. Escobar, B. Fernandez-Parra, J. R. Gras-Cabrerizo, M. D. Ibanez, M. Lluch, V. Mateu, J. Montoro, J. R. Gili, J. Mullol, A. M. Navarro, F. Pumarola, C. Rondon, M. C. Sanchez-Hernandez, A. Sarandeses, R. Soler, A. L. Valero, C. Rhinoconjunctivitis, A. Spanish Society of, I. Clinical, Rhinology, C. Allergy and O. Spanish Society of (2011). "SEAIC-SEORL. Consensus Document on Nasal Polyposis. POLINA Project." *J Investig Allergol Clin Immunol* **21 Suppl 1**: 1-58.
- Altunbulakli, C., R. Costa, F. Lan, N. Zhang, M. Akdis, C. Bachert and C. A. Akdis (2018). "Staphylococcus aureus enhances the tight junction barrier integrity in healthy nasal tissue, but not in nasal polyps." *J Allergy Clin Immunol* **142**(2): 665-668 e668.
- Arranz-Valsero, I., L. Soriano-Romani, L. Garcia-Posadas, A. Lopez-Garcia and Y. Diebold (2014). "IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay." *Exp Eye Res* **125**: 183-192.
- Aue, G., M. A. Lindorfer, P. V. Beum, A. W. Pawluczko, B. Vire, T. Hughes, R. P. Taylor and A. Wiestner (2010). "Fractionated subcutaneous rituximab is well-tolerated and preserves CD20 expression on tumor cells in patients with chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* **95**(2): 329-332.
- Bachert, C. and C. A. Akdis (2016). "Phenotypes and Emerging Endotypes of Chronic Rhinosinusitis." *J Allergy Clin Immunol Pract* **4**(4): 621-628.
- Bachert, C., P. Gevaert, G. Holtappels, C. Cuvelier and P. van Cauwenberge (2000). "Nasal polyposis: from cytokines to growth." *Am J Rhinol* **14**(5): 279-290.
- Bachert, C., P. Gevaert, G. Holtappels, S. G. Johansson and P. van Cauwenberge (2001). "Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation." *J Allergy Clin Immunol* **107**(4): 607-614.
- Bachert, C. and P. Gevaert (1999). "Effect of intranasal corticosteroids on release of cytokines and inflammatory mediators." *Allergy* **54 Suppl 57**: 116-123.
- Bachert, C., J. K. Han, M. Desrosiers, P. W. Hellings, N. Amin, S. E. Lee, J. Mullol, L. S. Greos, J. V. Bosso, T. M. Laidlaw, A. U. Cervin, J. F. Maspero, C. Hopkins, H. Olze, G. W. Canonica, P. Paggiaro, S. H. Cho, W. J. Fokkens, S. Fujieda, M. Zhang, X. Lu, C. Fan, S. Draikiwicz, S. A. Kamat, A. Khan, G. Pirozzi, N. Patel, N. M. H. Graham, M. Ruddy, H. Staudinger, D. Weinreich, N. Stahl, G. D. Yancopoulos and L. P. Mannent (2019). "Efficacy and safety of dupilumab in patients with severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (LIBERTY NP SINUS-24 and LIBERTY NP SINUS-52): results from two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 3 trials." *Lancet*.
- Bachert, C., L. Mannent, R. M. Naclerio, J. Mullol, B. J. Ferguson, P. Gevaert, P. Hellings, L. Jiao, L. Wang, R. R. Evans, G. Pirozzi, N. M. Graham, B. Swanson, J. D. Hamilton, A. Radin, N. A. Gandhi, N. Stahl, G. D. Yancopoulos and E. R. Sutherland (2016). "Effect of Subcutaneous Dupilumab on Nasal Polyp Burden in Patients With Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis: A Randomized Clinical Trial." *JAMA* **315**(5): 469-479.
- Bachert, C. and P. B. Van Cauwenberge (1997). "Inflammatory mechanisms in chronic sinusitis." *Acta Otorhinolaryngol Belg* **51**(4): 209-217.
- Bachert, C., M. Wagenmann, U. Hauser and C. Rudack (1997). "IL-5 synthesis is upregulated in human nasal polyp tissue." *J Allergy Clin Immunol* **99**(6 Pt 1): 837-842.
- Bachert, C., M. Wagenmann, C. Rudack, K. Hopken, M. Hillebrandt, D. Wang and P. van Cauwenberge (1998). "The role of cytokines in infectious sinusitis and nasal polyposis." *Allergy* **53**(1): 2-13.
- Bachert, C., L. Zhang and P. Gevaert (2015). "Current and future treatment options for adult chronic rhinosinusitis: Focus on nasal polyposis." *J Allergy Clin Immunol* **136**(6): 1431-1440.
- Bachert, C., N. Zhang, G. Holtappels, L. De Lobel, P. van Cauwenberge, S. Liu, P. Lin, J. Bousquet and K. Van Steen (2010). "Presence of IL-5 protein and IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins in

- nasal polyps is associated with comorbid asthma." *J Allergy Clin Immunol* **126**(5): 962-968, 968 e961-966.
- Bachert, C., N. Zhang, T. van Zele, P. Gevaert, J. Patou and P. van Cauwenberge (2007). "Staphylococcus aureus enterotoxins as immune stimulants in chronic rhinosinusitis." *Clin Allergy Immunol* **20**: 163-175.
- Bals, R., D. J. Weiner and J. M. Wilson (1999). "The innate immune system in cystic fibrosis lung disease." *J Clin Invest* **103**(3): 303-307.
- Balzar, S., H. W. Chu, P. Silkoff, M. Cundall, J. B. Trudeau, M. Strand and S. Wenzel (2005). "Increased TGF-beta2 in severe asthma with eosinophilia." *J Allergy Clin Immunol* **115**(1): 110-117.
- Barrow, R. E., C. Z. Wang, M. J. Evans and D. N. Herndon (1993). "Growth factors accelerate epithelial repair in sheep trachea." *Lung* **171**(6): 335-344.
- Batra, P. S., L. Tong and M. J. Citardi (2013). "Analysis of comorbidities and objective parameters in refractory chronic rhinosinusitis." *Laryngoscope* **123** Suppl 7: S1-11.
- Bequignon, E., L. Dupuy, F. Zerah-Lancner, L. Bassinet, I. Honore, M. Legendre, M. Devars du Mayne, V. Escabasse, B. Crestani, B. Maitre, E. Escudier, A. Coste and J. F. Papon (2019). "Critical Evaluation of Sinonasal Disease in 64 Adults with Primary Ciliary Dyskinesia." *J Clin Med* **8**(5).
- Berger, G., A. Kattan, J. Bernheim and D. Ophir (2002). "Polypoid mucosa with eosinophilia and glandular hyperplasia in chronic sinusitis: a histopathological and immunohistochemical study." *Laryngoscope* **112**(4): 738-745.
- Bhathena, P. R., S. A. Comhair, K. J. Holroyd and S. C. Erzurum (2000). "Interleukin-9 receptor expression in asthmatic airways In vivo." *Lung* **178**(3): 149-160.
- Bitonti, A. J., J. A. Dumont, S. C. Low, R. T. Peters, K. E. Kropp, V. J. Palombella, J. M. Stattel, Y. Lu, C. A. Tan, J. J. Song, A. M. Garcia, N. E. Simister, G. M. Spiekermann, W. I. Lencer and R. S. Blumberg (2004). "Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9763-9768.
- Bittner, B., W. F. Richter, F. Hourcade-Potelleret, C. McIntyre, F. Herting, M. L. Zepeda and J. Schmidt (2012). "Development of a subcutaneous formulation for trastuzumab - nonclinical and clinical bridging approach to the approved intravenous dosing regimen." *Arzneimittelforschung* **62**(9): 401-409.
- Bochner, B. S. (1997). "Cellular adhesion and its antagonism." *J Allergy Clin Immunol* **100**(5): 581-585.
- Botterel, F., C. Cordonnier, V. Barbier, L. Wingerstmann, M. Liance, A. Coste, E. Escudier and S. Bretagne (2002). "Aspergillus fumigatus causes in vitro electrophysiological and morphological modifications in human nasal epithelial cells." *Histol Histopathol* **17**(4): 1095-1101.
- Botterel, F., K. Gross, O. Ibrahim-Granet, K. Khoufache, V. Escabasse, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier and S. Bretagne (2008). "Phagocytosis of Aspergillus fumigatus conidia by primary nasal epithelial cells in vitro." *BMC Microbiol* **8**: 97.
- Bottier, M., S. Blanchon, G. Pelle, E. Bequignon, D. Isabey, A. Coste, E. Escudier, J. B. Grotberg, J. F. Papon, M. Filoche and B. Louis (2017). "A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part I, experimental analysis." *PLoS Comput Biol* **13**(7): e1005605.
- Bottier, M., M. Pena Fernandez, G. Pelle, D. Isabey, B. Louis, J. B. Grotberg and M. Filoche (2017). "A new index for characterizing micro-bead motion in a flow induced by ciliary beating: Part II, modeling." *PLoS Comput Biol* **13**(7): e1005552.
- Boxall, C., S. T. Holgate and D. E. Davies (2006). "The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma." *Eur Respir J* **27**(1): 208-229.
- Brambell, F. W., W. A. Hemmings and I. G. Morris (1964). "A Theoretical Model of Gamma-Globulin Catabolism." *Nature* **203**: 1352-1354.
- Braverman, I., E. D. Wright, C. G. Wang, D. Eidelman and S. Frenkiel (1998). "Human nasal ciliary-beat frequency in normal and chronic sinusitis subjects." *J Otolaryngol* **27**(3): 145-152.
- Brussino, L., E. Heffler, C. Bucca, S. Nicola and G. Rolla (2018). "Eosinophils Target Therapy for Severe Asthma: Critical Points." *Biomed Res Int* **2018**: 7582057.
- Calenoff, E., J. T. McMahan, G. D. Herzon, R. C. Kern, G. D. Ghadge and D. G. Hanson (1993). "Bacterial allergy in nasal polyposis. A new method for quantifying specific IgE." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **119**(8): 830-836.

- Camporeale, A. and V. Poli (2012). "IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity?" Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2306-2326.
- Canciani, M., E. G. Barlocco, G. Mastella, M. M. de Santi, C. Gardi and G. Lungarella (1988). "The saccharin method for testing mucociliary function in patients suspected of having primary ciliary dyskinesia." Pediatr Pulmonol **5**(4): 210-214.
- Cao, P. P., H. B. Li, B. F. Wang, S. B. Wang, X. J. You, Y. H. Cui, D. Y. Wang, M. Desrosiers and Z. Liu (2009). "Distinct immunopathologic characteristics of various types of chronic rhinosinusitis in adult Chinese." J Allergy Clin Immunol **124**(3): 478-484, 484 e471-472.
- Caplin, I., J. T. Haynes and J. Spahn (1971). "Are nasal polyps an allergic phenomenon?" Ann Allergy **29**(12): 631-634.
- Carroll, N. G., S. Mutavdzic and A. L. James (2002). "Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma." Thorax **57**(8): 677-682.
- Castell, J. V., T. Geiger, V. Gross, T. Andus, E. Walter, T. Hirano, T. Kishimoto and P. C. Heinrich (1988). "Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat." Eur J Biochem **177**(2): 357-361.
- Caye-Thomassen, P., A. Hermansson, M. Tos and K. Prellner (1995). "Polyp pathogenesis--a histopathological study in experimental otitis media." Acta Otolaryngol **115**(1): 76-82.
- Cervin, A. and B. Wallwork (2014). "Efficacy and safety of long-term antibiotics (macrolides) for the treatment of chronic rhinosinusitis." Curr Allergy Asthma Rep **14**(3): 416.
- Chapelin, C., A. Coste, L. Gilain, F. Poron, F. Verra and E. Escudier (1996). "Modified epithelial cell distribution in chronic airways inflammation." Eur Respir J **9**(12): 2474-2478.
- Chaudhury, C., C. L. Brooks, D. C. Carter, J. M. Robinson and C. L. Anderson (2006). "Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction." Biochemistry **45**(15): 4983-4990.
- Cheng, G., M. Arima, K. Honda, H. Hirata, F. Eda, N. Yoshida, F. Fukushima, Y. Ishii and T. Fukuda (2002). "Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model." Am J Respir Crit Care Med **166**(3): 409-416.
- Chilvers, M. A. and C. O'Callaghan (2000). "Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods." Thorax **55**(4): 314-317.
- Chin, D. and R. J. Harvey (2013). "Nasal polyposis: an inflammatory condition requiring effective anti-inflammatory treatment." Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg **21**(1): 23-30.
- Chong, L. Y., K. Head, C. Hopkins, C. Philpott, M. J. Burton and A. G. Schilder (2016). "Different types of intranasal steroids for chronic rhinosinusitis." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD011993.
- Cohen, N. A. (2006). "Sinonasal mucociliary clearance in health and disease." Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl **196**: 20-26.
- Coraux, C., R. Hajj, P. Lesimple and E. Puchelle (2005). "[Repair and regeneration of the airway epithelium]." Med Sci (Paris) **21**(12): 1063-1069.
- Coraux, C., C. Kileztky, M. Polette, J. Hinnrasky, J. M. Zahm, P. Devillier, S. De Bentzmann and E. Puchelle (2004). "Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist." Am J Respir Cell Mol Biol **30**(5): 605-612.
- Coste, A., L. Brugel, B. Maitre, S. Boussat, J. F. Papon, L. Wingerstmann, R. Peynegre and E. Escudier (2000). "Inflammatory cells as well as epithelial cells in nasal polyps express vascular endothelial growth factor." Eur Respir J **15**(2): 367-372.
- Coste, A., J. P. Lefaucheur, Q. P. Wang, E. Lesprit, F. Poron, R. Peynegre and E. Escudier (1998). "Expression of the transforming growth factor beta isoforms in inflammatory cells of nasal polyps." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **124**(12): 1361-1366.
- Coste, A., J. G. Rateau, J. F. Bernaudin, R. Peynegre and E. Escudier (1996). "Nasal polyposis pathogenesis: a flow cytometric and immunohistochemical study of epithelial cell proliferation." Acta Otolaryngol **116**(5): 755-761.
- Coste, A., J. G. Rateau, F. Roudot-Thoraval, C. Chapelin, L. Gilain, F. Poron, R. Peynegre, J. F. Bernaudin and E. Escudier (1996). "Increased epithelial cell proliferation in nasal polyps." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **122**(4): 432-436.
- Couto, L. G., A. M. Fernades, D. F. Brandao, D. Santi Neto, F. C. Valera and W. T. Anselmo-Lima (2008). "Histological aspects of rhinosinusal polyps." Braz J Otorhinolaryngol **74**(2): 207-212.

- Crampette, L., E. Serrano, J. M. Klossek, M. Rugina, P. Rouvier, R. Peynegre, J. P. Bebear and D. Stoll (2001). "[French multicenter prospective epidemiologic study (ORLI Group) of allergic and lung diseases associated with nasal polyposis]." *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord)* **122**(4): 231-236.
- Dalrymple, R. A. and P. Kenia (2019). "European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia: a guideline review." *Arch Dis Child Educ Pract Ed* **104**(5): 265-269.
- Danielsen, A., T. Tynning, K. A. Brokstad, J. Olofsson and A. Davidsson (2006). "Interleukin 5, IL6, IL12, IFN-gamma, RANTES and Fractalkine in human nasal polyps, turbinate mucosa and serum." *Eur Arch Otorhinolaryngol* **263**(3): 282-289.
- Datta-Mannan, A., D. R. Witcher, Y. Tang, J. Watkins and V. J. Wroblewski (2007). "Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor." *J Biol Chem* **282**(3): 1709-1717.
- Davidsson, A., A. Danielsen, G. Viale, J. Olofsson, P. Dell'Orto, C. Pellegrini, M. G. Karlsson and H. B. Hellquist (1996). "Positive identification in situ of mRNA expression of IL-6, and IL-12, and the chemotactic cytokine RANTES in patients with chronic sinusitis and polypoid disease. Clinical relevance and relation to allergy." *Acta Otolaryngol* **116**(4): 604-610.
- De Boeck, K., M. Proesmans, L. Mortelmans, B. Van Billoen, T. Willems and M. Jorissen (2005). "Mucociliary transport using 99mTc-albumin colloid: a reliable screening test for primary ciliary dyskinesia." *Thorax* **60**(5): 414-417.
- de Boer, W. I., H. S. Sharma, S. M. Baelemans, H. C. Hoogsteden, B. N. Lambrecht and G. J. Braunstahl (2008). "Altered expression of epithelial junctional proteins in atopic asthma: possible role in inflammation." *Can J Physiol Pharmacol* **86**(3): 105-112.
- DeConde, A. S., J. C. Mace, J. M. Levy, L. Rudmik, J. A. Alt and T. L. Smith (2017). "Prevalence of polyp recurrence after endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis with nasal polyposis." *Laryngoscope* **127**(3): 550-555.
- Del Donno, M., D. Pavia, J. E. Agnew, M. T. Lopez-Vidriero and S. W. Clarke (1988). "Variability and reproducibility in the measurement of tracheobronchial clearance in healthy subjects and patients with different obstructive lung diseases." *Eur Respir J* **1**(7): 613-620.
- Devars du Mayne, M., V. Pruliere-Escabasse, F. Zerach-Lancner, A. Coste and J. F. Papon (2011). "Polypectomy compared with ethmoidectomy in the treatment of nasal polyposis." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **137**(2): 111-117.
- Dorscheid, D. R., K. R. Wojcik, K. Yule and S. R. White (2001). "Role of cell surface glycosylation in mediating repair of human airway epithelial cell monolayers." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**(4): L982-992.
- Drake-Lee, A. B., D. Lowe, A. Swanston and A. Grace (1984). "Clinical profile and recurrence of nasal polyps." *J Laryngol Otol* **98**(8): 783-793.
- Dresdner, R. D. and L. B. Wong (1984). "Measurement of ciliary beat frequency using high-speed video microscopy." *Biomed Sci Instrum* **20**: 37-46.
- Dumont, J. A., A. J. Bitonti, D. Clark, S. Evans, M. Pickford and S. P. Newman (2005). "Delivery of an erythropoietin-Fc fusion protein by inhalation in humans through an immunoglobulin transport pathway." *J Aerosol Med* **18**(3): 294-303.
- England, R. J., J. J. Homer, L. C. Knight and S. R. Ell (1999). "Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter." *Clin Otolaryngol Allied Sci* **24**(1): 67-68.
- Feazel, L. M., C. E. Robertson, V. R. Ramakrishnan and D. N. Frank (2012). "Microbiome complexity and Staphylococcus aureus in chronic rhinosinusitis." *Laryngoscope* **122**(2): 467-472.
- Fischer, B. M. and J. A. Voynow (2002). "Neutrophil elastase induces MUC5AC gene expression in airway epithelium via a pathway involving reactive oxygen species." *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(4): 447-452.
- Fokkens, W. J., V. J. Lund, J. Mullol, C. Bachert, I. Alobid, F. Baroody, N. Cohen, A. Cervin, R. Douglas, P. Gevaert, C. Georgalas, H. Goossens, R. Harvey, P. Hellings, C. Hopkins, N. Jones, G. Joos, L. Kalogjera, B. Kern, M. Kowalski, D. Price, H. Riechelmann, R. Schlosser, B. Senior, M. Thomas, E. Toskala, R. Voegels, Y. Wang de and P. J. Wormald (2012). "European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012." *Rhinol Suppl* **23**: 3 p preceding table of contents, 1-298.
- Foss, S., A. Grevys, K. M. K. Sand, M. Bern, P. Blundell, T. E. Michaelsen, R. J. Pleass, I. Sandlie and J. T. Andersen (2016). "Enhanced FcRn-dependent transepithelial delivery of IgG by Fc-engineering and polymerization." *J Control Release* **223**: 42-52.

## Bibliographie

---

- Gevaert, P., L. Calus, T. Van Zele, K. Blomme, N. De Ruyck, W. Bauters, P. Hellings, G. Brusselle, D. De Bacquer, P. van Cauwenberge and C. Bachert (2013). "Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma." *J Allergy Clin Immunol* **131**(1): 110-116 e111.
- Gevaert, P., G. Holtappels, S. G. Johansson, C. Cuvelier, P. Cauwenberge and C. Bachert (2005). "Organization of secondary lymphoid tissue and local IgE formation to *Staphylococcus aureus* enterotoxins in nasal polyp tissue." *Allergy* **60**(1): 71-79.
- Gevaert, P., N. Van Bruaene, T. Cattaert, K. Van Steen, T. Van Zele, F. Acke, N. De Ruyck, K. Blomme, A. R. Sousa, R. P. Marshall and C. Bachert (2011). "Mepolizumab, a humanized anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis." *J Allergy Clin Immunol* **128**(5): 989-995 e981-988.
- Ghazi, K., U. Deng-Pichon, J. M. Warnet and P. Rat (2012). "Hyaluronan fragments improve wound healing on in vitro cutaneous model through P2X7 purinoreceptor basal activation: role of molecular weight." *PLoS One* **7**(11): e48351.
- Ghetie, V., S. Popov, J. Borvak, C. Radu, D. Matesoi, C. Medesan, R. J. Ober and E. S. Ward (1997). "Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis." *Nat Biotechnol* **15**(7): 637-640.
- Gieseck, R. L., 3rd, M. S. Wilson and T. A. Wynn (2018). "Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis." *Nat Rev Immunol* **18**(1): 62-76.
- Gong, F., Y. H. Pan, X. Huang, H. Y. Zhu and D. L. Jiang (2017). "From bench to bedside: Therapeutic potential of interleukin-9 in the treatment of asthma." *Exp Ther Med* **13**(2): 389-394.
- Goswami, R. and M. H. Kaplan (2011). "A brief history of IL-9." *J Immunol* **186**(6): 3283-3288.
- Gounni, A. S., B. Gregory, E. Nutku, F. Aris, K. Latifa, E. Minshall, J. North, J. Tavernier, R. Levit, N. Nicolaides, D. Robinson and Q. Hamid (2000). "Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils." *Blood* **96**(6): 2163-2171.
- Granger, V., C. Taille, D. Roach, S. Letuve, C. Dupin, F. Hamidi, B. Noel, C. Neukirch, M. Aubier, M. Pretolani, S. Chollet-Martin and L. de Chaisemartin (2019). "Circulating neutrophil and eosinophil extracellular traps are markers of severe asthma." *Allergy*.
- Gras, D., A. Petit, J. Charriot, L. Knabe, K. Alagha, A. S. Gamez, C. Garulli, A. Bourdin, P. Chanez, N. Molinari and I. Vachier (2017). "Epithelial ciliated beating cells essential for ex vivo ALI culture growth." *BMC Pulm Med* **17**(1): 80.
- Greisner, W. A., 3rd and G. A. Settipane (1996). "Hereditary factor for nasal polyps." *Allergy Asthma Proc* **17**(5): 283-286.
- Gruenert, D. C., W. E. Finkbeiner and J. H. Widdicombe (1995). "Culture and transformation of human airway epithelial cells." *Am J Physiol* **268**(3 Pt 1): L347-360.
- Guan, W. J., Y. Peng, X. X. Zi, K. S. Tan, T. T. He, N. S. Zhong and Y. Wang (2018). "Motile Ciliary Disorders in Chronic Airway Inflammatory Diseases: Critical Target for Interventions." *Curr Allergy Asthma Rep* **18**(9): 48.
- Gubernatorova, E. O., E. A. Gorshkova, O. A. Namakanova, R. V. Zvartsev, J. Hidalgo, M. S. Drutskaya, A. V. Tumanov and S. A. Nedospasov (2018). "Non-redundant Functions of IL-6 Produced by Macrophages and Dendritic Cells in Allergic Airway Inflammation." *Front Immunol* **9**: 2718.
- Guilleminault, L., N. Azzopardi, C. Arnoult, J. Sobilo, V. Herve, J. Montharu, A. Guillon, C. Andres, O. Herault, A. Le Pape, P. Diot, E. Lemarie, G. Paintaud, V. Gouilleux-Gruart and N. Heuze-Vourc'h (2014). "Fate of inhaled monoclonal antibodies after the deposition of aerosolized particles in the respiratory system." *J Control Release* **196**: 344-354.
- Hamilos, D. L. (2015). "Drivers of chronic rhinosinusitis: Inflammation versus infection." *J Allergy Clin Immunol* **136**(6): 1454-1459.
- Head, K., L. Y. Chong, C. Hopkins, C. Philpott, M. J. Burton and A. G. Schilder (2016). "Short-course oral steroids alone for chronic rhinosinusitis." *Cochrane Database Syst Rev* **4**: CD011991.
- Hedman, J., J. Kaprio, T. Poussa and M. M. Nieminen (1999). "Prevalence of asthma, aspirin intolerance, nasal polyposis and chronic obstructive pulmonary disease in a population-based study." *Int J Epidemiol* **28**(4): 717-722.
- Heidl, S., I. Ellinger, V. Niederberger, E. E. Walzl and R. Fuchs (2016). "Localization of the human neonatal Fc receptor (FcRn) in human nasal epithelium." *Protoplasma* **253**(6): 1557-1564.
- Henriksson, G., K. M. Westrin, F. Karpati, A. C. Wikstrom, P. Stierna and L. Hjelte (2002). "Nasal polyps in cystic fibrosis: clinical endoscopic study with nasal lavage fluid analysis." *Chest* **121**(1): 40-47.

## Bibliographie

---

- Herard, A. L., J. M. Zahm, D. Pierrot, J. Hinnrasky, C. Fuchey and E. Puchelle (1996). "Epithelial barrier integrity during in vitro wound repair of the airway epithelium." *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**(5): 624-632.
- Holgate, S. T. (2000). "Epithelial damage and response." *Clin Exp Allergy* **30 Suppl 1**: 37-41.
- Holgate, S. T. (2007). "Epithelium dysfunction in asthma." *J Allergy Clin Immunol* **120**(6): 1233-1244; quiz 1245-1236.
- Holgate, S. T., H. S. Arshad, G. C. Roberts, P. H. Howarth, P. Thurner and D. E. Davies (2009). "A new look at the pathogenesis of asthma." *Clin Sci (Lond)* **118**(7): 439-450.
- Holgate, S. T., P. Lackie, S. Wilson, W. Roche and D. Davies (2000). "Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(3 Pt 2): S113-117.
- Hopkins, C. (2019). "Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps." *N Engl J Med* **381**(1): 55-63.
- Hopkins, C., R. Slack, V. Lund, P. Brown, L. Copley and J. Browne (2009). "Long-term outcomes from the English national comparative audit of surgery for nasal polyposis and chronic rhinosinusitis." *Laryngoscope* **119**(12): 2459-2465.
- Hsieh, T. H., C. Y. Hsu, C. F. Tsai, C. C. Chiu, S. S. Liang, T. N. Wang, P. L. Kuo, C. Y. Long and E. M. Tsai (2016). "A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting beta-catenin/LEF-1 signaling." *Sci Rep* **6**: 19156.
- Humbert, M., C. Taille, L. Mala, V. Le Gros, J. Just, M. Molimard and S. investigators (2018). "Omalizumab effectiveness in patients with severe allergic asthma according to blood eosinophil count: the STELLAIR study." *Eur Respir J* **51**(5).
- Huriyati, E., E. Darwin, Y. Yanwirasti and I. Wahid (2019). "Differences in Expression of Inflammatory Mediator in Mucosal and Polyp Tissue between Chronic Rhinosinusitis and Recurrent Chronic Rhinosinusitis." *Open Access Maced J Med Sci* **7**(11): 1733-1738.
- Huttunen, K., M. Ruotsalainen, E. Iivanainen, P. Torkko, M. Katila and M. Hirvonen (2000). "Inflammatory responses in RAW264.7 macrophages caused by mycobacteria isolated from moldy houses." *Environ Toxicol Pharmacol* **8**(4): 237-244.
- Inoue, G. (2000). "Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury." *J Infect Chemother* **6**(1): 51-60.
- Jackson, C. L., L. Behan, S. A. Collins, P. M. Goggin, E. C. Adam, J. L. Coles, H. J. Evans, A. Harris, P. Lackie, S. Packham, A. Page, J. Thompson, W. T. Walker, C. Kuehni and J. S. Lucas (2016). "Accuracy of diagnostic testing in primary ciliary dyskinesia." *Eur Respir J* **47**(3): 837-848.
- Jeanson, L., I. C. Guerrero, J. F. Papon, C. Chhuon, P. Zadigue, V. Pruliere-Escabasse, S. Amselem, E. Escudier, A. Coste and A. Edelman (2014). "Proteomic analysis of nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients." *PLoS One* **9**(9): e108671.
- Jeffery, P. K. (1991). "Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease." *Am Rev Respir Dis* **143**(5 Pt 1): 1152-1158; discussion 1161.
- Jiang, G. X., L. P. Cao, P. C. Kang, X. Y. Zhong, T. Y. Lin and Y. F. Cui (2016). "Interleukin6 induces epithelial-mesenchymal transition in human intrahepatic biliary epithelial cells." *Mol Med Rep* **13**(2): 1563-1569.
- Jiao, J., S. Duan, N. Meng, Y. Li, E. Fan and L. Zhang (2016). "Role of IFN-gamma, IL-13, and IL-17 on mucociliary differentiation of nasal epithelial cells in chronic rhinosinusitis with nasal polyps." *Clin Exp Allergy* **46**(3): 449-460.
- Jiao, J., M. Wang, S. Duan, Y. Meng, N. Meng, Y. Li, E. Fan, C. A. Akdis and L. Zhang (2018). "Transforming growth factor-beta1 decreases epithelial tight junction integrity in chronic rhinosinusitis with nasal polyps." *J Allergy Clin Immunol* **141**(3): 1160-1163 e1169.
- Jones, E. A. and T. A. Waldmann (1972). "The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat." *J Clin Invest* **51**(11): 2916-2927.
- Jones, N. S., A. Strobl and I. Holland (1997). "A study of the CT findings in 100 patients with rhinosinusitis and 100 controls." *Clin Otolaryngol Allied Sci* **22**(1): 47-51.
- Junghans, R. P. and C. L. Anderson (1996). "The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(11): 5512-5516.

- Jussila, J., M. Ruotsalainen, H. Komulainen, K. Savolainen, A. Nevalainen and M. R. Hirvonen (1999). "Streptomyces anulatus from indoor air of moldy houses induce NO and IL-6 production in a human alveolar epithelial cell-line." Environ Toxicol Pharmacol **7**(4): 261-266.
- Kakoi, H. and F. Hiraide (1987). "A histological study of formation and growth of nasal polyps." Acta Otolaryngol **103**(1-2): 137-144.
- Kalish, L., K. Snidvongs, R. Sivasubramaniam, D. Cope and R. J. Harvey (2012). "Topical steroids for nasal polyps." Cochrane Database Syst Rev **12**: CD006549.
- Kanoh, S., T. Tanabe and B. K. Rubin (2011). "IL-13-induced MUC5AC production and goblet cell differentiation is steroid resistant in human airway cells." Clin Exp Allergy **41**(12): 1747-1756.
- Kariyawasam, H. H. (2019). "Chronic rhinosinusitis with nasal polyps: insights into mechanisms of disease from emerging biological therapies." Expert Rev Clin Immunol **15**(1): 59-71.
- Kato, A., Y. Ohashi, T. Masamoto, H. Sakamoto, M. Uekawa and Y. Nakai (1998). "Interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha synthesized by cholesteatoma cells affect mucociliary function in the eustachian tube." Acta Otolaryngol Suppl **538**: 90-97.
- Kato, K., B. H. Song, C. L. Howe and E. H. Chang (2019). "A Comprehensive Systematic Review of the Association Between Airway Mucins and Chronic Rhinosinusitis." Am J Rhinol Allergy **33**(4): 433-448.
- Kaviratne, M., M. Hesse, M. Leusink, A. W. Cheever, S. J. Davies, J. H. McKerrow, L. M. Wakefield, J. J. Letterio and T. A. Wynn (2004). "IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent." J Immunol **173**(6): 4020-4029.
- Kern, R. C., J. P. Stolovitzky, S. L. Silvers, A. Singh, J. T. Lee, D. M. Yen, A. M. C. Iloreta, Jr., F. P. J. Langford, B. Karanfilov, K. E. Matheny, J. W. Stambaugh, A. K. Gawlicka and R. I. s. investigators (2018). "A phase 3 trial of mometasone furoate sinus implants for chronic sinusitis with recurrent nasal polyps." Int Forum Allergy Rhinol **8**(4): 471-481.
- Kheradmand, F., H. G. Folkesson, L. Shum, R. Derynk, R. Pytela and M. A. Matthay (1994). "Transforming growth factor-alpha enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): L728-738.
- Kim, D. Y., S. H. Lee, R. G. Carter, A. Kato, R. P. Schleimer and S. H. Cho (2016). "A Recently Established Murine Model of Nasal Polyps Demonstrates Activation of B Cells, as Occurs in Human Nasal Polyps." Am J Respir Cell Mol Biol **55**(2): 170-175.
- Klimek, L., R. Dollner, O. Pfaar and J. Mullol (2014). "Aspirin desensitization: useful treatment for chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) in aspirin-exacerbated respiratory disease (AERD)?" Curr Allergy Asthma Rep **14**(6): 441.
- Klossek, J. M., F. Neukirch, C. Pribil, R. Jankowski, E. Serrano, I. Chanal and A. El Hasnaoui (2005). "Prevalence of nasal polyposis in France: a cross-sectional, case-control study." Allergy **60**(2): 233-237.
- Kogiso, H., S. Hosogi, Y. Ikeuchi, S. Tanaka, T. Inui, Y. Marunaka and T. Nakahari (2018). "[Ca(2+)]i modulation of cAMP-stimulated ciliary beat frequency via PDE1 in airway ciliary cells of mice." Exp Physiol **103**(3): 381-390.
- Kozlov, V. S., V. V. Shilenkov, A. S. Azatian and A. I. Kramnoi (2008). "[Mucociliary transport and motility of the ciliary system of the nasal mucosa in patients with chronic polypous rhinosinusitis]." Vestn Otorinolaringol(2): 10-13.
- Larsen, K. (1996). "The clinical relationship of nasal polyps to asthma." Allergy Asthma Proc **17**(5): 243-249.
- Larsen, P. L., M. Tos, W. Kuijpers and J. M. van der Beek (1992). "The early stages of polyp formation." Laryngoscope **102**(6): 670-677.
- Latvala, S., B. Jacobsen, M. B. Otteneder, A. Herrmann and S. Kronenberg (2017). "Distribution of FcRn Across Species and Tissues." J Histochem Cytochem **65**(6): 321-333.
- Lauw, F. N., D. Pajkrt, C. E. Hack, M. Kurimoto, S. J. van Deventer and T. van der Poll (2000). "Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia." J Immunol **165**(5): 2783-2789.
- Lazard, D. S., A. Moore, V. Hupertan, C. Martin, V. Escabasse, P. Dreyfus, P. R. Burgel, S. Amselem, E. Escudier and A. Coste (2009). "Muco-ciliary differentiation of nasal epithelial cells is decreased after wound healing in vitro." Allergy **64**(8): 1136-1143.
- Lechapt-Zalcman, E., V. Pruliere-Escabasse, D. Advenier, S. Galiacy, C. Charriere-Bertrand, A. Coste, A. Harf, M. P. d'Ortho and E. Escudier (2006). "Transforming growth factor-beta1 increases airway

- wound repair via MMP-2 upregulation: a new pathway for epithelial wound repair?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1277-1282.
- Leopold, D. A., D. Elkayam, J. C. Messina, C. Kosik-Gonzalez, P. G. Djupesland and R. A. Mahmoud (2019). "NAVIGATE II: Randomized, double-blind trial of the exhalation delivery system with fluticasone for nasal polyposis." J Allergy Clin Immunol **143**(1): 126-134 e125.
- Levy, J. M. and T. L. Smith (2017). "Is aspirin desensitization indicated for the treatment recalcitrant chronic rhinosinusitis with nasal polyposis in aspirin-exacerbated respiratory disease?" Laryngoscope **127**(4): 776-777.
- Li, Y. Y., C. W. Li, S. S. Chao, F. G. Yu, X. M. Yu, J. Liu, Y. Yan, L. Shen, W. Gordon, L. Shi and Y. Wang (2014). "Impairment of cilia architecture and ciliogenesis in hyperplastic nasal epithelium from nasal polyps." J Allergy Clin Immunol **134**(6): 1282-1292.
- Lin, D. C., R. K. Chandra, B. K. Tan, W. Zirkle, D. B. Conley, L. C. Grammer, R. C. Kern, R. P. Schleimer and A. T. Peters (2011). "Association between severity of asthma and degree of chronic rhinosinusitis." Am J Rhinol Allergy **25**(4): 205-208.
- Liu, C., Q. Li, X. Zhou, V. P. Kolosov and J. M. Perelman (2013). "Cortactin mediates elevated shear stress-induced mucin hypersecretion via actin polymerization in human airway epithelial cells." Int J Biochem Cell Biol **45**(12): 2756-2763.
- Longphre, M., D. Li, M. Gallup, E. Drori, C. L. Ordonez, T. Redman, S. Wenzel, D. E. Bice, J. V. Fahy and C. Basbaum (1999). "Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells." J Clin Invest **104**(10): 1375-1382.
- Louahed, J., M. Toda, J. Jen, Q. Hamid, J. C. Renaud, R. C. Levitt and N. C. Nicolaides (2000). "Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(6): 649-656.
- Louahed, J., Y. Zhou, W. L. Maloy, P. U. Rani, C. Weiss, Y. Tomer, A. Vink, J. Renaud, J. Van Snick, N. C. Nicolaides, R. C. Levitt and A. Haczku (2001). "Interleukin 9 promotes influx and local maturation of eosinophils." Blood **97**(4): 1035-1042.
- Lu, Y., S. Hong, H. Li, J. Park, B. Hong, L. Wang, Y. Zheng, Z. Liu, J. Xu, J. He, J. Yang, J. Qian and Q. Yi (2012). "Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo." J Clin Invest **122**(11): 4160-4171.
- Magister, S. and J. Kos (2013). "Cystatins in immune system." J Cancer **4**(1): 45-56.
- Martens, A. S., J. G. Bode, P. C. Heinrich and L. Graeve (2000). "The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells." J Cell Sci **113** ( Pt 20): 3593-3602.
- Marzesco, A. M., I. Dunia, R. Pandjaitan, M. Recouvreur, D. Dauzonne, E. L. Benedetti, D. Louvard and A. Zahraoui (2002). "The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells." Mol Biol Cell **13**(6): 1819-1831.
- Matsumoto, K., S. Fukuda, N. Hashimoto and H. Saito (2011). "Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro." Int Arch Allergy Immunol **155** Suppl 1: 34-39.
- McLane, M. P., A. Haczku, M. van de Rijn, C. Weiss, V. Ferrante, D. MacDonald, J. C. Renaud, N. C. Nicolaides, K. J. Holroyd and R. C. Levitt (1998). "Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(5): 713-720.
- Meng, J., P. Zhou, Y. Liu, F. Liu, X. Yi, S. Liu, G. Holtappels, C. Bachert and N. Zhang (2013). "The development of nasal polyp disease involves early nasal mucosal inflammation and remodelling." PLoS One **8**(12): e82373.
- Mihara, M., M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki and M. Shiina (2012). "IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **122**(4): 143-159.
- Mollazadeh, H., A. F. G. Cicero, C. N. Blesso, M. Pirro, M. Majeed and A. Sahebkar (2019). "Immune modulation by curcumin: The role of interleukin-10." Crit Rev Food Sci Nutr **59**(1): 89-101.
- Molmenti, E. P., T. Ziambaras and D. H. Perlmutter (1993). "Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells." J Biol Chem **268**(19): 14116-14124.
- Molnar-Gabor, E., E. Endreffy and A. Rozsasi (2000). "HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB1 genotypes in patients with nasal polyposis." Laryngoscope **110**(3 Pt 1): 422-425.

## Bibliographie

---

- Mortuaire, G., I. Gengler, C. Vandenhende-Szymanski, M. Delbeke, S. Gatault, D. Chevalier, L. Prin and M. Capron (2015). "Immune profile modulation of blood and mucosal eosinophils in nasal polyposis with concomitant asthma." Ann Allergy Asthma Immunol **114**(4): 299-307 e292.
- Mosser, D. M. and X. Zhang (2008). "Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine." Immunol Rev **226**: 205-218.
- Mucida, D. and S. Salek-Ardakani (2009). "Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces." J Allergy Clin Immunol **123**(5): 997-1003.
- Munkholm, M., K. G. Nielsen and J. Mortensen (2015). "Clinical value of measurement of pulmonary radioaerosol mucociliary clearance in the work up of primary ciliary dyskinesia." EJNMMI Res **5**(1): 118.
- Nadel, J. A. (2000). "Mechanisms of airway hypersecretion and novel therapy." Chest **117**(5 Suppl 1): 262S-266S.
- Nakagome, K. and M. Nagata (2018). "Involvement and Possible Role of Eosinophils in Asthma Exacerbation." Front Immunol **9**: 2220.
- Nizar, S., J. Copier, B. Meyer, M. Bodman-Smith, C. Galustian, D. Kumar and A. Dalglish (2009). "T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy?" Br J Cancer **100**(11): 1697-1703.
- Noelle, R. J. and E. C. Nowak (2010). "Cellular sources and immune functions of interleukin-9." Nat Rev Immunol **10**(10): 683-687.
- Noguchi, T., K. Nakagome, T. Kobayashi, Y. Uchida, T. Soma, H. Nakamoto and M. Nagata (2016). "Periostin upregulates the effector functions of eosinophils." J Allergy Clin Immunol **138**(5): 1449-1452 e1445.
- Norlander, T., K. M. Westrin, M. Fukami, P. Stierna and B. Carlsoo (1996). "Experimentally induced polyps in the sinus mucosa: a structural analysis of the initial stages." Laryngoscope **106**(2 Pt 1): 196-203.
- Novak, M. L., E. M. Weinheimer-Haus and T. J. Koh (2014). "Macrophage activation and skeletal muscle healing following traumatic injury." J Pathol **232**(3): 344-355.
- Oganesyan, V., M. M. Damschroder, K. E. Cook, Q. Li, C. Gao, H. Wu and W. F. Dall'Acqua (2014). "Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms." J Biol Chem **289**(11): 7812-7824.
- Ohno, I., R. G. Lea, K. C. Flanders, D. A. Clark, D. Banwatt, J. Dolovich, J. Denburg, C. B. Harley, J. Gauldie and M. Jordana (1992). "Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1)." J Clin Invest **89**(5): 1662-1668.
- Ordonez, C. L., R. Khashayar, H. H. Wong, R. Ferrando, R. Wu, D. M. Hyde, J. A. Hotchkiss, Y. Zhang, A. Novikov, G. Dolganov and J. V. Fahy (2001). "Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression." Am J Respir Crit Care Med **163**(2): 517-523.
- Papon, J. F., L. Bassinet, G. Cariou-Patron, F. Zerah-Lancner, A. M. Vojtek, S. Blanchon, B. Crestani, S. Amselem, A. Coste, B. Housset, E. Escudier and B. Louis (2012). "Quantitative analysis of ciliary beating in primary ciliary dyskinesia: a pilot study." Orphanet J Rare Dis **7**: 78.
- Papon, J. F., A. Coste, M. C. Gendron, C. Cordonnier, L. Wingerstmann, R. Peynegre and E. Escudier (2002). "HLA-DR and ICAM-1 expression and modulation in epithelial cells from nasal polyps." Laryngoscope **112**(11): 2067-2075.
- Passali, D., L. Bellussi, M. Bianchini Ciampoli and E. De Seta (1984). "Experiences in the determination of nasal mucociliary transport time." Acta Otolaryngol **97**(3-4): 319-323.
- Pearlman, A. N., R. K. Chandra, D. Chang, D. B. Conley, A. Tripathi-Peters, L. C. Grammer, R. T. Schleimer and R. C. Kern (2009). "Relationships between severity of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis, asthma, and atopy." Am J Rhinol Allergy **23**(2): 145-148.
- Pelaia, G., A. Vatrella, M. T. Busceti, L. Gallelli, M. Preiano, N. Lombardo, R. Terracciano and R. Maselli (2016). "Role of biologics in severe eosinophilic asthma - focus on reslizumab." Ther Clin Risk Manag **12**: 1075-1082.
- Peters, A. T., A. Kato, N. Zhang, D. B. Conley, L. Suh, B. Tancowny, D. Carter, T. Carr, M. Radtke, K. E. Hulse, S. Seshadri, R. Chandra, L. C. Grammer, K. E. Harris, R. Kern and R. P. Schleimer (2010). "Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps." J Allergy Clin Immunol **125**(2): 397-403 e310.

- Philpott, C. M., S. Erskine, C. Hopkins, N. Kumar, S. Anari, N. Kara, S. Sunkaraneni, J. Ray, A. Clark, A. Wilson, C. group, S. Erskine, C. Philpott, A. Clark, C. Hopkins, A. Robertson, S. Ahmed, N. Kara, S. Carrie, V. Sunkaraneni, J. Ray, S. Anari, P. Jervis, J. Panesaar, A. Farboud, N. Kumar, R. Cathcart, R. Almeyda, H. Khalil, P. Prinsley, N. Mansell, M. Salam, J. Hobson, J. Woods and E. Coombes (2018). "Prevalence of asthma, aspirin sensitivity and allergy in chronic rhinosinusitis: data from the UK National Chronic Rhinosinusitis Epidemiology Study." *Respir Res* **19**(1): 129.
- Ponikau, J. U., D. A. Sherris, E. B. Kern, H. A. Homburger, E. Frigas, T. A. Gaffey and G. D. Roberts (1999). "The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis." *Mayo Clin Proc* **74**(9): 877-884.
- Pothoven, K. L., J. E. Norton, K. E. Hulse, L. A. Suh, R. G. Carter, E. Rocci, K. E. Harris, S. Shintani-Smith, D. B. Conley, R. K. Chandra, M. C. Liu, A. Kato, N. Gonsalves, L. C. Grammer, 3rd, A. T. Peters, R. C. Kern, P. J. Bryce, B. K. Tan and R. P. Schleimer (2015). "Oncostatin M promotes mucosal epithelial barrier dysfunction, and its expression is increased in patients with eosinophilic mucosal disease." *J Allergy Clin Immunol* **136**(3): 737-746 e734.
- Pruliere-Escabasse, V., P. Fanen, A. C. Dazy, E. Lechapt-Zalcman, D. Rideau, A. Edelman, E. Escudier and A. Coste (2005). "TGF-beta 1 downregulates CFTR expression and function in nasal polyps of non-CF patients." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(1): L77-83.
- Puchelle, E. (2000). "Airway epithelium wound repair and regeneration after injury." *Acta Otorhinolaryngol Belg* **54**(3): 263-270.
- Puchelle, E., S. de Bentzmann and J. M. Zahm (1995). "Physical and functional properties of airway secretions in cystic fibrosis--therapeutic approaches." *Respiration* **62 Suppl 1**: 2-12.
- Quiros, M., H. Nishio, P. A. Neumann, D. Siuda, J. C. Brazil, V. Azcutia, R. Hilgarth, M. N. O'Leary, V. Garcia-Hernandez, G. Leoni, M. Feng, G. Bernal, H. Williams, P. H. Dedhia, C. Gerner-Smidt, J. Spence, C. A. Parkos, T. L. Denning and A. Nusrat (2017). "Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling." *J Clin Invest* **127**(9): 3510-3520.
- Raghavan, M., V. R. Bonagura, S. L. Morrison and P. J. Bjorkman (1995). "Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants." *Biochemistry* **34**(45): 14649-14657.
- Reader, J. R., D. M. Hyde, E. S. Schelegle, M. C. Aldrich, A. M. Stoddard, M. P. McLane, R. C. Levitt and J. S. Tepper (2003). "Interleukin-9 induces mucous cell metaplasia independent of inflammation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(6): 664-672.
- Redington, A. E. (2000). "Airway fibrosis in asthma: mechanisms, consequences, and potential for therapeutic intervention." *Monaldi Arch Chest Dis* **55**(4): 317-323.
- Renauld, J. C., C. Druetz, A. Kermouni, F. Houssiau, C. Uyttenhove, E. Van Roost and J. Van Snick (1992). "Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5690-5694.
- Rennard, S. I. (1999). "Inflammation and repair processes in chronic obstructive pulmonary disease." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(5 Pt 2): S12-16.
- Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." *Biochem J* **300 ( Pt 2)**: 281-290.
- Rudack, C., W. Stoll and C. Bachert (1998). "Cytokines in nasal polyposis, acute and chronic sinusitis." *Am J Rhinol* **12**(6): 383-388.
- Rudmik, L., Z. M. Soler, C. Hopkins, R. J. Schlosser, A. Peters, A. A. White, R. R. Orlandi, W. J. Fokkens, R. Douglas and T. L. Smith (2016). "Defining appropriateness criteria for endoscopic sinus surgery during management of uncomplicated adult chronic rhinosinusitis: a RAND/UCLA appropriateness study." *Rhinology* **54**(2): 117-128.
- Rugina, M., E. Serrano, J. M. Klossek, L. Crampette, D. Stoll, J. P. Bebear, M. Perrahia, P. Rouvier and R. Peynegre (2002). "Epidemiological and clinical aspects of nasal polyposis in France; the ORLI group experience." *Rhinology* **40**(2): 75-79.
- Ruotsalainen, M., M. R. Hirvonen, A. Hyvarinen, M. Teija, K. Savolainen and A. Nevalainen (1998). "Cytotoxicity, production of reactive oxygen species and cytokines induced by different strains of *Stachybotrys* sp. from moldy buildings in RAW264.7 macrophages." *Environ Toxicol Pharmacol* **6**(3): 193-199.
- Samson, G., A. Garcia de la Calera, S. Dupuis-Girod, F. Faure, E. Decullier, G. Paintaud, C. Vignault, J. Y. Scoazec, C. Pivot, H. Plauchu and F. Pirot (2012). "Ex vivo study of bevacizumab transport through porcine nasal mucosa." *Eur J Pharm Biopharm* **80**(2): 465-469.

## Bibliographie

---

- Samter, M. and R. F. Beers, Jr. (1968). "Intolerance to aspirin. Clinical studies and consideration of its pathogenesis." Ann Intern Med **68**(5): 975-983.
- Satir, P. and M. A. Sleight (1990). "The physiology of cilia and mucociliary interactions." Annu Rev Physiol **52**: 137-155.
- Saxena, A., S. Khosraviani, S. Noel, D. Mohan, T. Donner and A. R. Hamad (2015). "Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy." Cytokine **74**(1): 27-34.
- Schaffer, M., W. Weimer, S. Wider, C. Stulten, M. Bongartz, W. Budach and H. D. Becker (2002). "Differential expression of inflammatory mediators in radiation-impaired wound healing." J Surg Res **107**(1): 93-100.
- Scheller, J., N. Ohnesorge and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer." Scand J Immunol **63**(5): 321-329.
- Schipper, N. G., J. C. Verhoef and F. W. Merkus (1991). "The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery." Pharm Res **8**(7): 807-814.
- Schleimer, R. P., S. A. Sterbinsky, J. Kaiser, C. A. Bickel, D. A. Klunk, K. Tomioka, W. Newman, F. W. Lusinskas, M. A. Gimbrone, Jr., B. W. McIntyre and et al. (1992). "IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1." J Immunol **148**(4): 1086-1092.
- Schottelius, A. J., M. W. Mayo, R. B. Sartor and A. S. Baldwin, Jr. (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." J Biol Chem **274**(45): 31868-31874.
- Seresirikachorn, K., N. Suwanparin, C. Srisunthornphanich, W. Chitsuthipakorn, D. Kanjanawasee and K. Snidvongs (2019). "Factors of success of low-dose macrolides in chronic sinusitis: Systematic review and meta-analysis." Laryngoscope **129**(7): 1510-1519.
- Settipane, G. A. (1996). "Epidemiology of nasal polyps." Allergy Asthma Proc **17**(5): 231-236.
- Settipane, G. A. and F. H. Chafee (1977). "Nasal polyps in asthma and rhinitis. A review of 6,037 patients." J Allergy Clin Immunol **59**(1): 17-21.
- Sharma, R., R. Lakhani, J. Rimmer and C. Hopkins (2014). "Surgical interventions for chronic rhinosinusitis with nasal polyps." Cochrane Database Syst Rev(11): CD006990.
- Shimbara, A., P. Christodoulouopoulos, A. Soussi-Gounni, R. Olivenstein, Y. Nakamura, R. C. Levitt, N. C. Nicolaides, K. J. Holroyd, A. Tsicopoulos, J. J. Lafitte, B. Wallaert and Q. A. Hamid (2000). "IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma." J Allergy Clin Immunol **105**(1 Pt 1): 108-115.
- Simister, N. E. and K. E. Mostov (1989). "Cloning and expression of the neonatal rat intestinal Fc receptor, a major histocompatibility complex class I antigen homolog." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 571-580.
- Simister, N. E. and K. E. Mostov (1989). "An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens." Nature **337**(6203): 184-187.
- Slater, A., L. A. Smallman, A. C. Logan and A. B. Drake-Lee (1996). "Mucociliary function in patients with nasal polyps." Clin Otolaryngol Allied Sci **21**(4): 343-347.
- Soler, Z. M., D. A. Sauer, J. Mace and T. L. Smith (2009). "Relationship between clinical measures and histopathologic findings in chronic rhinosinusitis." Otolaryngol Head Neck Surg **141**(4): 454-461.
- Soyka, M. B., P. Wawrzyniak, T. Eiwegger, D. Holzmann, A. Treis, K. Wanke, J. I. Kast and C. A. Akdis (2012). "Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN-gamma and IL-4." J Allergy Clin Immunol **130**(5): 1087-1096 e1010.
- Spiekermann, G. M., P. W. Finn, E. S. Ward, J. Dumont, B. L. Dickinson, R. S. Blumberg and W. I. Lencer (2002). "Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung." J Exp Med **196**(3): 303-310.
- Stammberger, H. and W. Posawetz (1990). "Functional endoscopic sinus surgery. Concept, indications and results of the Messerklinger technique." Eur Arch Otorhinolaryngol **247**(2): 63-76.
- Steenwinckel, V., J. Louahed, M. M. Lemaire, C. Sommereyns, G. Warnier, A. McKenzie, F. Brombacher, J. Van Snick and J. C. Renauld (2009). "IL-9 promotes IL-13-dependent paneth cell hyperplasia and up-regulation of innate immunity mediators in intestinal mucosa." J Immunol **182**(8): 4737-4743.

- Steenwinckel, V., J. Louahed, C. Orabona, F. Huaux, G. Warnier, A. McKenzie, D. Lison, R. Levitt and J. C. Renauld (2007). "IL-13 mediates in vivo IL-9 activities on lung epithelial cells but not on hematopoietic cells." *J Immunol* **178**(5): 3244-3251.
- Stevens, W. W., R. J. Lee, R. P. Schleimer and N. A. Cohen (2015). "Chronic rhinosinusitis pathogenesis." *J Allergy Clin Immunol* **136**(6): 1442-1453.
- Stevens, W. W., R. P. Schleimer and R. C. Kern (2016). "Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps." *J Allergy Clin Immunol Pract* **4**(4): 565-572.
- Taille, C., A. Bourdin and G. Garcia (2016). "[Biomarkers in asthma]." *Presse Med* **45**(11): 1019-1029.
- Tan, L., N. Hatzirodos and P. J. Wormald (2008). "Effect of nerve growth factor and keratinocyte growth factor on wound healing of the sinus mucosa." *Wound Repair Regen* **16**(1): 108-116.
- Tarran, R., B. R. Grubb, J. T. Gatzky, C. W. Davis and R. C. Boucher (2001). "The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition." *J Gen Physiol* **118**(2): 223-236.
- Temann, U. A., Y. Laouar, E. E. Eynon, R. Homer and R. A. Flavell (2007). "IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells." *Int Immunol* **19**(1): 1-10.
- Temann, U. A., P. Ray and R. A. Flavell (2002). "Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology." *J Clin Invest* **109**(1): 29-39.
- Ternant, D., C. Arnoult, M. Pugniere, C. Dhomme, D. Drocourt, E. Perouzel, C. Passot, N. Baroukh, D. Mulleman, G. Tiraby, H. Watier, G. Paintaud and V. Gouilleux-Gruart (2016). "IgG1 Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding." *J Immunol* **196**(2): 607-613.
- Tian, L., Y. Li, R. Chang, P. Zhang, J. Zhang and L. Huo (2019). "Lentiviral vector-mediated IL-9 overexpression stimulates cell proliferation by targeting c-myc and cyclin D1 in colitis-associated cancer." *Oncol Lett* **17**(1): 175-182.
- Tomassen, P., G. Vandeplas, T. Van Zele, L. O. Cardell, J. Arebro, H. Olze, U. Forster-Ruhrmann, M. L. Kowalski, A. Olszewska-Ziaber, G. Holtappels, N. De Ruyck, X. Wang, C. Van Drunen, J. Mullol, P. Hellings, V. Hox, E. Toskala, G. Scadding, V. Lund, L. Zhang, W. Fokkens and C. Bachert (2016). "Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers." *J Allergy Clin Immunol* **137**(5): 1449-1456 e1444.
- Touboul, C., R. Lis, H. Al Farsi, C. M. Raynaud, M. Warfa, H. Althawadi, E. Mery, M. Mirshahi and A. Rafii (2013). "Mesenchymal stem cells enhance ovarian cancer cell infiltration through IL6 secretion in an amniochorionic membrane based 3D model." *J Transl Med* **11**: 28.
- Trautmann, A., K. Kruger, M. Akdis, D. Muller-Wening, A. Akkaya, E. B. Brocker, K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma." *Int Arch Allergy Immunol* **138**(2): 142-150.
- Ulrichts, P., A. Guglietta, T. Dreier, T. van Bragt, V. Hanssens, E. Hofman, B. Vankerckhoven, P. Verheesen, N. Ongenae, V. Lykhopiy, F. J. Enriquez, J. Cho, R. J. Ober, E. S. Ward, H. de Haard and N. Leupin (2018). "Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans." *J Clin Invest* **128**(10): 4372-4386.
- Valera, F. C. P., M. Ruffin, D. Adam, E. Maille, B. Ibrahim, J. Berube, S. Rousseau, E. Brochiero and M. Y. Desrosiers (2019). "Staphylococcus aureus impairs sinonasal epithelial repair: Effects in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and control subjects." *J Allergy Clin Immunol* **143**(2): 591-603 e593.
- van de Donk, H. J., A. G. van den Heuvel, J. Zuidema and F. W. Merkus (1982). "The effects of nasal drops and their additives on human nasal mucociliary clearance." *Rhinology* **20**(3): 127-137.
- van Leeuwen, B. H., M. E. Martinson, G. C. Webb and I. G. Young (1989). "Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF genes, on human chromosome 5." *Blood* **73**(5): 1142-1148.
- Van Zele, T., P. Gevaert, G. Holtappels, P. van Cauwenberge and C. Bachert (2007). "Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens." *Clin Exp Allergy* **37**(12): 1840-1847.
- Van Zele, T., P. Gevaert, J. B. Watelet, G. Claeys, G. Holtappels, C. Claeys, P. van Cauwenberge and C. Bachert (2004). "Staphylococcus aureus colonization and IgE antibody formation to enterotoxins is increased in nasal polyposis." *J Allergy Clin Immunol* **114**(4): 981-983.

## Bibliographie

---

- Verma, S. K., V. N. Garikipati, P. Krishnamurthy, M. Khan, T. Thorne, G. Qin, D. W. Losordo and R. Kishore (2016). "IL-10 Accelerates Re-Endothelialization and Inhibits Post-Injury Intimal Hyperplasia following Carotid Artery Denudation." *PLoS One* **11**(1): e0147615.
- Vermeer, P. D., R. Harson, L. A. Einwalter, T. Moninger and J. Zabner (2003). "Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**(3): 286-295.
- Vickery, T. W., V. R. Ramakrishnan and J. D. Suh (2019). "The Role of Staphylococcus aureus in Patients with Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis." *Curr Allergy Asthma Rep* **19**(4): 21.
- Vignola, A. M., G. Chiappara, L. Siena, A. Bruno, R. Gagliardo, A. M. Merendino, B. S. Polla, A. P. Arrigo, G. Bonsignore, J. Bousquet and P. Chanez (2001). "Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid-dependent asthma." *J Allergy Clin Immunol* **108**(5): 738-746.
- Voynow, J. A. (2002). "What does mucin have to do with lung disease?" *Paediatr Respir Rev* **3**(2): 98-103.
- Wang, Q. P., E. Escudier, F. Roudot-Thoraval, I. Abd-Al Samad, R. Peynegre and A. Coste (1997). "Myofibroblast accumulation induced by transforming growth factor-beta is involved in the pathogenesis of nasal polyps." *Laryngoscope* **107**(7): 926-931.
- Wang, X. P., M. Schunck, K. J. Kallen, C. Neumann, C. Trautwein, S. Rose-John and E. Proksch (2004). "The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier homeostasis." *J Invest Dermatol* **123**(1): 124-131.
- Wani, M. A., L. D. Haynes, J. Kim, C. L. Bronson, C. Chaudhury, S. Mohanty, T. A. Waldmann, J. M. Robinson and C. L. Anderson (2006). "Familial hypercatabolic hypoproteinemia caused by deficiency of the neonatal Fc receptor, FcRn, due to a mutant beta2-microglobulin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13): 5084-5089.
- Wanner, A. (1996). "Clinical perspectives: role of the airway circulation in drug therapy." *J Aerosol Med* **9**(1): 19-23.
- Watelet, J. B., C. Bachert, P. Gevaert and P. Van Cauwenberge (2002). "Wound healing of the nasal and paranasal mucosa: a review." *Am J Rhinol* **16**(2): 77-84.
- Watelet, J. B., C. Claeys, C. Perez-Novo, P. Gevaert, P. Van Cauwenberge and C. Bachert (2004). "Transforming growth factor beta1 in nasal remodeling: differences between chronic rhinosinusitis and nasal polyposis." *Am J Rhinol* **18**(5): 267-272.
- Watelet, J. B., J. M. Dogne and F. Mullier (2015). "Remodeling and Repair in Rhinosinusitis." *Curr Allergy Asthma Rep* **15**(6): 34.
- Weathington, N. M., A. H. van Houwelingen, B. D. Noerager, P. L. Jackson, A. D. Kraneveld, F. S. Galin, G. Folkerts, F. P. Nijkamp and J. E. Blalock (2006). "A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation." *Nat Med* **12**(3): 317-323.
- Weber, S. A. T., R. M. Iyomasa, C. C. Correa, W. N. M. Florentino and G. F. Ferrari (2017). "Nasal polyposis in cystic fibrosis: follow-up of children and adolescents for a 3-year period." *Braz J Otorhinolaryngol* **83**(6): 677-682.
- White, D. E., J. Bartley and R. J. Nates (2015). "Model demonstrates functional purpose of the nasal cycle." *Biomed Eng Online* **14**: 38.
- Wilson, R., E. Alton, A. Rutman, P. Higgins, W. Al Nakib, D. M. Geddes, D. A. Tyrrell and P. J. Cole (1987). "Upper respiratory tract viral infection and mucociliary clearance." *Eur J Respir Dis* **70**(5): 272-279.
- Winters, S. L. and D. B. Yeates (1997). "Roles of hydration, sodium, and chloride in regulation of canine mucociliary transport system." *J Appl Physiol* (1985) **83**(4): 1360-1369.
- Wise, S. K., K. A. Den Beste, E. K. Hoddeson, C. A. Parkos and A. Nusrat (2013). "Sinonasal epithelial wound resealing in an in vitro model: inhibition of wound closure with IL-4 exposure." *Int Forum Allergy Rhinol* **3**(6): 439-449.
- Wynne, M., C. Atkinson, R. J. Schlosser and J. K. Mulligan (2019). "Contribution of Epithelial Cell Dysfunction to the Pathogenesis of Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps." *Am J Rhinol Allergy*: 1945892419868588.
- Xiao, C., S. M. Puddicombe, S. Field, J. Haywood, V. Broughton-Head, I. Puxeddu, H. M. Haitchi, E. Vernon-Wilson, D. Sammut, N. Bedke, C. Cremin, J. Sones, R. Djukanovic, P. H. Howarth, J. E. Collins, S. T. Holgate, P. Monk and D. E. Davies (2011). "Defective epithelial barrier function in asthma." *J Allergy Clin Immunol* **128**(3): 549-556 e541-512.

## Bibliographie

---

- Xu, J., R. Han, D. W. Kim, J. H. Mo, Y. Jin, K. S. Rha and Y. M. Kim (2016). "Role of Interleukin-10 on Nasal Polyposis in Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps." PLoS One **11**(9): e0161013.
- Yamada, T., S. Fujieda, S. Mori, H. Yamamoto and H. Saito (2000). "Macrolide treatment decreased the size of nasal polyps and IL-8 levels in nasal lavage." Am J Rhinol **14**(3): 143-148.
- Yamaya, M., W. E. Finkbeiner, S. Y. Chun and J. H. Widdicombe (1992). "Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium." Am J Physiol **262**(6 Pt 1): L713-724.
- Yan, B., H. Lou, Y. Wang, Y. Li, Y. Meng, S. Qi, M. Wang, L. Xiao, C. Wang and L. Zhang (2019). "Epithelium-derived cystatin SN enhances eosinophil activation and infiltration through IL-5 in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps." J Allergy Clin Immunol **144**(2): 455-469.
- Yarrow, J. C., Z. E. Perlman, N. J. Westwood and T. J. Mitchison (2004). "A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods." BMC Biotechnol **4**: 21.
- Ye, Z. J., Q. Zhou, W. Yin, M. L. Yuan, W. B. Yang, X. Z. Xiong, J. C. Zhang and H. Z. Shi (2012). "Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." Am J Respir Crit Care Med **186**(11): 1168-1179.
- Zahm, J. M., H. Kaplan, A. L. Herard, F. Doriot, D. Pierrot, P. Somelette and E. Puchelle (1997). "Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium." Cell Motil Cytoskeleton **37**(1): 33-43.
- Zhang, N., P. Gevaert, T. van Zele, C. Perez-Novo, J. Patou, G. Holtappels, P. van Cauwenberge and C. Bachert (2005). "An update on the impact of Staphylococcus aureus enterotoxins in chronic sinusitis with nasal polyposis." Rhinology **43**(3): 162-168.
- Zhou, Y., C. Li, D. Li, Y. Zheng and J. Wang (2017). "IL-5 blocks apoptosis and tau hyperphosphorylation induced by Abeta25-35 peptide in PC12 cells." J Physiol Biochem **73**(2): 259-266.
- Zuckerman, J. D., W. Y. Lee, J. M. DelGaudio, C. E. Moore, P. Nava, A. Nusrat and C. A. Parkos (2008). "Pathophysiology of nasal polyposis: the role of desmosomal junctions." Am J Rhinol **22**(6): 589-597.
-

---

# Résumé

---

---

## Résumé

---

**Contexte :** Dans la physiopathologie encore mal expliquée à ce jour de la polypose naso-sinusienne (PNS), l'implication de la cellule épithéliale dans la genèse, la croissance et l'inflammation des polypes semble un mécanisme important. La cellule épithéliale présenterait une altération de ses fonctions de maintien de la barrière épithéliale et d'épuration muco-ciliaire. Une dysrégulation des mécanismes de réparation épithéliale serait aussi observée. Les mécanismes conduisant au dysfonctionnement de la cellule épithéliale restent mal connus. Une meilleure compréhension permettrait de dégager de nouvelles cibles thérapeutiques pour la PNS. Notre hypothèse serait que, parmi les cytokines inflammatoires impliquées dans la PNS, les interleukines (IL) telles que l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9 et l'IL-10 pourraient modifier les mécanismes de réparation épithéliale et l'épuration muco-ciliaire. Par ailleurs, les thérapies monoclonales émergentes dans la PNS étant très prometteuses, nous souhaitons avoir une réflexion sur les nouveaux enjeux thérapeutiques et les moyens d'améliorer l'efficacité, la biodisponibilité des traitements déjà utilisés et ceux à développer.

**Objectif :** L'objectif de cette thèse était i/ de préciser les mécanismes d'épuration muco-ciliaire, de réparation épithéliale, différenciation épithéliale en partie *ex vivo* et *in vitro*, dans un modèle de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines (CENH) issues de polypes, ii/ d'évaluer l'impact sur ces éléments des principales interleukines ayant un rôle reconnu dans l'inflammation chronique de la PNS, en particulier l'IL-6 et iii/ d'évaluer l'expression et la fonction *in vitro* du Récepteur Néonatal pour le Fragment Constant des immunoglobulines (FcRn) dans les CENH comme support de la diffusion locale des biothérapies.

**Méthodes:** Pour évaluer la fonction ciliaire dans la PNS, les bordures ciliées des brossages de polypes ont été analysées *ex vivo* par vidéo-microscopie numérique à haute vitesse pour mesurer: la fréquence de battement ciliaire (FBC), la longueur ciliaire, la densité ciliaire relative, la longueur de l'onde métachrone et enfin l'index d'efficacité du battement ciliaire. L'index d'efficacité du battement ciliaire a été mesuré à l'aide d'un nouvel outil, utilisant le déplacement de microbilles induites par le battement des cils pour calculer la contrainte de cisaillement exercée par le cil sur le fluide. Dans un modèle de cultures primaires de CENH en interface Air-Liquide (ALI), les effets de l'IL-5, IL-6, IL-9 et IL-10 sur la cinétique de fermeture d'une blessure ont été comparés à des conditions contrôles. Après la fermeture de la blessure, le processus de différenciation a été caractérisé dans des conditions basales et après une supplémentation en ILs, en utilisant des immunomarqueurs des cellules basales, caliciformes et ciliées (cytokératine 14, MUC5AC et la tubuline  $\beta$ IV respectivement). La fonction ciliaire au sein des cultures de CENH-ALI a été également analysée. Enfin, l'expression du FcRn dans les CENH a été caractérisée par RT-PCR, Western Blot et immunohistochimie. Des tests de transcytose d'un anticorps monoclonal thérapeutique (Infliximab) ont été réalisés dans le sens apico-basal pour tester la fonctionnalité du récepteur FcRn comme support d'une diffusion locale de cet agent thérapeutique.

**Résultats :** Les bordures ciliées de polypes présentaient en microscopie optique, de manière constante, des multiples amas ciliés battants. La FBC moyenne était similaire au sein des polypes (8,4 Hz) versus les bordures ciliées contrôles (8,2 Hz) et significativement plus lente au niveau des cornets inférieurs (6,7 Hz) par rapport aux polypes provenant du même patient. L'index d'efficacité du battement ciliaire était significativement plus bas au niveau des polypes (0,38 mPa) et des cornets inférieurs (0,2 mPa) chez les patients atteints de PNS par rapport aux cornets des patients contrôles (0,87 mPa). Concernant l'influence des ILs sur les dysfonctions épithéliales i) l'IL-6 accélérerait la réparation épithéliale *in vitro* avec un effet dose-réponse, alors qu'aucun effet n'a été observé après stimulation par les autres ILs testées. 24 heures après la blessure, 79% des puits blessés avec IL6-100 (n = 15/19) étaient complètement refermés, contre 46% dans le groupe IL6-10 (n = 10/22), contre 28% dans le groupe IL6-1 (n = 8/29) versus 15% dans le groupe témoin (n = 7/48), ii) au niveau de la zone de blessure la cellularité (nombre de noyaux) en présence d'IL-6 augmentait avec le temps entre le stade précoce de la réparation et le stade tardif de la réparation iii) la stimulation par l'IL-6 entraînait une diminution de la différenciation mucipaire à un stade intermédiaire de la réparation. L'IL-6 a entraîné une augmentation de la FBC et de la longueur de l'onde métachrone, sans modification significative de la densité ciliaire, de la longueur des cils et de l'index d'efficacité. L'expression de l'ARNm et de la protéine FcRn a été mise en évidence dans les CENH à un stade précoce et tardif de culture. Cette expression intense du FcRn était retrouvée dans le cytoplasme des cellules ciliées, des cellules à mucus et des cellules basales. Enfin, la transcytose transépithéliale d'un anticorps monoclonal thérapeutique IgG1 avec un effet dose-réponse a été clairement démontrée.

**Conclusion :** Le battement ciliaire, chez les patients atteints de PNS, a une efficacité altérée et une mauvaise coordination. Nos résultats corroborent l'hypothèse d'une dyskinésie ciliaire acquise dans la PNS pouvant participer au processus inflammatoire chronique. Nos résultats suggèrent aussi que l'IL-6 semble impliquée dans la migration, prolifération et dans une moindre mesure la différenciation cellulaire après une blessure épithéliale et jouerait donc un rôle important dans les dysfonctions de la réparation épithéliale. Nous avons enfin décrit, pour la première fois, l'expression du FcRn et la transcytose d'un anticorps monoclonal dans un modèle d'épithélium respiratoire nasal humain *in vitro*. Cette dernière partie du travail, qui fait « la preuve du concept », ouvre une voie vers l'administration nasale d'anticorps monoclonaux dépendante du FcRn, dont certains pourraient cibler de façon spécifique la cellule épithéliale dont le rôle dans la physiopathologie de la PNS nous semble capital.

---